

***Staphylococcus aureus* portadores de genes de toxinas isolados em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha**

Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking

RIALA6/1218

Luiz Francisco ZAFALON^{1*}, Juliana Rodrigues Pozzi ARCARO², Antônio NADER FILHO³, Luciano Menezes FERREIRA⁴, Josir Laine Aparecida VESCHI⁵

* Endereço para correspondência: Embrapa Pecuária Sudeste, Pesquisa, Sanidade Animal
Rodovia Washington Luís, Km 234, Caixa Postal 339 - CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil,
e-mail: zafalon@cppse.embrapa.br

¹Embrapa Pecuária Sudeste, Pesquisa / Sanidade Animal, São Carlos, SP, Brasil

²Centro de Bovinos de Leite, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, Brasil

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

⁴Assistência Técnica Integrada, Instituto Aequitas, Araraquara, SP, Brasil

⁵Embrapa Semi Árido, Pesquisa, Sanidade Animal, Petrolina, PE, Brasil.

Recebido: 27.05.2009 – Aceito para publicação: 27.07.2009

RESUMO

No presente estudo foi analisada a bactéria *S. aureus* isolada de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha de vacas por meio de técnica de amplificação de genes da toxina. As amostras de leite e dos óstios foram obtidas antes da ordenha dos animais e as de teteiras antes e durante a ordenha sob diferentes condições climáticas. A análise dos genes das enterotoxinas A e D e da toxina da síndrome do choque tóxico foi efetuada por meio de técnica de amplificação das respectivas sequências codificadoras. O gene *sea* foi o mais prevalente dentre os pesquisados e a maioria dos isolados foi detectada em amostras de leite de quartos mamários com mastite. A presença de genes de toxinas estafilocócicas em *S. aureus* isolados de diferentes fontes de transmissão dentro da cadeia epidemiológica da mastite bovina evidencia a possibilidade de veiculação desse micro-organismo por meio de leite contaminado e que pode representar riscos à saúde pública.

Palavras-chave. mastite, leite, Saúde Pública, genes de toxinas.

ABSTRACT

S. aureus isolated from diverse transmission sources during the cow milking was studied by amplifying the toxins genes. The milk samples and specimens from teat orifices were collected before milking, and samples from mouthpieces were collected before and during the milking procedure performed at varied climatic conditions. The study on the A to D enterotoxins genes and the toxin of toxic shock syndrome were carried out by amplifying the respective coding sequences. The *sea* gene showed to be the most prevalent among those analyzed, and the majority of isolated were detected in milk samples from mammary quarters with mastitis. The occurrence of staphylococcal toxins genes in *S. aureus* isolated from different sources of bovine mastitis epidemiological chain, evidences the feasibility of this microorganism transmission by contaminated milk, being a potential risk to public health.

Key words. mastitis, milk, Public Health, toxin gens.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de micro-organismos que infectam os animais e são transmitidos às pessoas é preocupante, uma vez que algumas das fontes de transmissão de patógenos são importantes produtos na cadeia alimentar humana. Um destes produtos é o leite, reconhecido por ser altamente nutritivo e parte fundamental na dieta de idosos e crianças. A mastite é a principal doença que afeta os bovinos leiteiros, causada principalmente por bactérias, dentre as quais *Staphylococcus aureus*. Este micro-organismo constitui um grande problema em Saúde Pública, pois suas estirpes podem produzir enterotoxinas (SEs) e toxinas como a da “síndrome do choque tóxico” (TSST-1) que podem causar em humanos intoxicações alimentares e até desordens multissistêmicas¹.

Por ser *S. aureus* importante agente infeccioso na cadeia epidemiológica da mastite bovina, o estudo do ambiente de ordenha dos animais é salutar para a identificação das características patogênicas do micro-organismo e de medidas para o seu controle. Ações preventivas poderiam evitar a transmissão desta bactéria de um animal a outro e reduzir os riscos do agente ser transmitido pelo leite. Uma vez que as toxinas produzidas são termoestáveis e não inativadas pelas temperaturas aplicadas durante o processo de pasteurização do leite, a busca de patógenos cujos genes possam ser amplificados, como os genes das principais enterotoxinas e toxinas dentro das propriedades leiteiras, pode fornecer informações sobre a qualidade do produto que será submetido às indústrias².

Em períodos com maiores ocorrências de chuvas, as condições higiênicas do rebanho ficam comprometidas pela influência negativa da elevação dos níveis de umidade que, em conjunto com a temperatura, favorecem a sobrevivência e a proliferação dos *S. aureus*. A literatura registra que em períodos mais chuvosos ocorre um percentual menor dos *S. aureus* com sensibilidade aos princípios ativos de diversos antimicrobianos que foram testados³, quando comparados com os micro-organismos isolados em épocas com índices pluviométricos inferiores, 8,7% contra 27,3%, respectivamente, abrindo caminho para mais estudos sobre a possível maior patogenicidade deste micro-organismo em épocas chuvosas.

Como forma de acrescentar outras informações referentes à epidemiologia da mastite bovina e traçar considerações sobre a sua relação com a saúde pública, estudou-se a capacidade de amplificação de genes de toxinas por *S. aureus* em diferentes fontes de transmissão

no ambiente de ordenha de vacas em lactação, em períodos classificados de acordo com a ocorrência de chuvas.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Localização da propriedade

O rebanho fazia parte de estabelecimento de produção leiteira localizado na região de Campinas, interior do Estado de São Paulo, composto por animais das raças Holandesa e Pardo-Suíça. O tipo de ordenha era mecânico em sistema fechado, cuja a obtenção de leite era realizada duas vezes por dia.

■ Seleção dos animais para a colheita de amostras de leite

As amostras de leite foram obtidas no decorrer de 16 meses, entre agosto de 2005 e dezembro de 2006, quando foi investigada a presença de mastite subclínica nas vacas em lactação do rebanho com a realização mensal do *California Mastitis Test* (CMT). A leitura da prova foi considerada como positiva quando era verificada a formação de viscosidade da mistura entre leite e o reagente CMT. Os casos clínicos de mastite também foram investigados, quando alterações macroscópicas do leite ou da glândula mamária eram condizentes para classificar a doença como clínica, como grumos e/ou sinais visíveis de inflamação da glândula. Durante o período em que foi realizado o estudo, o rebanho apresentou uma mediana de 52 vacas em lactação.

■ Método de colheita de leite dos quartos mamários

As amostras de leite com reação positiva ao CMT e as de quartos mamários com alterações macroscópicas da glândula mamária e/ou do leite foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council*⁴. Utilizou-se tubos de ensaio esterilizados para a obtenção de 2 a 5 mL da amostra de leite, em duplicatas, de cada quarto mamário, antes de iniciar a ordenha e após a antissepsia do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v). As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com refrigeração por gelo e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacterianos.

■ Amostras obtidas a partir dos óstios papilares

As amostras dos óstios papilares de animais que apresentaram quartos mamários reagentes ao CMT foram obtidas independentemente se todos os quartos estavam

reagentes, com o auxílio de suabe estéril, por meio da realização de movimentos circulares sobre o óstio⁵. Este procedimento foi realizado após a antissepsia efetuada pelo ordenhador. Procedeu-se o transporte das amostras com a presença de água peptonada estéril em cada tubo de ensaio.

■ Amostras originadas das teteiras

As amostras originadas das teteiras foram obtidas após a fricção de suabes estéreis, em movimentos circulares, na porção final de cada um dos quatro insufladores para cada conjunto de ordenha, em todos os conjuntos da ordenhadeira⁶. Os suabes foram transportados em tubos de vidro individuais com água peptonada estéril. As colheitas destas amostras foram realizadas em dois períodos, inicialmente quando metade dos animais haviam sido ordenhados e, em um outro momento, após o término das ordenhas.

■ Classificação dos períodos de obtenção das amostras

Os animais foram distribuídos em dois períodos, de acordo com os índices pluviométricos ocorridos na região em que a propriedade estava localizada⁷. O primeiro período foi denominado “Estação seca” ou “Período seco”, cujo índice pluviométrico máximo entre a realização de duas colheitas de amostras foi igual a 56,2 mm, com precipitação média de 27,9 mm. Por um outro lado, a “Estação chuvosa” ou “Período chuvoso” apresentou índices pluviométricos máximos que permaneceram entre 76,3 mm e 193,8 mm, com uma média de chuvas igual a 113,6 mm.

■ Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* nas diferentes fontes estudadas

O leite obtido a partir dos quartos mamários foi semeado em placas de Petri com ágar base acrescentado de sangue ovino, na concentração de 5%, com o auxílio de alça de platina, enquanto as amostras obtidas a partir dos óstios e insufladores foram semeadas diretamente com os suabes utilizados nas colheitas. Todas as placas foram incubadas por um período de 18 a 24 horas, à temperatura de 37°C. Após o crescimento das colônias, elas foram submetidas à coloração de Gram, com posterior realização das provas de catalase e coagulase lenta com plasma de coelho⁸. Os cocos que demonstraram ser Gram-positivos e, posteriormente, com reações positivas nas provas da catalase e coagulase foram submetidos à prova para verificação da produção de acetoina e utilização da maltose e da trealose. As amostras positivas a estas provas foram classificadas como *S. aureus*⁹.

■ Análises moleculares das amostras

A participação de *S. aureus* na etiologia da doença foi confirmada pela extração e amplificação do DNA cromossomal específico¹⁰. Para a extração do DNA bacteriano, foi utilizado o Kit GFX Genomic Blood® (GE Healthcare, Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil), com o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e as colunas GFX de purificação. A lise bacteriana foi realizada com o auxílio de um pré-tratamento com lisozima.

O protocolo descrito por Martineau et al.¹¹ foi utilizado para a amplificação de fragmentos de DNA cromossômico específico do *S. aureus*. As reações compreenderam um volume final de 20 µL com 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada *dNTP*, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador Sa442-1 (5'- AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG- 3') e Sa442-2 (5'- CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA- 3'), e 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*. As misturas de PCR foram submetidas à desnaturação, por três minutos, a 94 °C e, posteriormente, a 30 ciclos de um segundo, a 95 °C, para a desnaturação e 30 segundos, a 55 °C, para o pareamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese em gel de agarose em concentração de 2%, corado com brometo de etídio. Marcador de tamanho molecular 100 pb foi utilizado como padrão de peso molecular.

■ Amplificação dos genes das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina TSST-1

Utilizou-se DNAs extraídos das estirpes de *S. aureus* e armazenados a - 20 °C para a pesquisa dos genes de enterotoxinas dos tipos A a D (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), por meio da amplificação de suas sequências codificadoras.

Segundo protocolo estabelecido por Cunha et al.¹², as reações compreenderam um volume final de 50 µL, com 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada *dNTP*, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (JOHNSON et al., 1991) *Sea*1 (5'- TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA) e *Sea*2 (5'- GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA); *Seb*1 (5'- TCG CAT CAA ACT GAC AAA C) e *Seb*2 (5'- GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC); *Sec*1 (5'- GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT) e *Sec*2 (5'- AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC);

Sed1 (5'-CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT) e Sed2 (5'-TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG); Tst1 (5'-ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA) e Tst2 (5'-TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT), 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*, com a utilização de 5 µL de DNA de cada estirpe identificada genotipicamente como pertencente à espécie *S. aureus*.

As misturas de PCR foram submetidas a um primeiro ciclo de 94 °C por quatro minutos, à desnaturação a 94°C por dois minutos, pareamento a 55 °C por um minuto e 30 segundos e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores a 72°C por um minuto e 30 segundos, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94 °C por dois minutos, pareamento a 53 °C por um minuto e 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de pareamento foi reduzida a 51 °C, seguido por mais 37 ciclos a 94 °C por dois minutos, 51 °C por um minuto e 30 segundos e 72 °C por um minuto e 30 segundos. No final dos 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por sete minutos e a 4 °C até o momento de retirada do termociclador.

Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese (150 V por 1 h e 30 min) em gel de agarose, em concentração de 2%, corado com brometo de etídio. Após leitura em fotodocumentador, os produtos amplificados foram comparados com marcador de tamanho molecular 100 pb.

■ Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão em disco¹³ em placas de ágar Mueller-Hinton, frente a 12 antimicrobianos representados pela gentamicina (10 µg), penicilina (10 UI), oxacilina (1 µg), tetraciclina (30 µg), cefepime (30 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), sulfazotrim (25 µg), vancomicina (30 µg), clindamicina (2 µg), ciprofloxacina (5 µg) e rifampicina (5 µg). A aferição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos foi realizada segundo o preconizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)¹⁴.

■ Contagem de células somáticas do leite

As amostras de leite para a CCS foram obtidas no mesmo dia em que foram retiradas as amostras de leite para o exame microbiológico, com prévio acondicionamento em frascos plásticos com capacidade para 60 mL, com

a adição de duas pastilhas de bronopol. A determinação celular foi efetuada por contador eletrônico (Somacount 300, Bentley Instruments).

■ Análise estatística

O teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn foi utilizado para verificar a relação existente entre a CCS do leite dos quartos mamários com mastite e a produção de genes de toxinas por *S. aureus*. Os isolamentos dos micro-organismos nas diferentes fontes pesquisadas, de acordo com os índices pluviométricos, assim como a presença dos genes pesquisados foram comparados com a utilização do teste exato de Fisher¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência real dos casos de intoxicação estafilocócica no Brasil é difícil de ser conhecida, pois a doença não é de notificação compulsória. Porém, é de senso comum que o leite de vacas com mastite ou os manipuladores envolvidos com a ordenha dos animais podem estar envolvidos na epidemiologia da doença¹⁶. Apesar de outros estafilococos também produzirem enterotoxinas, *S. aureus* mostra-se como o mais importante agente desencadeador das intoxicações estafilocócicas¹⁷. Existem em torno de 20 sorotipos antigênicos de toxinas em *S. aureus*¹⁸, que podem ser divididas em subtipos, de acordo com as suas características imunológicas e físico-químicas, como por exemplo a EEC¹⁹.

S. aureus foi identificado como participante na etiologia infecciosa da mastite bovina em todas as colheitas de amostras de leite que foram realizadas na propriedade, sempre como o mais prevalente quando comparado com outros micro-organismos identificados (dados não tabelados). Dentre as prevalências mensais, a maior foi encontrada em período imediatamente posterior a épocas em que ocorreram grandes quantidades de chuvas no local de estudo.

Na Tabela 1 foram distribuídas as estirpes de *S. aureus* isoladas, de acordo o local e o período em que foram obtidas.

Um total de 245 estirpes de *S. aureus* foram identificadas, dentre as quais 61,2% originaram-se de leite, 26,5% de óstios e 12,2% das teteiras. Dentre as estirpes investigadas, houve predominância das que se originaram de amostras de leite em ambos os períodos classificados de acordo com a ocorrência de chuvas, o “chuvoso” e o “seco” (63,2% e 58,7%, respectivamente). Por um outro

lado, ocorrências inferiores foram encontradas nas teteiras em ambos os períodos, com 13,2% e 11,0% dentre o total de isolados para os períodos “chuvoso” e “seco”, respectivamente. Apesar do número inferior de micro-organismos nas teteiras, em ambos os períodos estudados não foi verificada diferença significativa entre a quantidade de isolados nas diferentes origens pesquisadas, seja para a comparação feita entre leite e óstios ($P=0,2983$) como para a comparação dos valores encontrados para leite e teteiras ($P=0,8417$) e óstios e teteiras ($P=0,3809$).

O fato de ser encontrada uma maior quantidade de isolados no leite não necessariamente significa que esta fonte de transmissão do micro-organismo é a mais importante, uma vez que as relações epidemiológicas existentes entre o patógeno e o ambiente onde ele é encontrado são diferentes. Entretanto, a participação do hospedeiro, representado pelo animal em lactação e a sua capacidade de resposta à invasão e multiplicação do agente infeccioso na glândula mamária, tem um papel importante na epidemiologia da doença.

Tabela 1. *Staphylococcus aureus* identificados de acordo com a origem e o período de ocorrência de chuvas em propriedade leiteira da região de Campinas, SP.

Origem	Períodos de obtenção das amostras					
	Chuvoso		Seco		Total	
	n ¹	%	n	%	n	%
Leite	86	63,2	64	58,7	150	61,2
Óstios	32	23,5	33	30,3	65	26,5
Teteiras	18	13,2	12	11,0	30	12,2
Total	136	100,0	109	100,0	245	100,0

¹ Número de isolados.

Tabela 2. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com a amplificação dos genes e a ocorrência de chuvas.

Genes	Origem											
	Leite				Óstios				Teteiras			
	A ¹		B ²		A ¹		B ²		A ¹		B ²	
Genes	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
sea	6	50,0	10	62,5	4	66,7	8	66,7	2	40,0	5	83,3
seb	2	16,7	1	6,2	1	16,6	-	-	1	20,0	1	16,7
sec	-	-	3	18,8	-	-	2	16,6	1	20,0	-	-
tst	1	8,3	2	12,5	1	16,6	2	16,6	1	20,0	-	-
sed	1	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sea + sed	1	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
seb + tst	1	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	12	100,0	16	100,0	6	100,0	12	100,0	5	100,0	6	100,0

1. A: Estação chuvosa (índices pluviométricos máximos entre 76,3 mm e 193,8 mm, precipitação média de 113,6 mm);

2. B: Estação seca (índice pluviométrico máximo de 56,2 mm, com precipitação média de 27,9 mm).

A Tabela 2 apresenta a distribuição de *S. aureus* e a ocorrência dos genes de toxinas amplificados dentre os pesquisados (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst*), nos dois períodos classificados pela ocorrência de chuvas.

Todos os genes pesquisados foram amplificados em micro-organismos isolados em amostras de leite de maneira isolada e, em duas ocasiões, houve co-amplificação de *sea* com *sed* e *seb* com *tst*. Em micro-organismos isolados nas amostras de óstios e teteiras, *sed* não foi amplificado. O gene *sea* foi o de maior prevalência em todas as origens e nas duas estações climáticas, chuvosa e seca (35/57), porém nenhuma diferença estatística foi encontrada quando comparou-se a presença deste gene com a dos outros que foram identificados. Também observou-se que a maioria das estirpes em que se identificou genes de toxinas foram isoladas em amostras de leite de quartos mamários com a mastite (28/57), provavelmente pela maior quantidade de isolados estudados nesta fonte de transmissão.

Diferentemente dos achados contidos neste trabalho, existe relato de não detecção de *sea* em *S. aureus* oriundos de humanos, leite bovino mastítico ou leite do tanque, utilizando-se a ausência do gene para a defesa da tese de *S. aureus* em leite bovino ter uma baixa possibilidade de estar envolvido em intoxicações alimentares estafilocócicas²⁰. Do mesmo modo, outros autores²¹ defendem que estafilococos enterotoxigênicos parecem não ser encontrados com tanta frequência, após o acompanhamento que foi realizado em 20 propriedades e não serem encontrados estes micro-organismos em 15 delas, quando estudado o leite de quartos mamários com mastite ou do tanque de expansão dos estabelecimentos de produção leiteira. Houve relato²² de *S. aureus* que foram obtidos de amostras de leite de quartos mamários com mastite bovina, dentre os quais apenas quatro isolados (6,03%) co-amplificaram os genes *sea* e *seb*, enquanto dois (3,1%) foram positivas para o gene *sec*, em estudo que investigou estes três tipos de genes.

Apesar disso, outros trabalhos demonstram que a dificuldade em encontrar estafilococos produtores de toxinas ou que expressam genes para estas não é uma regra. Dentre 127 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, obtidas em 23 municípios do Estado de Minas Gerais, a TSST-1 foi a toxina mais produzida, sendo identificada em 60 amostras (47% do total), seguida pela SED (30%) e a SEB (19%)²³.

Ao ser estudada a codificação dos genes para enterotoxinas em amostras de leite de tanques de expansão

de cinco fazendas em Assis, Estado de São Paulo, *sea* foi o mais frequente (16/41,0%), seguido pelo *sec* (8/20,5%), *sed* (5/12,8%), *seb* (3/7,7%) e *see* (2/5,1%). Entre os genes codificadores para outras enterotoxinas, *seg* foi o mais frequentemente observado (11/28,2%), seguido pelo *sei* (10/25,6%) e por *seh* e *sej*, estes dois últimos com três ampliações (7,7%)²⁴. Os resultados encontrados na propriedade estudada demonstraram que 26 dentre o total de 28 cepas originadas do leite apresentaram somente um gene enterotoxigênico, um porcentual superior ao encontrado na região de Assis, São Paulo, 92,9% contra 64,1%.

O teste para os genes das enterotoxinas (*ent*) e TSST-1 (*tst*) foi realizado em 132 cepas de *S. aureus* e 90 isolados (68,2%) foram positivos para um ou dois genes. Dentre os isolados positivos, 61 (67,8%) o foram para *entA*, 30 (33,3%) para *entB*, 5 (5,6%) para *entC2* e 38 (42,2%) para *tst*. Além disso, 33 (36,7%) co-amplificaram os genes *entA* e *tst*. Nenhum dos 90 *S. aureus* conduziam os genes *entD* e *entE*²⁵.

Sugere-se uma relação entre a produção de TSST-1 e a severidade dos casos de mastite, devido a possibilidade desta representar um fator de virulência em casos mais graves da doença^{16,23}. Entretanto, é mais fácil tentar estabelecer esta relação com aferições do momento em que as amostras são obtidas, devido a dificuldade de obtenção de um histórico dos animais acometidos pela doença, já que, muitas vezes, as amostras de leite chegam para a análise laboratorial sem a descrição do processo infeccioso no animal, assim como dos sinais inflamatórios apresentados, caso existirem.

Van Leeuwen et al.²⁶ pesquisaram dez genes virulentos em amostras humanas e veterinárias. O gene codificador da proteína da síndrome do choque tóxico (*tst*) foi mais frequentemente encontrado entre amostras veterinárias ($P < 0,0001$) e, principalmente, nas amostras relacionadas com a mastite bovina ($P < 0,0001$), quando comparadas com amostras oriundas de humanos. No presente trabalho, *tst* foi encontrado em isolados de leite, óstios e teteiras (7/57) e co-amplificado com *seb* em um isolado originado de amostra de leite de quarto mamário com mastite.

A intoxicação causada por estafilococos pode ocorrer após o consumo de alimentos contaminados com os micro-organismos que podem produzir as toxinas, assim como depois do consumo de alimentos com as enterotoxinas já formadas. A questão representativa do risco à saúde da população é que as toxinas são

caracterizadas por resistirem à pasteurização. A intoxicação após a ingestão do alimento com a toxina apresenta um período de incubação que pode variar de 30 minutos até oito horas, em média duas a quatro horas. Entre os sintomas estão desde vômitos, diarreia e dores abdominais, até sudorese, cãibras, dores de cabeça, calafrios, redução da pressão arterial e até febre, na dependência da quantidade de toxina ingerida²⁷.

De acordo com o exposto no parágrafo anterior, mostra-se preocupante a presença de genes de enterotoxinas em fontes relacionadas com a cadeia epidemiológica da mastite bovina. Constante é a preocupação com o leite cru contaminado e a sua utilização na fabricação de queijos, um dos principais subprodutos originados do leite. Existem relatos de presença de *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos em queijo artesanal e industrial, supondo-se que o tratamento térmico do leite possa ser, em alguns casos, ineficiente ou que possa ocorrer contaminação após o tratamento, devido à manipulação ou contato com superfícies não sanitizadas²⁸.

Apesar de ser incerto o fato de todas as amostras gene-positivas poderem causar um processo de intoxicação alimentar, a existência destes genes em *S. aureus* é necessária para que estas amostras causem este processo²⁵. Dessa maneira, a técnica de PCR permite a detecção do potencial genético para a produção de enterotoxinas, o que a torna útil tanto como um teste de triagem como para a confirmação destas. Desde que o estudo relacionado com enterotoxinas estafilocócicas tenha uma razão epidemiológica, estafilococos gene-positivos para toxinas podem ser considerados produtores de toxinas quando a produção de toxinas *in vivo*, por exemplo durante a infecção, não pode ser conduzida²⁹.

Devido a importância destas toxinas em saúde pública e no setor alimentício, um eficiente teste de triagem para detectar a prevalência de amostras enterotoxigênicas é fundamental³⁰, não apenas no derivado lácteo processado mas também dentro da propriedade leiteira.

Situações como a presença do gene e a não produção de níveis detectáveis de toxinas podem ocorrer devido a um baixo nível de produção de enterotoxina, com limites de detecção não alcançados por um ensaio imunológico. Uma vez que a produção de enterotoxinas por estafilococos pode ser afetada pelas condições de crescimento usadas, como a quantidade de inóculo, temperatura, atividade de água e o pH, é possível que em algumas ocasiões as condições de cultura especificadas para o ensaio imunológico sejam subótimas para a expressão do gene. Por um outro

lado, os genes podem não ser expressos devido a mutações nas regiões de codificação ou regulatória²⁵.

Em períodos mais chuvosos, uma maior amplitude de genes foi encontrada em leite e teteiras, quando comparou-se com períodos de menor ocorrência de chuvas. Nos dois isolados em que foram co-amplificados genes, verificou-se que o período de obtenção foi o classificado como chuvoso (Tabela 2).

Concomitantemente ao estudo das toxinas, os perfis de resistência das cepas de *S. aureus* foi pesquisado e houve uma menor variabilidade dos perfis de resistência quando o gene presente era *sea*. Especificamente no caso deste gene, para cada 4,8 amostras, apareceu um perfil diferente de resistência aos antimicrobianos. Para o *seb*, encontrou-se um perfil diferente para cada 1,2 amostra e *sec* verificou-se um perfil diferente para cada 1,5 amostra. Com relação ao *tst*, foi encontrado um perfil diferente para cada 1,1 amostra.

O perfil de resistência à penicilina foi o mais encontrado, proporcionalmente, em amostras com o gene da toxina "A" (48,3%), seguindo-se *seb*, *tst*, e *sec* (33,3%, 25,0% e 16,7%, respectivamente), diferentemente de outros autores²¹ que relataram que todos os isolados com amplificação de *seb* apresentaram resistência a este princípio ativo. Por um outro lado, os achados desta pesquisa demonstraram que o perfil de sensibilidade a todos os princípios ativos testados foi superior para aquelas cepas em que foi amplificado *sec* (50%). Micro-organismos com o gene para TST foram aqueles que apresentaram o maior número de amostras com resistência à oxacilina (37,5%), enquanto para *sea*, *seb* e *sec* os percentuais variaram de 13,8 a 16,7%.

O estudo da correlação entre a produção de enterotoxinas e a resposta celular verificada pela CCS¹⁶ revelou que, quando estas eram detectadas, as amostras eram oriundas de quartos mamários com contagem superior a 1.000.000 células.mL⁻¹, sugerindo-a como um possível fator de virulência para este agente, apesar da ausência de diferença estatística após a análise dos valores, levando os autores a comentarem sobre a possível presença de outros fatores que podem interferir na contagem celular, além da capacidade de produção de toxinas por parte dos patógenos.

Efetou-se a contagem de células somáticas (CCS) do leite de 25 dentre 28 quartos mamários onde foram isolados *S. aureus* que expressaram genes para as toxinas. A CCS média do leite dos quartos com isolamento de *S. aureus* que expressaram *sea* foi de 551.000 células.mL⁻¹

(n=13), enquanto para aquelas cepas que expressaram *seb*, *sec* e *sed*, as CCS foram, respectivamente, 372.000 células.mL⁻¹ (n=3); 640.000 células.mL⁻¹ (n=3); e 4.050.000 células.mL⁻¹ (n=1). A CCS média foi igual a 1.085.000 células.mL⁻¹ para as cepas com expressão de *tst* (n=4) e 4.000.000 células.mL⁻¹ para a cepa que expressou os genes *seb* e *tst* em conjunto. Ao se dividir as CCS em quatro classes (até 200.000; 200.001 a 500.000; 500.001 a 750.000; >750.000 células.mL⁻¹), não houve diferença estatística (P=0,5498) ao ser comparada a CCS de acordo com a presença do gene. Apesar disso, mais estudos precisam ser realizados para a verificação da relação entre a CCS, uma medida da reação inflamatória da glândula mamária contra o invasão bacteriana, e as toxinas ou os seus genes.

Há uma grande controvérsia sobre o papel das enterotoxinas durante o processo infeccioso causado pelo *S. aureus* nos casos de mastite bovina. A *sec* e a *sed* parecem ser as mais importantes nas infecções intramamárias, já que induzem a liberação de fatores inflamatórios¹⁸. A indução destes fatores poderia levar a uma resposta mais acentuada por parte da glândula afetada e, conseqüentemente, acarretar uma CCS mais elevada. Apesar da pequena quantidade de quartos mamários acompanhados, no presente trabalho foi observado que a CCS daquelas glândulas em que foram isolados *S. aureus* com amplificação de *sec* e *sed* foi superior à CCS do leite das glândulas mamárias infectadas por micro-organismos que amplificaram *sea* e *seb*.

Quando foi analisada a associação entre genes de virulência de *S. aureus* e a presença de mastite subclínica, relatou-se o papel do gene *sej* como um dos fatores de risco. Isolados que abrigavam o gene *sej* também foram positivos para *sed*, sugerindo a possibilidade da virulência das amostras que albergam ambos os genes ser mais alta quando comparada à virulência das amostras que albergam somente o gene *sed*³¹

As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* podem estar relacionadas com o agravamento das doenças causadas pelo micro-organismo, além da sua habilidade de causar intoxicação alimentar. Neste sentido, já foram identificados isolados que produziram as enterotoxinas C e a TSST-1 em vacas que não conseguiram responder positivamente ao tratamento contra a mastite. Além disso, amostras bacterianas isoladas em glândula mamária bovina e que secretaram TSST-1, induziram a liberação de citocinas com o conseqüente estabelecimento de um processo inflamatório do tecido mamário ou a cronicidade da mastite. A triagem de enterotoxinas em isolados

bacterianos causadores de mastite nos animais em lactação pode ser de importância para estabelecer se amostras produtoras de enterotoxinas estão associadas com casos mais severos da doença ou com casos em que o tratamento não é eficaz, além da importância no contexto de saúde pública e segurança alimentar³².

Sugere-se que a produção simultânea de mais de uma toxina pode elevar os seus efeitos deletérios isolados e, conseqüentemente, atuar na patogenia das infecções intramamárias causadas por *S. aureus*. Por exemplo, resistência a mais de um antimicrobiano poderia existir em amostras produtoras de mais de um tipo de toxina³³.

A importância do estudo das características dos isolados de *S. aureus* em outras fontes, além do leite dos quartos mamários doentes, reside na possibilidade da existência de portadores de *S. aureus* que facilitam a transmissão dessas bactérias entre animais de um mesmo ambiente, inclusive pelas mãos do ordenhador e de utensílios destinados à ordenha, tais quais as teteiras³⁴. Quando há normas higiênicas de manejo de ordenha mal conduzidas, o papel de transmissão destes agentes pelos portadores torna-se preocupante.

CONCLUSÃO

A presença de genes de toxinas estafilocócicas em *S. aureus* isolados em diferentes fontes de transmissão dentro da cadeia epidemiológica da mastite bovina evidencia a possibilidade de veiculação deste micro-organismos pelo leite, ocasionando riscos à saúde pública.

AGRADECIMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 05/53856-3.

REFERÊNCIAS

1. Akineden O, Annemuller, C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschock M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diag Lab Immunol*. 2001; 8 (5): 959-64.
2. Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. *J Clin Microbiol*. 2004; 42 (8): 3449–55.

3. Zafalon LF, Langoni H, Benvenuto F, Castelani L, Broccolo CR. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Vet Zootec*. 2008;15(1):56-65.
4. Harmon RJ, Eberhart RJ, Jasper DE, Langlois BE, Wilson RA. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington (VA): National Mastitis Council; 1990.
5. Ingawa K, Adkinson R, Gough R. Evaluation of gel teat cleaning and sanitizing compound status of the goat udder. *J Dairy Res*. 1992; 59: 21-8.
6. McDonald J, Kinsel ML, Adams DS, Darlington R.L. Studying the effect of backflushing milking units. *Vet Med*. 1993; 88: 382-6.
7. CIIAGRO. Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.[acesso em 2006] Disponível em: <<http://ciiagro.iac.sp.gov.br/ciiagroonline/>>.
8. Holmberg O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Vet Scand*. 1973; 45: 1-144.
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins; 1994. p. 544-51.
10. Ferreira LM, Nader Filho A, Oliveira E, Zafalon LF, Souza V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. *Cien Rural*. 2006; 36 (4): 1228-34.
11. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 618-23.
12. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative *Staphylococci*. *Microbiol Immunol*. 2007; 51 (4): 381-90.
13. Bauer AW, Kirby WMM, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45: 493-6.
14. NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15th Informational Supplement. 2005, 25 (1): 177p.
15. SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
16. Sá MEP, Cunha MLRS, Elias AO, Langoni 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. *Braz Journal Vet Res Anim Sci*. 2004; 41 (5): 320-6.
17. Pereira ML, Pereira JL, Serrano AM, Bergdoll MS. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? *Hig Aliment*. 2000; 14 (68-69): 32-40.
18. Gómez C, Pinal L, Franco J, Carrillo JM, Ramírez J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A, B and C isolated from bovine mastitis in México. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007; 117: 249-53.
19. Silva WP, Gandra EA. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. *Hig Aliment*. 2004; 18 (122): 32-40.
20. Hata W, Katsuda K, Kobayashi H, Nishimori K, Uchida I, Higashide M et al. Bacteriological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Humans and Bulk Milk. *J Dairy Sci*. 2008; 91 (2): 564-9.
21. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J Food Microbiol*. 2007; 118:186-93.
22. Silva ER, Carmo LS, Silva N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet Microbiol*. 2005; 106:103-7.
23. Silva N, Cardoso HFT, Sena MJ, Carmo LS. Produção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino em Minas Gerais. *Revista Napgama* 1999; 2 (5):12-4.
24. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr A, Candeias JMG et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol*. 2008; 132: 408-13.
25. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. 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. *Arq Inst Biol*. 2006; 73 (2): 165-9.
26. Van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM, Sniijders SV et al. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2005; 187 (13): 4584-91.
27. Brabes KCS, Carvalho EP, Dionísio FL, Pereira ML, Garino Júnior F, Costa EO. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Napgama* 1999; 2 (3): 4-11.
28. Guedes Neto LG, Veras JF, Sena MJ, Cerqueira MMOP, Santos WLM, Souza MR et al. Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas de amostras de queijo de coalho produzidos em Pernambuco, Brasil. *Hig Aliment*. 2005; 19 (130) (encarte eletrônico).
29. Vieira-da-Motta O, Folly MM, Sakyiama CCH. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Braz J Microbiol*. 2001; 32:27-31.
30. 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. *Vet Microbiol*. 2007; 124:66-72.
31. Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathogen*. 2006; 40: 177-83.
32. Kenny K, Reiser RF, Bastida-Corcuera FD, Norcross NL. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1993; 31 (3): 706-7.
33. Fagundes, H, Oliveira, CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Cien Rural*. 2004; 34 (4): 1315-20.
34. Araújo WP. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1998; 35 (4): 161-5.