

DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS EM POOLS DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ENVOLVIDAS EM CASOS DE MASTITE BOVINA

Luciano Menezes Ferreira¹; Luiz Francisco Zafalon²; Viviane de Souza³; Poliana de Castro Melo³; Maria Izabel Merino de Medeiros³; Antonio Nader Filho⁴

¹Prof. do Curso de Medicina Veterinária, UNICASTELO, Descalvado-SP; ²Pesquisador EMBRAPA-Pecuária Sudeste, São Carlos-SP; ³Pós-graduanda em Medicina Veterinária Preventiva, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP; ⁴Prof. do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP. E-mail: ferreira_lm@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

De acordo com JARRAUD et al. (1999) e AKINEDEN et al. (2001), as estirpes de *S. aureus* patogênicos podem produzir enterotoxinas dos tipos A a E e G a J (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ), toxinas esfoliativas dos tipos A e B (ETA, ETB) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que são responsáveis por causar, em humanos, toxinfecções alimentares, alergias e até mesmo desordens multi-sistêmicas que podem levar à morte. Nos animais, de acordo com FERENS et al. (1998), a patogênese no úbere permanece obscura. No entanto, as toxinas superantigênicas parecem induzir imunossupressão em bovinos leiteiros.

O primeiro relato de detecção de TSST-1 produzida por *staphylococci* de origem animal foi feito por JONES & WIENEKE (1986). Estudos realizados com *S. aureus* isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina demonstraram que entre 20% e 77% dos isolados produziram TSST-1 e enterotoxinas estafilocócicas (KENNY et al., 1993; ICHIKAWA et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1998). Em tanques de expansão, utilizados para resfriamento e armazenamento de leite, 75,4% das amostras de *S. aureus* isoladas demonstraram capacidade de produzir essas toxinas (TAKEUCHI et al., 1998).

Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de verificar a ocorrência de estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica, capazes de produzir enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1).

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.

Com as 245 estirpes isoladas e identificadas bioquimicamente (HOLMBERG, 1973; HOLT et al., 1994) e genotipicamente (MARTINEAU et al., 1998), foram realizados pools de acordo com os sítios de isolamento e o momento da colheita, distribuídos durante o período de obtenção.

Devido à disponibilidade dos anti-soros específicos apenas para as enterotoxinas dos tipos A a D (SEA, SEB, SEC e SED) e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), estas foram produzidas de acordo com a técnica de membrana-sobre-água

PROCI-2008.00071

FER

2008

SP-2008.00071

Detecção de enterotoxinas em
2008 SP-2008.00071



17851-1

descrita por ROBBINS et al. (1974), a partir da utilização do método de placa de sensibilidade ótima (OSP - Optimum-Sensitivity Plate Method).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização da detecção de enterotoxinas de acordo com o método de membrana-sobre-ágar foram realizados, no presente estudo, 38 *pools* com as 245 estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica. Na Tabela 1 pode ser observado que, dos 38 *pools* realizados com as estirpes de *S. aureus*, 29 (76,3%) foram positivos quanto à produção de enterotoxinas e/ou da toxina da síndrome do choque tóxico.

Pode ser observado, ainda na Tabela 1, um número menor de *pools* com capacidade enterotoxigênica das estirpes isoladas do leite até os insufladores. No entanto, quando KENNY et al. (1993) estudaram estirpes, e não *pools*, detectaram, em *S. aureus* isoladas em casos de mastite bovina, 28,6% de estirpes com capacidade de produzir enterotoxinas.

Tabela 1 – Distribuição dos *pools* das estirpes de *S. aureus* submetidas à detecção de enterotoxinas estafilocócicas de acordo com os sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2005.

Origem	Total	Positivo	%
Leite	16	13	81,2
Óstio	13	10	76,9
Insufladores	9	6	66,7
Total	38	29	76,3

A Tabela 2 revela os padrões enterotoxigênicos encontrados de acordo com os tipos de enterotoxinas produzidas, das quais a toxina A apresentou a maior prevalência entre os *pools* estudados, quando considerado de forma particular (75,9%) ou em conjunto (100,0%). Em contrapartida, os tipos B, C e TSST-1 foram produzidos, em conjunto com o tipo A, em 2 (6,9%), 1 (3,4%) e 4 (13,8%) *pools* analisados, respectivamente.

Tabela 2 – Padrões enterotoxigênicos produzidos pelas estirpes de *S. aureus* de acordo com o número de *pools* capazes de produzi-las pelo método de placa de sensibilidade ótima (OSP), Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Padrão	Tipos de enterotoxinas	Total	
		Nº	%
2	A	4	13,8
3	A e B		
4	A e C		
	A e TSST-1		
Total		29	100

Entre as enterotoxinas clássicas SEA e SEE e a TSST-1, tem relevância nos casos de mastite bovina, as linhagens de *S. aureus* que apresentam os genes para as toxinas SEC e TSST-1, pois estas são associadas com severos casos de mastite clínica ou casos que não respondem à terapia com antibióticos (ZSCHÖCK et al., 2004). Na Alemanha, a associação dos genes *sec* e *tst* em linhagens de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina também foi observada por SALASIA et al. (2004) havendo, segundo estes autores, uma variação geográfica de linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicos. Em contrapartida, neste estudo, nenhuma estirpe apresentou amplificação em conjunto dos genes *sec* e *tst*. O gene da síndrome do choque tóxico foi encontrado em associação com o gene *seb* apenas em uma estirpe, representando 1,7% dos isolados.

CONCLUSÃO

Grande parte dos *pools* realizados com as estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica apresentou capacidade enterotoxigênica. Dentre os *pools* realizados com as estirpes de *S. aureus* envolvidas nos casos de mastite bovina, a toxina A apresentou a maior prevalência, fato este importante 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

- AKINEDEN, Ö. et al. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. Clin. Diagn. Labor. Immunol., v. 8, n. 5, p. 959-964, 2001.
- 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.
- ICHIKAWA, M., ICHIKAWA, T., MIZOMOTO, T. Productivity of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1, and coagulase type of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovines and humans in the same district. Anim. Sci. Technol., v. 67, p. 780-786, 1996.
- FERENS, et al. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. Infect. Immun., v. 66, p. 573-580, 1998.
- JARRAUD, S. et al. Involvement of Enterotoxins G and I in Staphylococcal Toxic Shock Syndrome and Staphylococcal Scarlet Fever. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 37, n. 8, p. 2446-2449, 1999.
- JONES, T.O.; WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. Vet. Rec., v. 119, p. 435, 1986.
- KENNY, K. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 31, n. 3, p. 706-707, 1993.
- MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., v. 36, p. 618-623, 1998.
- ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Microbiol., v. 28, p. 946-50, 1974.
- SALASIA, S. I. O. et al. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse en Germany. J. Vet. Sci., Korea, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2004.
- TAKEUCHI, S., ISHIGURO, K., IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. Vet. Microbiol., v. 59, p. 251-258, 1998.
- ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst* gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. Letters in Applied Microbiology, United Kingdom, v. 38, p. 493-498, 2004.