

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES PARA ENTEROTOXINAS, PELA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX, EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA NA ZONA DA MATA MINEIRA

(Evaluation of the presence of staphylococcal enterotoxin genes, by multiplex PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis from the Mata Mineira Zone)

Ângelo, F. F.¹
Arcuri, E. F.²
Andrade, N. J.³
Merhi, C.M.⁴
Lange,C.C.²

RESUMO

A mastite bovina é uma das principais causas de perdas econômicas e tecnológicas em todo o mundo, causada por um grande grupo de microrganismos, sendo *Staphylococcus aureus* os mais prevalentes. Alguns *S. aureus* estão relacionados com a produção de enterotoxinas (SE), podendo causar casos graves de gastroenterites, inclusive o óbito. Neste trabalho avaliou-se a presença de genes de enterotoxinas clássicas e novas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sel*), além da presença do gene *femA* em 50 *S. aureus* isolados de mastite bovina, utilizando-se a técnica de PCR multiplex (PCRm). Observou-se que dentre as estirpes avaliadas, todas possuíam o gene *femA*, identificando-as molecularmente como *S. aureus*. Nove estirpes apresentaram gene para pelo menos uma das novas enterotoxinas. Entretanto, os genes para as enterotoxinas clássicas (*sea-see*) não estiveram presentes em nenhuma das estirpes. A presença dos genes para as enterotoxinas novas indica o potencial enterotóxico das estirpes de *S. aureus* analisadas e a necessidade de estudos associando a presença do gene com a produção de enterotoxinas e seu potencial em causar doenças.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, mastite, enterotoxinas estafilocócicas, PCR multiplex

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um importante patógeno da mastite bovina clínica e subclínica, e que pode ser transmitido facilmente de animal para outro dentro de um rebanho. Esta doença tornou-se uma das mais prevalentes dentro do gado leiteiro em todo o mundo, levando a prejuízos econômicos ao produtor e a perda da qualidade do leite. Este fato associado à capacidade de *S. aureus* produzir diferentes fatores de virulência e toxinas extracelulares,

contribui para sua alta patogenicidade (Bramley et al., 1996; Boerema, 2006; Srinivasan et al., 2006).

A capacidade em produzir enterotoxinas (SE), torna esse microrganismo de extrema relevância para a indústria de alimentos, uma vez que essas substâncias de natureza termoestável são consideradas como uma das causas mais prevalentes de gastroenterites em todo o mundo. Além disso, possuem alto potencial patogênico.

1 Estagiária Embrapa Gado de Leite Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV

2 Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

3 Professor Titular do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV

4 Estagiária Embrapa Gado de Leite, Graduanda em Medicina Veterinária, UNIPAC
email: fabiolangelo@yahoo.com.br

A TÉCNICA DE MASTITE BOVINA NA multiplex PCR in Mineira Zone)

Ángelo, F. F.¹
Arcuri, E. F.²
Andrade, N. J.³
Merhi, C.M.⁴
Lange, C.C.²

gicas em todo o *coecus aureus* enterotoxinas. Neste trabalho *sec*, *sed*, *see*, dos de mastite que dentre as mente como *S. aureus* enterotoxinas, presentes em éica o potencial dos associando a usar doenças. oécicas, PCR

ogenicidade (Bramley 06; Srinivasan et al.,

produzir enterotoxinas anismo de extrema relevância para alimentos, uma vez que a ureza termoestável são ma das causas mais erites em todo o mundo. to potencial patogênico.

tos, UFV

uma vez que em pequenas quantidades já são capazes de causar intoxicação, inclusive o óbito (Boerema, 2006; Carmo et al., 2002; Srinivasan et al., 2006).

Cinco classes de enterotoxinas denominadas clássicas são atualmente conhecidas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), no entanto novas enterotoxinas têm sido reconhecidas ao longo dos últimos anos, incluindo SEG, SEH, SEK, SEI, SEJ, SEL, SEM, SEN e SEO.

A técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) permite identificação rápida e acurada dos genes dessas enterotoxinas. Estudos relatando a produção das enterotoxinas clássicas produzidas por *S. aureus* isolados de mastite vem sendo realizados, porém poucos são os trabalhos que relatam a presença de genes para a produção das enterotoxinas novas. Além disso, a maior parte dos estudos tem priorizado as enterotoxinas produzidas por *S. aureus* isolados de amostras clínicas humanas e poucos estudos têm direcionado para os isolados de amostras clínicas animais e alimentares (Boerema, 2006; da Silva et al., 2005). O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de genes que codificam enterotoxinas clássicas e novas enterotoxinas, pela técnica PCR multiplex, que avalia simultaneamente a presença de mais de um gene.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinquenta estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite clínica bovina pertencentes ao Banco de Culturas da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG, foram avaliadas para a produção de enterotoxinas clássicas e as novas enterotoxinas, além da avaliação da presença do gene *femA* para a confirmação molecular de que todas as amostras eram realmente *S. aureus*. Para isso utilizou-se a técnica de PCR multiplex. Os isolados pertenciam a dez propriedades localizadas na Zona da Mata Mineira, sendo aproximadamente cinco isolados por propriedade.

A ativação desses microrganismos foi realizada por técnicas microbiológicas tradicionais, onde inicialmente os isolados foram inoculados em ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubados por 24-48 horas. Após esse período, procedeu-se a extração de DNA das culturas puras de *S. aureus*, segundo Chen et al. (2001). Culturas inoculadas em 3,0 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubadas a 35°C durante 24 horas foram utilizadas para a preparação do DNA.

As reações foram conduzidas como já descrito por Arcuri et al. (2006): para o gene

femA, foram utilizados os primers descritos por Mehrotra et al. (2000); para o gene *sel*, foram utilizados os primers descritos por Cremonesi et al. (2005) e para os demais genes (*sea* a *sei*) foram utilizados os primers descritos por Rosec e Giraud (2002). Cada amplificação foi conduzida em um volume de 50 µl contendo 1X PCR buffer, 2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U de enzima Ampliteq DNA polimerase, 40 pmol de cada primer para *femA* e *sel*, 20 pmol de cada primer para os demais genes (*sea*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sel*), 100 ng de DNA bacteriano e água MilliQ para completar o volume de 50 µl. A amplificação do DNA foi feita utilizando-se cinco reações, cada uma com dois pares de primers (*seg* e *femA*, *sel* e *sei*, *seh* e *sel*, *sea* e *sec* e *see*).

Amostras de genótipo conhecido (padrão) foram utilizadas como controles positivos para os diferentes genes de enterotoxinas.

Todas as amplificações foram feitas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) programado para um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturação a 94°C/30seg. - anelamento a 57°C/30 seg. - extensão a 72°C/30seg.), com o término da reação a 72°C/10minutos.

Os produtos resultantes da amplificação foram analisados em eletroforese em gel de agarose (1,8%), após coloração com brometo de etidio. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentador Eagle Eye Stratagene Co.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras foram identificadas como *S. aureus*, uma vez que todas elas apresentaram o gene *femA*.

Dentre as 50 estirpes avaliadas para a presença dos genes de enterotoxinas (Tabela 1), nove (18%) foram positivas para pelo menos um gene. Desses nove estirpes, quatro (8%) foram positivas apenas para *seg*, uma (2%) apenas para *seh* e uma outra (2%) apenas para *sei*. Três (6%) foram positivas para dois genes simultaneamente, sendo duas (4%) para *seg* e *sei*, uma (2%) para *seh* e *sel*. Nenhum gene de enterotoxina clássica (*sea-sed*) foi identificado, resultados semelhantes foram obtidos por Srinivasan et al. (2006), que também não obtiveram resultados positivos para os genes *sea*, *sec* e *see*.

Em relação ao gene *seg*, os resultados deste estudo (12% de estirpes positivas) assemelham-se aos relatados por Zschock et al. (2005), que encontraram 11,5% de *S. aureus* isolados de mastite positivos para *seg*.

Tabela 1 - Detecção de genes de enterotoxinas em 50 *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, por PCR.

Genes de enterotoxinas estafilocóicas	Número de estirpes positivas (%)
se positivas	9 (18%)
Apenas seg	4 (8%)
Apenas seh	1 (2%)
Apenas sei	1 (2%)
Apenas sel	0 (0%)
seg e sei	2 (4%)
seh e sel	1 (2%)
Genes de enterotoxinas clássicas (<i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i>)	0 (0%)

Estudos anteriores revelaram a intensa variação geográfica de genes de enterotoxinas presentes em *S. aureus* isolados de mastite bovina (Stephan *et al.*, 2001). A análise de estípites isoladas apenas de propriedades localizadas na Zona da Mata Mineira pode explicar o fato nenhum gene de enterotoxina clássica ter sido identificado no presente trabalho, embora estudos anteriores tenham revelado a presença destes genes em *S. aureus* de mastite bovina (da Silva *et al.*, 2005).

Os resultados enfatizam a necessidade de estudos mais amplos sobre a presença e a expressão dos genes de enterotoxinas, principalmente se for levada em conta o grande problema de *S. aureus* nos rebanhos bovinos brasileiros e a natureza termoestável das toxinas produzidas, fatores que contribuem para o aumento dos riscos de intoxicação alimentar.

CONCLUSÃO

Neste estudo os resultados revelam a presença de genes para as novas enterotoxinas em *S. aureus* isolados de mastite bovina. Observou-se a presença de mais de um gene para um mesmo isolado de *S. aureus*. Os resultados indicam a necessidade de se ampliar os estudos para as novas enterotoxinas presentes em *S. aureus* isolados de mastite bovina abrangendo uma maior área geográfica no Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG pelo apoio financeiro. À Fundação Oswaldo Cruz/INCQS e ao Dr. Jean Philippe Rosec (Laboratoire Interregional de la DGCCRF, France) pela doação das estípites padrão de *Staphylococcus* enterotoxigenicos. Ao LABEX

França por ter viabilizado a importação de algumas estípites padrão.

ABSTRACT

The bovine mastitis is the principal cause of economic and technological loss worldwide. Mastitis is caused by a great variety of microorganisms, being *Staphylococcus aureus* the prevalent. Some *S. aureus* can produce enterotoxins (SE) and cause acute gastroenteritis, even death. This study aimed to evaluate the presence of the classic and new staphylococcal enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* and *sel*) and the presence of the *femA* gene in 50 *S. aureus* isolated from bovine mastitis, by multiplex PCR. It was verified that all the strains had the *femA* gene, identifying them as *S. aureus*. Nine strains presented one or more new enterotoxin gene. But, the classic enterotoxin genes (*sea-see*) were not present in any strain. The presence of the new staphylococcal enterotoxin genes indicate the enterotoxigenic potential of the *S. aureus* strains analyzed and the necessity to extend the studies of the presence and expression of the enterotoxin genes.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, mastitis, Staphylococcal enterotoxins, multiplex PCR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcuri, E. F.; Paula, G. B.; Borges, M. F.; Lange, C. C.; Brito, J. R. F. PCR multiplex para identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigenicos. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2. 2006, Anais. Goiânia: SBQL, 2006. 3p. CD.
- Boerema, J. A.; Clemens, R.; Brightwell, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 107, p. 192-201, 2006.
- Bramley, A. J.; Cullor, J. S.; Erskine, R. J.; Fox, L. K.; Harmon, R. J.; Hogan, J. S.; Nickerson, S. C.; Oliver, S. P.; Smith, K. L.; Sordillo, L. M. Current concepts of bovine mastitis. 4 ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p.
- Carmo, L.S.; Dias, R. S.; Linardi, V. R.; Sena, M. J.; Santos, D. A.; Faria, M. E.; Pena, E. C.; Jett, M.; Hencine, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. *Food Microbiol.*, v.19, p.9-14, 2002.

Chen, T.R.; Hsiao, Y. Development and investigation of types of *Staphylococcus* from food-borne *Microbiol.*, v. 71, Cremonesi, P.; Morandi, S.; Lodi, D.; Caramenti, G. Development of a identification of enterotoxigenic *S. aureus* in dairy products. *Milk*, v. 305, 2005.

Da Silva, E. R. Detection of the *femA* gene in *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis in Brazil. *Food Microbiol.*, v. 106, p. 103-107.

Mehrotra, M.; Bhattacharya, T. Multiplex PCR detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1 and coagulase genes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 302-305, 2001.

DETERMINAÇÃO ESTIMATIVA

Determination Estimativa

Foi avaliada amostras de

- 1 Acadêmica da Escola de Enfermagem
2 Professor EMV/UFSC
3 Médico Veterinário
4 Biólogo EMV/UFSC

ANAI'S DO XXIV CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS

- portação de algumas
- he principal cause
al loss worldwide.
great variety of
Staphylococcus aureus the
aureus can produce
acute gastroenteritis,
ed to evaluate the
new staphylococcal
sec, sed, see, seg,
esence of the *femA*
ated from bovine
It was verified that
A gene, identifying
ains presented one
ne. But, the classic
were not present in
nce of the new
genes indicate the
of the *S. aureus*
cessity to extend the
d expression of the
- Staphylococcus aureus*.
terotoxins, multiplex
- Chen, T.R.; Hsiao, M. H.; Chiou, C. S.; Tsen, H. Y. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, p. 63-70, 2001.
- Cremonesi, P.; Luzzana, M.; Brasca, M.; Morandi, S.; Lodi, R.; Vimercati, C.; Agnelli, D.; Caramenti, G.; Moroni, P.; Castiglioni, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cel. Probes*, v. 19, p. 299-305, 2005.
- Da Silva, E. R.; Carmo, L. S.; da 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.*, v. 106, p. 103-107, 2005.
- Mehrotra, M.; Wang, G.; Johnson, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin I, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.
- Rosec, J.P.; Guiraud, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 77, p. 61-70, 2002.
- Srinivasan, V.; Sawart, A. A.; Gillerpie, B. E.; Headrick, S. I.; Ceasaris, L.; Oliver, S. P. Characterization of enterotoxin and toxic shock syndrome genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *NMC Annual Meeting Proceedings*, 2006.
- Stephan, R.; Annemuller, C.; Hassan, A. A.; Lammier, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.*, v. 78, p. 373-382, 2001.
- Zschock, M.; Kloppert, B.; Wolter, W.; Hamann, H. P.; Lammier, C. Pattern of enterotoxin genes *seg, seh, sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, v. 108, p. 243-249, 2005.



DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ANTIBIÓTICOS EM LEITES PASTEURIZADO TIPO "C" E ESTERILIZADO, COMERCIALIZADO NA CIDADE DE SALVADOR-BA

Determination of antibiotic residues in milk pasteurizado" C "and esterilizado type", commercialized in the city of Salvador-Ba

Iris Gabriela Figueiredo de Oliveira¹
Maria Helena Silva²
Nelson Carvalho Delfino³
Nilton Manuel de Jesus⁴

RESUMO

Foi avaliado a presença de resíduos de antibióticos em 42 amostras de leite sendo 24 amostras de leite UHT de oito marcas comerciais e 18 amostras de leite pasteurizado

¹ Acadêmica da EMV/UFBA.
² Professor EMV/UFBA
³ Médico Veterinário
⁴ Biólogo EMV/UFBA

REVISTA DO
INSTITUTO DE LATICÍNIOS
“CÂNDIDO TOSTES”

ANAIS DO
XXIV
CONGRESSO
NACIONAL
DE
LATICÍNIOS

Dairy Journal Bimonthly
Published By THE "Cândido
Tostes" Dairy Institute

Nº 377 JUIZ DE FORA, JUL/AGO DE 2007, VOL. 62

GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS
SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS
CENTRO TECNOLÓGICO
Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”