

MILENA DA SILVA ALBUQUERQUE

**PESQUISA DE GENES TOXIGÊNICOS EM ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS NA
MICRORREGIÃO GARANHUNS, ESTADO DE PERNAMBUCO**

GARANHUNS

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

MILENA DA SILVA ALBUQUERQUE

**PESQUISA DE GENES TOXIGÊNICOS EM ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS NA
MICRORREGIÃO GARANHUNS, ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Coorientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

GARANHUNS

2014

Ficha catalográfica

A345p Albuquerque, Milena da Silva
 Pesquisa de genes toxigênicos em isolados
 de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de vacas
 na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco / Milena
 da Silva Albuquerque. – Recife, 2014.
 56 f. : il.

 Orientador: José Wilton Pinheiro Junior.
 Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de
 Ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
 Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, 2014.
 Referências.

 1. Enterotoxinas 2. Leite 3. Genes I. Pinheiro Junior,
 José Wilton, orientador II. Título

CDD 636.208926

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES

**PESQUISA DE GENES TOXIGÊNICOS EM ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE LEITE DE
VACAS NA MICRORREGIÃO GARANHUNS, ESTADO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação elaborada por
MILENA DA SILVA ALBUQUERQUE

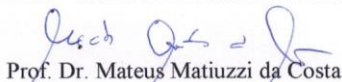
Aprovada em 17/12/2014

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Presidente da Banca – Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE



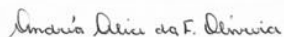
Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)



Prof. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)



Prof. Dra. Andrea Alice da Fonseca Oliveira

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Eliane e Olavo,
e ao meu marido Lucas, que
nunca me abandonaram,
sobretudo nos momentos mais
difíceis.*

Dedico e Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me prover a felicidade de cumprir mais esta etapa, e por projetar meus novos passos ao longo do meu caminho.

Aos meus pais, Eliane e Olavo, por terem sido as peças fundamentais para que eu chegasse aonde cheguei e por sempre acreditarem na minha capacidade.

Ao meu marido Lucas, que sempre me ajudou e me deu forças para seguir em frentenas minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Elivane e Francimar, e a todos os meus familiares.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), pela oportunidade.

Ao professor José Wilton Pinheiro Junior, pela confiança e também pela orientação, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório da UAG: Érica, Júnior, Mário, Fernando, Gésika, Pollyanne, Saruanna e Julianapor terem me ajudado bastante durante o período de realização da pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf-Petrolina: Renata, Márcia, Ruan, Jennifer, Ceixa, Naedja, Gisele e Prof. Mateus, pelo apoio prestado durante o tempo em que estive no laboratório e pela amizade conquistada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes- UFRPE, por terem contribuído para a minha evolução acadêmica e pessoal.

E, por fim, a todos que influenciaram direta e indiretamente para este momento especial da minha vida. Hoje festejo uma conquista muito importante e, durante esses dois anos, cada momento, seja ele de alegria, angústia, persistência, insegurança, estarão eternamente na minha memória. Agradeço a todos!

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho pesquisar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb*, *sec* e *seg*) e do gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) a partir de isolados de *Staphylococcus aureus* procedentes de casos de mastite bovina na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco. Foram analisados 93 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, provenientes de 17 propriedades localizadas em 11 municípios da microrregião Garanhuns, no estado de Pernambuco. Para a caracterização molecular da espécie *Staphylococcus aureus*, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) visando a identificação pela presença do gene *nuc*, assim como para a caracterização molecular das Enterotoxinas Estafilocócicas e da toxina da Síndrome do Choque Tóxico. Foram identificados os genes específicos *sea*, *seb*, *sec*, *seg* e *tst*. Dos 93 isolados analisados, observou-se a presença de genes enterotoxigênicos em 20 (21,6%) amostras, das quais 11 (55,0%) foram positivas para o gene *tst*, sete (35,0%) para o gene *sec*, duas (10,0%) para o gene *seg*. Dentre os 20 isolados que amplificaram segmentos para a presença dos genes *sec*, *seg* e *tst*, 16 (80,0%) foram positivos apenas para um gene e quatro (20,0%) foram positivos para dois genes (*sec* e *tst*). Das 17 propriedades estudadas, sete (41,2%) apresentaram amostras positivas para pelo menos um dos genes *sec*, *seg* e *tst*. Este foi o primeiro registro de ocorrência do gene codificador da toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite de vacas com mastite no estado de Pernambuco. Como houve uma variação na distribuição dos genes *sec*, *seg* e *tst* nas cepas procedentes de diferentes propriedades, pode-se inferir que há uma variação genotípica nas cepas de *S. aureus* que causam mastite bovina.

Palavras-chave: Enterotoxinas, genes, leite

ABSTRACT

The objective of this work was to investigate the occurrence of encoding staphylococcal enterotoxin (*sea*, *seb*, *sec* and *seg*) genes and the toxin gene 1 of Toxic Shock Syndrome (*tst*) from *Staphylococcus aureus*, coming from mastitis cases bovine in the micro region of Garanhuns, State of Pernambuco. 93 isolates from *Staphylococcus aureus* were analyzed, which were obtained from milk samples from cows with clinical mastitis and subclinical from 17 properties in 11 municipalities of the Micro Region of Garanhuns, State of Pernambuco. For the molecular characterization of the species *Staphylococcus aureus*, one of the Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed in order to identify the presence of the *nuc* gene, and to the molecular characterization of enterotoxins, and Staphylococcal toxin Toxic Shock Syndrome. Specific genes were identified: *sea*, *seb*, *sec*, *seg* and *tst*. 93 genes were analyzed and we observed the presence of enterotoxigenic gene in 20 (21.6%) samples, of which 11 (55.0%) were positive for *tst* gene, seven (35.0%) for the *sec* gene two (10.0%) for the *seg* gene. 20 isolates amplified segments to the presence of the *sec*, *seg* and *tst* genes. 16 of these (80.0%) were positive for only one gene, and four (20.0%) were positive for both genes (*tst* and *sec*). 17 properties were studied, of which seven (41.2%) had positive cultures for at least one of the genes *sec*, *seg* and *tst*. This was the first hit record of encoding gene of the toxin of toxic shock syndrome in mastitis cows milk samples in the state of Pernambuco. Since there was a variation in the distribution of *sec*, *seg* and *tst* genes in strains from different property, it can be inferred that there is genotypic variation in *S. aureus* strains that cause bovine mastitis.

Keywords: Enterotoxins, genes, milk

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 – Pesquisa de genes para as enterotoxinas estafilocócicas em isolados de *Staphylococcus aureus* procedentes de amostras de leite bovino realizados no Brasil 19

Artigo

Tabela 1- Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estudados 47

Tabela 2- Pesquisa de genes toxigênicos em cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco. 48

Tabela 3- Presença dos genes *sec*, *seg* e *tst* em cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de amostras de leite em propriedades da microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco 49

Tabela 4- Comparação dos resultados do teste da caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT) com a ocorrência dos tipos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas amplificados 50

Tabela 5: Associação entre a produção ou não da enzima coagulase em relação ao tipo de enterotoxina estafilocócica produzida a partir de isolados de *Staphylococcus aureus* 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_w: Atividade de água

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EE: Enterotoxina Estafilocócica

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FRI: Instituto de Investigação Alimentar

Kb: Kilobases

KDa: KiloDalton

pb: Pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Pg: Picograma

pH: Potencial Hidrogeniônico

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP: *Staphylococcus* coagulase positiva

se: Gene para enterotoxinas estafilocócicas

sea-see: Gene para enterotoxinas estafilocócicas de A-E

seg-ser: Gene para enterotoxinas estafilocócicas de G-R

seu-sev: Gene para enterotoxinas estafilocócicas de U-V

SEs: Staphylococcal Enterotoxins

SEIs: Proteínas semelhantes às enterotoxinas

SEA-SEF: Staphylococcal Enterotoxins de A-F

SEG-SER: Staphylococcal Enterotoxins de G-R

SEU-SEV: Staphylococcal Enterotoxins de U-V

TSST-1: Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico

tst: Gene para a toxina-1 da síndrome do choque tóxico estafilocócico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Importância e Etiologia da Mastite Bovina	14
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.3. Enterotoxinas Estafilocócicas (EE)	17
3.4. Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)	18
3.5. Detecção de Genes de Enterotoxinas Estafilocócicas pela Utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	19
4. ARTIGO CIENTÍFICO	30
5. REFERÊNCIAS	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7. ANEXO. Normas para publicação no periódico <i>Journal of Dairy Science</i>	53

1 INTRODUÇÃO

A mastite, processo inflamatório da glândula mamária, é uma das doenças que causam maior impacto para a bovinocultura em termos de perdas econômicas de ocorrência mundial (KUMAR et al., 2010). Devido ao envolvimento de vários agentes etiológicos, sempre se manteve como um desafio para o médico veterinário (VASHNEY et al., 2012).

A mastite bovina ocasiona prejuízos tais como custos com o diagnóstico, medicamentos, mão de obra, descarte de leite, entre outros (SANTOS; TOMAZI; GONÇALVES, 2011). Em 2012, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) apontou que cerca de 43,6% dos custos da produção estão relacionados à sanidade do rebanho e à qualidade do leite, o que é considerado alto em comparação às despesas com mão de obra (15,65%), produção e compra de alimento (32,65%) (SIQUEIRA; ZOCCA, 2012).

Staphylococcus aureus é a principal espécie gram-positiva causadora de mastite bovina e possui a capacidade de produzir toxinas, que são proteínas provenientes do interior da célula do micro-organismo, decorrentes de sua multiplicação e metabolismo, tendo como exemplo as enterotoxinas estafilocócicas e a toxina da síndrome do choque tóxico, que são classificadas como superantígenos, ou seja, são capazes de estimular uma resposta policlonal inespecífica de linfócitos T, além de um aumento na liberação de citocinas, causando uma grande supressão do sistema imune adaptativo (XU; MCCORMICK, 2012).

O *Staphylococcus aureus* é considerado um dos micro-organismos mais comumente associado às infecções intramamárias de bovinos que ocorre mundialmente, sendo também o agente que frequentemente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (VASUDEVAN et al., 2003; COSTA, 2008). No Brasil, *S. aureus* é caracterizado como sendo o principal agente causador da mastite bovina, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,2% (COSTA, 2008).

As enterotoxinas são responsáveis por alguns tipos de infecções em humanos e animais, além de causar intoxicações alimentares. Com a função de inibir o sistema imunológico do hospedeiro, acaba contribuindo com o desenvolvimento da patogênese da mastite (ARGUDÍN, MENDOZA, RODICIO, 2010). A patogenicidade do microorganismo está vinculada à produção de fatores de virulência, colaborando, desta forma, com a invasão tecidual e com a resistência a determinados antibióticos (KIM et al., 2012).

Diversos métodos podem detectar as toxinas estafilocócicas, tais como: ensaio imunoenzimático (ELISA), imunodifusão, radioensaio e aglutinação em látex, que são métodos com sensibilidade e especificidade limitados à obtenção de quantidades detectáveis de toxinas e podem variar significativamente com a pureza dos reagentes (ISMAIL; DICKINSON, 2010).

Métodos baseados na amplificação de DNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) podem demonstrar a presença de linhagens de *S. aureus* toxigênicas antes da expressão das toxinas, com base nas sequências específicas dos genes e dessa forma detectarem a fonte potencial de infecção (HOLECKOVÁ et al., 2002).

O município de Garanhuns é conhecido como a Bacia Leiteira do Estado de Pernambuco, pois detém uma produção artesanal, semiartesanal e industrial de laticínios, sendo de grande importância para a economia do Agreste Meridional do Estado. Desta forma, identificar a ocorrência de enterotoxinas em isolados de *S. aureus* procedentes de vacas com mastite é de fundamental importância para a região, uma vez que o conhecimento dos fatores de virulência de *S. aureus* fornece informações importantes para o estabelecimento de estratégias efetivas de controle e prevenção da mastite bovina, além de auxiliar na prevenção de toxinfecções alimentares.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Conhecer o perfil genético dos isolados de *Staphylococcus aureus* com relação aos genes toxigênicos na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco.

2.2 Específicos

- Caracterizar fenotipicamente e geneticamente isolados de *Staphylococcus aureus*;
- Pesquisar a presença de genes que codificam as enterotoxinas (*sea*, *seb*, *seceseg*), e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*).
- Analisar os achados dos isolados codificadores de genes toxigênicos com o tipo de diagnóstico de triagem para mastite e número de genes por isolados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Importância e etiologia da mastite bovina

A ocorrência de mastite nos rebanhos bovinos determina perdas econômicas elevadas, principalmente quando são detectados casos clínicos, ocasionando alterações quantitativas e qualitativas no leite (redução em cálcio, fósforo, proteína e gordura, aumento em sódio e cloro) e, além disso, o uso indiscriminado de antibiótico no tratamento da mastite é uma preocupação para a indústria de laticínios e para a saúde pública (TOZZETTI; BATAIER; ALMEIDA, 2008; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2012). Essa enfermidade acarreta aumento nas despesas com assistência veterinária, medicamentos e substituição de fêmeas decorrente da redução de sua vida útil pela perda da glândula mamária comprometida e consequente desvalorização comercial do animal (FREITAS et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

Apesar de a mastite possuir origem pluri-etiológica, pode ser classificada também quanto à sua manifestação clínica, em clínica e subclínica. As duas manifestações podem ter como origem o mesmo agente etiológico, mas a mastite clínica é caracterizada pela ocorrência de inflamação do úbere, redução na produtividade e alteração na composição do leite, perda de apetite e de peso, febre e depressão. Enquanto a mastite subclínica possui apenas alterações físico-químicas e microbiológicas no leite, não sendo observados sinais clínicos. Pode-se concluir que a mastite bovina é uma doença de difícil diagnóstico, devido à sua manifestação ser silenciosa e crônica (ISMAIL; DICKINSON, 2010).

Diversas espécies de micro-organismos foram identificadas como sendo os agentes causadores de mastite bovina. Dentre as mais comumente isoladas estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (HOLTENIUS et al., 2004).

O principal gênero responsável pelo desenvolvimento de mastite subclínica é o *Staphylococcus* spp. (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). A participação da espécie *Staphylococcus aureus*, um patógeno que pode ser rotineiramente encontrado no leite de

bovinos, merece destaque como importante espécie causadora de mastite contagiosa (BANDOCH; MELO, 2011).

S. aureus é capaz de produzir uma imensa variedade de fatores de virulência, que podem estar associados à parede bacteriana ou serem secretados, dentre eles, estão: toxinas superantigênicas, enzimas, citotoxinas, exotoxinas e toxinas esfoliativas, cuja função principal é transformar os componentes do hospedeiro em nutrientes para o crescimento bacteriano. Desta forma, elas acabam contribuindo com a patogenicidade, sendo responsáveis pelos sinais clínicos e a severidade de infecções subclínicas e crônicas (VASCONCELOS et al., 2011).

3.2. *Staphylococcus aureus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae* e compreendem diversas espécies e subespécies, possui a capacidade de ter uma distribuição universal, vivendo comensalmente na pele e mucosas, especialmente a região nasofaríngea de mamíferos e aves (ATANASSOVA et al., 2001).

Apresentam forma de cocos e quando visualizadas ao microscópio, apresentam-se isoladas ou agrupadas semelhantes a cachos de uva. São gram positivas, possuindo diâmetro que varia entre 0,5 e 1,5µm, são imóveis e não formam esporos. Possui metabolismo fermentativo e respiratório, produzindo desta forma, a catalase (VARNAN e EVANS, 1991; KLOOS e BANNERMAN, 1999). Essa bactéria não possui exigências nutricionais e ambientais específicas, podendo crescer em ambiente com atividade de água (A_w) de até 0,86, pH 4,8 e temperatura mínima de 8 a 9 °C (NORMANNO et al., 2005).

O gênero *Staphylococcus* pode ser dividido, de acordo com a produção da enzima coagulase, em estafilococos coagulase positiva (SCP) e estafilococos coagulase negativa (SCN). Os SCP são divididos em quatro espécies principais: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus delphini*. Os SCN são subdivididos em mais de dez espécies, dentre essas *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus warneri* (EUZEBY, 2010). A enzima coagulase é produzida na parede celular dos micro-organismos coagulase positiva e possui a capacidade de fazer com que o fibrinogênio seja convertido em fibrina,

induzindo a coagulação do sangue, mecanismo que funciona como uma forma de evasão da imunidade inata, que se caracteriza pela fagocitose realizada pelos polimorfonucleares (XU; MCCORMICK, 2012).

A temperatura de crescimento para *S. aureus* encontra-se na faixa de 7°C a 48,5°C (sendo que a temperatura ótima é de 35 a 37°C) e possuem tolerância a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio e nitratos (FRAZIER; WESTHOFF, 2000). Possui a capacidade de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, com o pH ótimo para crescimento, compreendido entre 6,0 e 7,0 (FRANCO; LANDGRAF, 2000).

A principal defesa do animal e dos seres humanos baseia-se na fagocitose de corpos estranhos invasores pelas células polimorfonucleares, como os neutrófilos. Contudo, essa defesa é ineficaz para prevenir completamente a infecção por duas razões: deficiência na proteção das células hospedeiras e produção de fatores de virulência pelo micro-organismo (componentes estruturais, produção de toxinas e enzimas hidrolíticas) (KERRO DEGO; DIJK; NEDERBRAGT, 2002; BANKS et al., 2003). Diversos estudos observaram que a infecção intramamária causada por *S. aureus* apresenta uma resposta linfocitária deficiente, devendo este fato ocorrer pela produção desses fatores de virulência (PICCININI et al., 1999; STILES; KRAKAUER, 2005; BOYNUKARA et al., 2008). Vários autores já reconhecem a presença desses fatores de virulência e relacionam a produção de diferentes enzimas extracelulares e toxinas estafilocócicas (FERRY et al., 2005; VANCRAEYNESTE; HERMANS; HAESBROUCK, 2006; ZECCONI et al., 2006).

Esse micro-organismo é encontrado comumente associado a infecções adquiridas tanto no ambiente doméstico como no ambiente hospitalar (FOSTER, 2009; SINHA; FRAUNHOLZ, 2010). O micro-organismo pode sobreviver em tecidos e sangue, sendo capaz de provocar infecções de simples resolução até infecções mais graves (ROOIJAKKERS; VAN KESSEL; VAN STRIJP, 2005; SANTOS et al., 2007). Essa bactéria pode ser isolada de diversos produtos de origem animal, desde carne, leite e derivados, até em fontes ambientais, como ar, poeira e água (SNEATH et al., 1986). De acordo com RIVAS et al. (2007), cepas de *S. aureus* isoladas de animais com sinais clínicos e animais que não apresentam sinais clínicos são indistinguíveis, o que evidencia que o desencadeamento da doença causada pelo patógeno depende do sistema imunológico do portador.

3.3. Enterotoxinas Estafilocócicas (EE)

As enterotoxinas estafilocócicas (EEs) foram inicialmente descritas em 1959 e foram definidas como uma série de proteínas extracelulares produzidas primariamente por algumas estirpes de *S. aureus*. Enterotoxinas estafilocócicas são um grupo de toxinas resistentes ao tratamento de calor, de pH baixo e enzimas digestivas proteolíticas, como a pepsina, possuem baixo peso molecular (cerca de 27-31 kDa), são hidrossolúveis, compostas por aminoácidos, estrutura molecular e atividades farmacológicas semelhantes entre si, porém com propriedades imunológicas distintas (ATANASSOVA; MEINDL; RING, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

Sua nomeação ocorre de acordo com as letras do alfabeto e com a ordem cronológica de sua descoberta (DINGES et al., 2000). Elas estão relacionadas com casos de intoxicação alimentar, devido à ingestão da toxina pré-formada no alimento. Há uma estimativa de que 95% dos surtos são ocasionados pelos tipos clássicos das EE (SEA-SEE), sendo que outros 13 tipos já foram identificados (SEH, SEG, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEM, SEO, SEP, SEQ, SER E SEU) (SRINIVASAN et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2011; LYRA et al., 2013).

Segundo o Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos Estafilocócicos (*International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature*– INCSSN), somente os superantígenos capazes de induzir êmese após administração oral em modelo experimental em primatas pode ser designado EE. Aqueles que não provocam êmese ou não foram testados devem ser denominados de proteínas semelhantes à enterotoxinas (SEIs), mesmo possuindo homologia e similaridade estrutural com as EE (LINA et al., 2004; DERZELLE et al., 2009; SANTANA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011; XU; MCCORMICK, 2012).

Além da atividade emética, todas as EE e SEIs referidas previamente apresentam uma característica biológica de pirogenicidade e superantigenicidade, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro à síndrome do choque tóxico (FUSCO et al., 2011), além de possuírem habilidade para provocar êmese e gastroenterite (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

Pesquisas são realizadas no mundo para identificar a ocorrência dessas enterotoxinas em casos de mastite, tais como BOYNUKARA et al. (2008), que verificaram na Turquia a ocorrência de 23,6% (25/106) de isolados *S. aureus* procedentes de casos de mastite bovina subclínica positivos para o gene *sea* e que 1,9% (2/106) foi positivo para o gene *seb*. No Irã, RAHIMI e SAFAI (2010) detectaram 31,9% (29/91) de isolados positivos para os genes das enterotoxinas clássicas (*sea-see*). ZSCHÖCKET al. (2000), na Alemanha, avaliaram 94 isolados de *S. aureus*, em que 36,2% (34/94) foram positivos para o gene *tst*; 3,2% (3/94) foram positivos para o gene *sea*; 2,1% (2/94) para o gene *seb*; 23,4% (22/94) para o gene *sec* e 4,3% (4/94) para o gene *sed*.

3.4. Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)

A TSST-1 é codificada pelo gene *tst* que está presente no cromossomo bacteriano, codificando uma proteína formada por um polipeptídeo de cadeia única com peso molecular igual a 21,9 kDa. Ela possui uma alta porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos, mas é altamente solúvel em água. A toxina é altamente resistente ao calor e proteólise, adquirindo estabilidade sem alterar sua atividade biológica mesmo após permanecer uma hora em ebulição ou após exposição prolongada à tripsina (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). Embora os principais estudos demonstrem a presença de *tst-1* em isolados de origem humana (TSEN et al., 1998; DEURENBERG et al., 2005), a presença deste gene vem sendo comumente verificada em isolados de origem animal e em diversos alimentos, incluindo isolados de leite de vacas com mastite, leite cru e carnes e derivados (JONES e WIENEKE, 1986; ZSCHOCK et al., 2005; WANG et al., 2009; GUNAYDIN et al., 2011).

No Brasil, o primeiro estudo a detectar a ocorrência da toxina TSST-1 foi realizado por CARDOSO, CARMO e SILVA (2000), que avaliaram 127 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite de bovinos leiteiros em Minas Gerais, o que representou 47,2% dos isolados. Em relação à identificação das enterotoxinas em casos de mastite bovina, poucos estudos foram conduzidos no país, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Pesquisa de genes para as enterotoxinas estafilocócicas em isolados de *Staphylococcus aureus* procedentes de amostras de leite bovino realizados no Brasil

Autor/Ano	Estado	Enterotoxina(Gene)
Lamaita et al. (2005)	MG	<i>sea</i> (3,5%), <i>seb</i> (9,3%)
Chapaval et al. (2006)	SP	<i>tst</i> (42,2%)
Freitas et al. (2008)	PE	<i>seg, seh, sei, sej</i> (80,2%)
Luz (2008)	PE	<i>seg, seh, sei, sej</i> (93,6%)
Ângelo(2010)	MG	<i>tst</i> (2,3%), <i>sea-see</i> (66,7%)
Dias et al.(2011)	MG	<i>sea</i> (60,0%), <i>seb</i> (37,9%), <i>sec</i> (6,9%)

O gene *tst-1* está associado com elementos genéticos móveis, como profagos, ilhas de patogenicidade de *S. aureus* e plasmídeo, o que pode gerar uma possível transferência do gene para outras bactérias. Outros estudos têm verificado a associação da presença de genes para a toxina da síndrome choque tóxica com a presença de genes para as enterotoxinas estafilocócicas, o que pode inferir no aumento da patogenicidade destes isolados, acarretando em um potencial risco à saúde pública (FUEYO et al., 2005; FARAHMAND et al., 2013).

3.5. Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas pela utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nos últimos anos ocorreu um aumento significativo no desenvolvimento de metodologias genéticas para a detecção e caracterização de isolados bacterianos patogênicos em alimentos. Com a chegada da biologia molecular, estabeleceu-se uma alternativa viável em relação aos métodos tradicionais de cultura para o diagnóstico microbiano. Dentre algumas vantagens, pode-se destacar o maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior sensibilidade, especificidade e até mesmo a possibilidade de se trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura utilizados na rotina (SILVA; GANDRA, 2004).

Com a Reação em Cadeia da Polimerase, é possível detectar a presença destes genes em bactérias pelo uso de *primers*, que são capazes de detectar de 1 pg de DNA para *seb* e 10 pg para *sea*, *sec* e *sed*, por exemplo, entretanto não significa que haverá expressão

gênica nestas bactérias. Além de ser possível detectar genes em amostras com baixa concentração de micro-organismos, uma grande vantagem deste método é possuir alta sensibilidade e precisão (SANTILIANO et al., 2011).

A maioria dos estudos que detectam enterotoxinas estafilocócicas em leite bovino utiliza o método da PCR (DIAS et al. 2001; KARAHAN; AÇIK; ÇETINKAYA, 2009).

Uma grande variedade de isolados de *S. aureus* pode ser testada para a produção de enterotoxinas em casos de mastite bovina (LONCAREVIC, MATHISEN, 2004). A busca contínua pela identificação de novas EEs e, conseqüentemente, a necessidade de utilização de métodos rápidos têm levado ao desenvolvimento de técnicas para pesquisa de um único gene como a PCR-Uniplex (MCLAUCHLIN et al., 2000) bem como a detecção simultânea dos genes *se*, como a PCR-Multiplex (MONDAY; BOHACH, 1999).

Métodos moleculares, como a PCR, possuem vantagem em relação à capacidade de detectar genes que determinam a produção das toxinas estafilocócicas, inclusive a partir de alimentos que já passaram por tratamento térmico, em virtude de o DNA permanecer inalterado, demonstrando a capacidade de ser potencialmente toxigênica de *S. aureus* (TSEN; CHEN, 1992).

4 REFERÊNCIAS

ÂNGELO, F. F. **Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite.** 2010. 90 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v.2, p.1751-1773, 2010.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.105-113, 2001.

BANDOCH, P.; MELO, L. S. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. **Publicatio UEPG Biological and Health Sciences.**, v.17, n.1, p.47-51, 2011.

BANKS, M. C. et al. *Staphylococcus aureus* express unique superantigens depending on the tissue source. **The Journal of Infectious Diseases**, v.187, p.77-86, 2003.

BOYNUKARA, B. et al. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.2, p.209-211, 2008.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choquetóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.7-10, 2000.

CHAPAVAL, D. H. et al. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.299-306, 2008.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

DERZELLE, S. et al. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**, v.26, p.896-904, 2009.

DIAS, N. L. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1547-1552, 2011.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.16-34, 2000.

EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation list n° 132. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.469-472, 2010. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em 16 jan. 2015.

FERRY, T. et al. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. **Current Infectious Disease Reports**, v.7, p.420-428, 2005.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Journal of Veterinary Dermatology**, v.20, n.5-6 p.456-470, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000, 182p.

FRAZIER, W C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000, 681 p.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados do leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FREITAS, M. F. L. et al. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.12, p.617-621, 2008.

FUSCO, V. et al. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene *cluster* (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n.3, p.528-537, 2011.

HOLECKOVÁ, B. et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.9, n.3, p.179-182, Mar. 2002.

HOLTENIUS, K. et al. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. **The Veterinary Journal**, v.164, p.85-86, 2004.

ISMAIL, Z. A. B.; DICKINSON, C. Alterations in coagulation parameters in dairy cows affected with acute mastitis caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* pathogens. **Veterinary Research Communication**, v.34, p.533-539, 2010.

JARRAUD, S. et al. *egc*, A Highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.

KARAHAN, M.; AÇIK, M. N.; ÇETINKAYA, B. Investigation of Toxin Genes by Polymerase Chain Reaction in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Turkey. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 8, p. 1029-1035, 2009.

KERRO DEGO, O.; DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. **Veterinary Quarterly**, v.24, n.4, p.181-198, 2002.

KIM, H. K. et al. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, n.1 p.92-99, 2012.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Staphylococcus and Micrococcus. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology. 7th. Edition. 1999. Cap.16, p.264-282.

KUMAR, A. et al. Bacterial prevalence and antibiotic resistance profile from bovine mastitis in Mathura. **Journal of Dairy Science**, v.38, p.31-34, 2010.

LAMAITA, H. C. et al. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.702-709, 2005.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LINA, G. et al. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v.189, n.12, p.2334-2336, 2004.

LONCAREVIC, S.; MATHISEN, T. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type H from a food outbreak. In: WORLD CONGRESS FOODBORNE INFECTIONS AND INTOXICATIONS, Berlin. **Proceedings...** Berlin: Federal Institute for Risk Assessment, 2004, p.118.

LUZ, I.S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, 2008.

LYRA, D.G. et al. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from bulk goat milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.2, p.126-130, 2013.

MCLAUCHLIN, J. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.63, p.479-488, 2000.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3411-3414, 1999.

NORMANNO, G. et al. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, n.1, p.73-79, 2005.

PICCININI, R. et al. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.501-510, 1999.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v.2, n.8, p.2177-2197, 2010.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, A. S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1/2, p.3-8, 2009.

RAHIMI, E.; SAFAI, H. G. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.393–394, 2010.

RIVAS, A. L. et al. Multifactorial relationships between intramammary invasion by *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, n.2, p.135-144, 2007.

ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN KESSEL, K. P. M.; VAN STRIJP, J. A. G. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends in Microbiology**, v.13, n.12, p.596-601, 2005.

SANTANA, E.H.W. et al. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTILIANO, F. C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção das enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **Pubvet**, v.5, n.3, p.1327-1342, 2011.

SANTOS, J. E.P. et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.31-45, 2004.

SANTOS, R. A. et al. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.1, p.6-12, 2007.

SANTOS, M. V.; TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L. Novas estratégias para o tratamento da mastite bovina. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, p.131-137, 2011.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.103-107, 2005.

SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de antibióticos em leite. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p.30-44, 2012.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.122, p.32-40, 2004.

SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post invasion events. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, n.2-3, p.170-175, 2010.

SIQUEIRA, K. B.; ZOCCA, R. Panorama do leite. Juiz de Fora. Boletim Eletrônico Mensal, v. 6, n. 65, 2012. p. 2. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/948893/1/201201PanoramaLeite1.pdf>. Acesso em: 23 de outubro de 2014.

SNEATH, P. H. A. et al. Gram positive cocos. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, v.2,1986, p. 999-1103.

SRINIVASAN, V. et al. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.3, p.274-278, 2006.

STILES, B. G.; KRAKAUER, T. Staphylococcal enterotoxins: a purging experience in Review, Part 1. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.27, n.23, p.179-186, 2005.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.7, n.10, p.1-7, 2008.

TSEN, H. Y.; CHEN, T. R. Use of polymerase chain reaction for detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.88-91, 1992.

VANCRAEYNESTE, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit strains. **Veterinary Microbiology**, v.117, p.211-218, 2006.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. Foodborne pathogens: an illustrated text. **Mosby Year Book**, p. 235-265, 1991.

VASCONCELOS, N. G. et al. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, n.3, p.749-762, 2011.

VASHNEY, S. et al. Antibacterial activity of fruits of *Terminelia chebula* and *Terminalia bellerica* against mastitis field isolates. **Medicinal Plants**, v.4, p.167-169, 2012.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.179-185, 2003.

XU, S. X.; MCCORMICK, J. K. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.17, n.2, p.105-115, 2012.

ZECCONI, A. et al. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, v.40, p.177-183, 2006.

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, p.569-574, 2000.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

**OCORRÊNCIA DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS
ESTAFILOCÓCICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS**

(Artigo a ser encaminhado ao periódico *Journal of Dairy Science*)

OCORRÊNCIA DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS ESTAFLIOCÓCICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS

Resumo: Objetivou-se com este trabalho pesquisar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb*, *sec* e *seg*) e do gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) a partir de isolados de *Staphylococcus aureus* procedentes de casos de mastite bovina na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco. Foram analisados 93 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, provenientes de 17 propriedades localizadas em 11 municípios da microrregião Garanhuns, no estado de Pernambuco. Para a caracterização molecular da espécie *Staphylococcus aureus*, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) visando a identificação pela presença do gene *nuc*, assim como para a caracterização molecular das Enterotoxinas Estafilocócicas e da toxina da Síndrome do Choque Tóxico. Foram identificados os genes específicos *sea*, *seb*, *sec*, *seg* e *tst*. Dos 93 isolados analisados, observou-se a presença de genes enterotoxigênicos em 20 (21,6%) amostras, das quais 11 (55,0%) foram positivas para o gene *tst*, sete (35,0%) para o gene *sec*, duas (10,0%) para o gene *seg*. Dentre os 20 isolados que amplificaram segmentos para a presença dos genes *sec*, *seg* e *tst*, 16 (80,0%) foram positivos apenas para um gene e quatro (20,0%) foram positivos para dois genes (*sec* e *tst*). Das 17 propriedades estudadas, sete (41,2%) apresentaram amostras positivas para pelo menos um dos genes *sec*, *seg* e *tst*. Este foi o primeiro registro de ocorrência do gene codificador da toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite de vacas com mastite no estado de Pernambuco. Como houve uma variação na distribuição dos genes *sec*, *seg* e *tst* nas cepas procedentes de diferentes propriedades, pode-se inferir que há uma variação genotípica nas cepas de *S. aureus* que causam mastite bovina.

Palavras-chave: Enterotoxinas, genes, leite

Introdução

Staphylococcus aureus é a principal espécie gram-positiva causadora de mastite bovina e possui a capacidade de produzir toxinas, que são proteínas provenientes do interior da célula do micro-organismo, decorrentes de sua multiplicação e metabolismo, tendo como exemplo as enterotoxinas estafilocócicas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico, que são classificadas como superantígenos, ou seja, são capazes de estimular uma resposta policlonal inespecífica de linfócitos T, além de um aumento na liberação de citocinas, causando uma grande supressão do sistema imune adaptativo (Xu; McCormick, 2012).

Enterotoxinas estafilocócicas são um grupo de toxinas resistentes a altas temperaturas, pH baixo e enzimas digestivas proteolíticas, tais como pepsina. Possuem baixo peso molecular (cerca de 27-31 kDa), são hidrossolúveis, compostas por aminoácidos, estrutura molecular e atividades farmacológicas semelhantes entre si, porém com propriedades imunológicas distintas (Atanassova et al., 2001; Le Loir et al., 2003; Argudín, et al., 2010).

Pesquisas são realizadas no mundo para identificar a ocorrência dessas enterotoxinas em casos de mastite, tais como: Boynukara et al. (2008), que verificaram na Turquia a ocorrência de 23,6% (25/106) de isolados de *S. aureus* procedentes de casos de mastite bovina subclínica positivos para o gene *sea* e 1,9% (2/106) para o gene *seb*. No Irã, Rahimi e Safai (2010) detectaram 31,9% (29/91) de isolados positivos para os genes das enterotoxinas clássicas (*sea-see*). Zschöck et al. (2000), na Alemanha, avaliaram 94 isolados de *S. aureus*, em que 36,2% (34/94) foram positivos para o gene *tst*, 3,2% (3/94) foram positivos para o gene *sea*, 2,1% (2/94) para o gene *seb*, 23,4% (22/94) para o gene *sec* e 4,3% (4/94) para o gene *sed*.

No Brasil, o primeiro estudo a detectar a ocorrência da toxina TSST-1 foi realizado por Cardoso, Carmo e Silva (2000), que avaliaram 127 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite de bovinos leiteiros em Minas Gerais, o que representou 47,2% dos isolados. Outros estudos foram conduzidos para determinar a ocorrência das principais enterotoxinas em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos a partir de leite bovino. Lamaita et al. (2005) detectaram a ocorrência do gene *sea* e *seb* em 3,5% (5/138) e 9,3% (13/138), respectivamente, enquanto Dias et al. (2011) detectaram a ocorrência de 60,0% (87/145)

para o gene *sea*; 37,9% (55/145) para o gene *seb* e 6,9% (10/145) para o gene *sec*. No estado de Pernambuco, Freitas et al. (2008) detectaram os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em 80,2% (65/81) das amostras analisadas.

Desta forma, identificar aos genes codificadores de enterotoxinas em isolados de *Staphylococcus aureus* procedentes de vacas com mastite é de fundamental importância uma vez que o conhecimento dos fatores de virulência de *S. aureus* fornece informações importantes para o estabelecimento produtor de leite e produtos derivados e podem desta maneira utilizar estratégias efetivas de controle e prevenção da mastite bovina, além de auxiliar na prevenção de toxinfecções alimentares.

Material e Métodos

Isolados de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizados neste estudo um total de 93 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Reprodução e Doenças Infecciosas, da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As cepas bacterianas foram obtidas em 17 propriedades distribuídas em 11 municípios da microrregião Garanhuns, no período de dezembro de 2009 a janeiro de 2011. Os rebanhos estudados eram mantidos em sistema extensivo, semi-intensivo ou intensivo, sendo constituídos por animais de diferentes raças, idades e diferentes estágios de lactação.

Recuperação das culturas bacterianas do estoque

Os isolados bacterianos do banco de culturas foram mantidos em frascos de polipropileno, contendo 1,0 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO), com 10% de glicerol. As culturas-estoque estavam armazenadas entre -20 e -80°C e estavam identificadas de acordo com a numeração dos animais. A recuperação das cepas selecionadas para todas as análises foi realizada pela incubação dos frascos por 24 horas, a 37°C. Após essa recuperação, as bactérias foram reisoladas em ágar base acrescido de 5%

de sangue desfibrinado de ovino, pela técnica de semeadura em estrias por esgotamento, de modo a garantir a obtenção de colônias puras. As placas foram incubadas em estufa microbiológica, a 37°C por 24 a 48 horas.

Isolamento e identificação fenotípica do *Staphylococcus aureus*

Para o diagnóstico fenotípico do *Staphylococcus aureus*, as colônias foram identificadas de acordo com as características de crescimento em ágar sangue, produção de hemólise e pigmento.

Para a identificação do gênero, foram verificadas características morfotintoriais das colônias pela técnica de Gram, e realizadas provas bioquímicas, como catalase, coagulase e DNase. A fermentação de glicose em anaerobiose, manitol (aerobiose e anaerobiose) e produção de acetoína foram realizadas segundo metodologia descrita por Mac Faddin (1980).

Extração de DNA

O DNA foi extraído e purificado seguindo adaptações dos protocolos descritos por Wade et al. (2005) e Ausubel et al. (1989). Uma alçada de cultivo foi colocada em 300µl de TE (Tris-EDTA) e as amostras foram homogeneizadas posteriormente em vórtex. Acrescentou-se 70µl de SDS 10% e novamente homogeneizou-se. Em seguida, foram adicionados 100µl de NaCl₂ 5M e 80µl CTAB/NaCl e incubou-se a 65°C por 20 minutos. Logo após, foram acrescentados 700µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizou-se por inversão. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11.750g por 5 minutos. Foi transferida a 1ª fase para outro tubo e acrescentados 450µl de isopropanol. Os tubos foram invertidos e deixados em gelo por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 11.750g por 15 minutos, desprezando-se o sobrenadante, e acrescentados 500µl de etanol 70%. Em seguida, foram centrifugadas a 11.750g por 10 minutos e novamente desprezado o sobrenadante. As amostras foram suspensas em 80µl de TE (pH 8,0) e incubadas a 65°C por 60 minutos. Ao término, foram armazenadas a -20°C.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a caracterização molecular da espécie *Staphylococcus aureus* foi realizada uma PCR para identificar a presença do gene *nuc*, assim como para a caracterização molecular das Enterotoxinas Estafilocócicas e da toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico foram pesquisados os genes específicos *sea*, *seb*, *sec*, *seg* e *tst*.

Gene *nuc*

Para a reação foi utilizado um volume de 15µl, em que 11µl foram de *mix* contendo 2mM de MgCl₂; 0,4pmol dos *primers* (Tabela 1); 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos; tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 4µl do DNA de cada amostra. O fragmento possui um tamanho de 279 pb.

A reação de amplificação do gene *nuc* foi realizada de acordo com Kateeteet al. (2010) com as seguintes modificações: temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 37 ciclos, consistindo cada um de 94°C por 1 minuto, hibridação do iniciador a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Gene *sea*

Para a reação foi utilizado um volume de 25µl, em que 17µl foram de *mix* contendo 2mM de MgCl₂; 0,4pmol dos *primers* (Tabela 1); 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos; tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 8µl do DNA de cada amostra. O fragmento possui um tamanho de 127pb.

A reação de amplificação do gene *sea* foi realizada de acordo com Becker et al. (1998) com as seguintes modificações: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 38 ciclos, consistindo cada um de 95°C por 1 minuto, hibridação do iniciador a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Gene *seb*

Para a reação foi utilizado um volume de 25µl, em que 17µl foram de *mix* contendo 2mM de MgCl₂; 0,4pmol dos *primers* (Tabela 1); 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos; tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 8µl do DNA de cada amostra. O fragmento possui um tamanho de 164pb.

A reação de amplificação do gene *seb* foi realizada de acordo com Mehrotra et al. (2000) com as seguintes modificações: temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 25 ciclos, consistindo cada um de 94°C por 2 minutos, hibridação do iniciador a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 4 minutos.

Gene *sec*

Para a reação foi utilizado um volume de 25µl, em que 17µl foram de *mix* contendo 2mM de MgCl₂; 0,4pmol dos *primers* (Tabela 1); 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos; tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 8µl do DNA de cada amostra. O fragmento possui um tamanho de 271pb.

A reação de amplificação do gene *sec* foi realizada de acordo com Becker et al. (1998) com as seguintes modificações: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos, consistindo cada um de 95°C por 1 minuto, hibridação do iniciador a 55,4°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos.

Gene *seg*

Para a reação foi utilizado um volume de 25µl, em que 17µl foram de *mix* contendo 2mM de MgCl₂; 0,4pmol dos *primers* (Tabela 1); 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos; tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 8µl do DNA de cada amostra. O fragmento possui um tamanho de 328pb.

A reação de amplificação do gene *seg* foi realizada de acordo com Monday and Bohach (1999), Karahan et al. (2009) com as seguintes modificações: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos, consistindo cada um de

95°C por 1 minuto, hibridação do iniciador a 65,4°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos.

Gene *tst*

Para a reação foi utilizado um volume de 25µl, em que 17µl foram de mix contendo 2mM de MgCl₂; 0,4µmol dos *primers* (Tabela 1); 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos; tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 8µl do DNA de cada amostra. O fragmento possui um tamanho de 445pb.

A reação de amplificação do gene *tst* foi realizada de acordo com Becker et al. (1998) com as seguintes modificações: temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos, consistindo cada um de 95°C por 1 minuto, hibridação do iniciador a 55,4°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos.

Eletroforese

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (1,0mgmL⁻¹), visualizados sob luz ultravioleta e documentados em sistema de captura de imagem. Os DNAs de *Staphylococcus aureus*89cTP₂FUNED (SEAB) e *Staphylococcus aureus* FRI 361 (SEC) foram usados como controles positivos (Silva et al., 2005). Para os genes *tst* e *seg*, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* positivas para esses genes.

Resultados

De acordo com as características fenotípicas e bioquímicas, das 93 cepas analisadas, 59 (63,45%) foram identificadas como coagulase positivas e 34 (36,55%) foram identificadas como coagulase negativas. Porém, de acordo com a pesquisa do gene *nuc*, todas as 93 cepas foram positivas para este gene, confirmando, desta forma, a classificação em *Staphylococcus aureus*.

A ocorrência dos genes toxigênicos nas cepas analisadas encontra-se disposta na tabela 2. Constatou-se que as cepas não apresentaram potencial enterotoxigênico em relação às enterotoxinas clássicas SEA e SEB.

Entre os 20 isolados que amplificaram segmentos para a presença dos genes *sec*, *seg* e *tst*, 16 (80%) amplificaram apenas para um gene e quatro (20%) amplificaram para dois genes, verificando o genótipo (*sec* + *tst*) nestes.

Das 17 propriedades estudadas, sete (41,2%) apresentaram amostras positivas para pelo menos um dos genes *sec*, *seg* e *tst*, como observado na Tabela 3.

De acordo com as informações do banco de culturas das coletas das cepas de *S. aureus*, foi possível estabelecer uma relação entre o tipo de mastite, pelo teste da caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT) e a produção da enterotoxina amplificada (tabela 4).

Na tabela 5 está disposta a relação entre a produção ou não da enzima coagulase e os tipos de enterotoxinas produzidas nos isolados (tabela 5).

Discussão

De acordo com as características fenotípicas e bioquímicas, das 93 cepas estudadas, 59 (63,45%) foram identificadas como coagulase positivas e 100% foram positivas para o gene *nuc*. Desta forma, sugere-se que apenas os testes fenotípicos como coagulase não são capazes de classificar de forma precisa a espécie de *Staphylococcus aureus*, sendo necessária a realização de testes mais sensíveis e específicos, como a PCR. Kalorey et al. (2007), visando caracterizar genotipicamente 37 isolados de *S. aureus*, obtiveram a amplificação deste gene em 36 dos isolados, segundo Gandra (2006), este gene é específico para detecção desta espécie, assim como Kateete et al. (2010), onde relataram que a amplificação do gene *nuc* tem alta sensibilidade e especificidade, apresentando vantagem quando comparado às técnicas fenotípicas.

Ao analisar a ocorrência de enterotoxinas, observou-se que 21,6% (20/93) das amostras possuíam ao menos um dos genes pesquisados.

Este é o primeiro registro da ocorrência dos genes *sec* e *tst* em cepas de *S. aureus* isoladas a partir de casos de mastite bovina no estado de Pernambuco. Em outras regiões do país, o gene *sec* já foi relatado; Sá et al. (2004) avaliaram 209 amostras de leite

procedentes de vacas com mastite subclínica por *S. aureus*, e nove amostras (4,39%) foram produtoras de enterotoxinas. A ocorrência observada neste trabalho para os genes *sec* (35,0%) e *tst* (55,0%) foi superior ao obtido por Lamaita et al. (2005) em Minas Gerais, que detectaram 14,4% para o gene *sec* e 0,7% para o *tst* em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite. Já Nader Filho et al. (2007) identificaram a ocorrência em 38,9% (*sec*) e 37,5% (*tst*) das amostras analisadas. Dias et al. (2011) detectaram a ocorrência do gene *sec* em, 6,9% (10/145) das amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino. A ocorrência destes genes pode ser explicada pelo fato de ter sido utilizado a PCR *Uniplex*, ao contrário de outros autores que fizeram o mesmo estudo na região, pois estes utilizaram PCR *Multiplex*, uma vez que a PCR *Uniplex* utiliza uma quantidade maior de DNA, fazendo com que esta possua uma maior sensibilidade (Rodrigues, 2011).

No estado de Pernambuco, outros estudos já foram conduzidos com o objetivo de detectar a presença dessas toxinas em leite bovino, sendo as amostras negativas para esses genes (Freitas et al., 2005; Luz, 2008). A diferença identificada entre este estudo e os demais pode estar relacionada com a diversidade genética dos micro-organismos em cada região. A presença ou não dos genes *sec* e *tst* está associada não somente a quadros de mastite bovina clínica, como também em casos de subclínica possuindo importância na virulência das amostras de *S. aureus*, sugerindo estabelecer uma relação entre sua presença e a gravidade dos casos de mastite (Sá et al., 2004).

Em relação ao teste caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT) (Tabela 4), foi possível observar que mesmo as amostras sendo negativas para estes testes, foram detectadas enterotoxinas em três (15,0%) dessas amostras, o que é possível concluir que as enterotoxinas não são só detectadas em casos de mastites, o animal pode não manifestar sinais clínicos, mas o micro-organismo presente no leite pode ser capaz de codificar essas enterotoxinas.

O gene *seg* foi quem apresentou a menor ocorrência (10,0%). Segundo Jarraud et al. (2001), a pequena porcentagem de cepas de *S. aureus* que produzissem esse gene pode ser explicada por mutações pontuais no próprio gene ou por variações no *cluster* em que este gene está localizado, o que justificaria a menor detecção. Devido à localização desse gene ocorrer em elementos genéticos móveis (plasmídeos), o tempo em que esses micro-organismos estavam estocados no banco de culturas, além da temperatura de armazenamento destes isolados, pode-se explicar a baixa ocorrência do gene *seg* no

determinado estudo, uma vez que o micro-organismo não necessita desses elementos para sobreviver, sendo normal o seu desaparecimento (Bennett, 2008).

Ao analisar a associação entre a presença dos genes codificadores, observou-se a ocorrência da associação do gene *tst* com o *sec* em quatro isolados (20%). Em estudos realizados por Akineden et al. (2001) e Stephan et al. (2001), isolados de *S. aureus* de leite de vacas com mastite bovina, foram todos positivos para a presença do gene *tst* associado com o gene *sec*. A presença do gene *tst* associado com genes para as enterotoxinas estafilocócicas pode indicar a possibilidade do gene estar associado com o aumento da patogenicidade dos isolados, bem como com a patogênese da mastite (Karahán et al., 2009). Estudos mais específicos devem ser realizados para verificar a patogênese e a severidade da mastite bovina causada pela associação do gene *tst* com os demais genes das enterotoxinas estafilocócicas.

No presente estudo, houve uma maior ocorrência de enterotoxinas em isolados classificados como SCP (60,0%), enquanto os SCN obtiveram 40,0% da presença de enterotoxinas. Segundo Ângelo (2010), das 33 amostras SCP, quatro (12,1%) foram positivas para o gene *seg*, enquanto amostras SCN, apenas uma foi positiva para o gene *seg*, é possível inferir que existe uma relação entre o isolado ser SCP e produtor de enterotoxinas. Também se deve dar importância aos isolados SCN produtores de enterotoxinas, pois estes já foram comprovados como causadores de surtos de intoxicação alimentar. Pimentel et al. (2002) constataram que 41,3% dos pools de amostras de SCN eram enterotoxigênicas. Guimarães (2011) detectou 66,4% de amostras SCN provenientes de casos de mastite bovina positivas para enterotoxinas estafilocócicas.

A não ocorrência dos genes *sea* e *seb* foi semelhante ao resultado obtido no estudo realizado por Freitas et al. (2005) e Luz (2008) na mesma região. Resultado semelhante ocorreu no Japão com Omoe et al. (2002), sendo possível observar que em 21 isolados de leite de vacas com mastite não foi observada a presença dos genes para as toxinas clássicas. Segundo Silva, Carmo e Silva (2005), isolados de *S. aureus* de origem humana são capazes de codificar genes do tipo *sea* e *seb*, enquanto os de origem animal codificam *sec* e *sed*. Portanto, a ausência dos genes *sea* e *seb* pode ser explicada devido ao fato de ocorrer uma distribuição regional na prevalência de algumas enterotoxinas estafilocócicas e seus genes, indicando uma grande diversidade destas cepas, além de que estas cepas provavelmente possuem origem animal.

A presença dos genes *sec*, *seg* e *tst* neste estudo indica uma distribuição regional dos isolados de *Staphylococcus aureus* a partir de amostras de leite de vacas com mastite subclínica provenientes de municípios da microrregião Garanhuns. Os perfis dos genes para as EEs parecem ser variáveis entre as origens geográficas. Essa diferença pode ser resultado de adaptações do hospedeiro de *S. aureus* nas diferentes espécies animais (Hwang et al., 2007).

O fato de o leite ser um excelente substrato para a proliferação de microorganismos, a temperatura da glândula mamária bovina é essencial para que ocorra a produção das enterotoxinas e, por isto, podem ser encontradas facilmente no leite bovino (Nader Filho et al., 2007). Apenas a detecção dos genes toxigênicos em *S. aureus* não implica que estes isolados produzam EEs em nível suficiente para causar quadros de toxinfecção alimentar ou outras doenças associadas às enterotoxinas. Existem também os fatores ambientais (pH, atividade de água, entre outros) que podem desencadear o desenvolvimento da toxinfecção (Chiang et al., 2008).

Estudos que especifiquem o perfil molecular de agentes causadores de mastite bovina, bem como a distribuição destas, além de trabalhos que determinem as quantidades de toxinas em isolados de *S. aureus* portadores destes genes que sejam suficientes para causar a doença no humano (Dias et al., 2011).

Conclusão

Este foi o primeiro registro da ocorrência de genes codificadores da enterotoxina SEC e da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em amostras de leite de vacas no estado de Pernambuco. Existe uma distribuição regional na prevalência dos genes *sec*, *seg* e *tst*, o que indica uma dispersão dos isolados de *S. aureus* em áreas geográficas específicas na microrregião Garanhuns.

Deve-se dar importância à presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em leite de vaca, uma vez que esta acaba representando um potencial fator de risco para a saúde pública, sendo importante evitar também o consumo de leite cru e ter uma maior atenção em relação à higiene do seu processamento.

Agradecimentos

À FACEPE, pela concessão da bolsa de mestrado. À Profa. Elizabete Rodrigues da Silva, pelo fornecimento das cepas controles de *Staphylococcus aureus* 89cTP₂FUNED (SEAB) e *Staphylococcus aureus* FRI 361 (SEC).

Referências

- Akineden, Ö., C. Anne müller, A. A. Hassan, C. Lämmner, W. Wolter, and M. Zschöck. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.8, n.5, p.959-964.
- Argudín, M. A., M. C. Mendoza, and M. R. Rodicio. 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, v.2, p.1751-1773.
- Atanassova, V.;A. Meindl, and C. Ring. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v.68, p.105-113.
- Ausubel, F. M. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y., USA.
- Becker, K., R. Roth, and G. Peters.1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliativetoxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.9, p.2548–2553.
- Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria: Review. *British Journal of Pharmacology*, v.153, p.347–357.
- Boynukara, B., T. Gulhan, M. Alisarli, K. Gurturk, and H. Solmaz. 2008. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, v.125, n.2, p.209-211.

- Cardoso, H. F. T., L. S. Carmo and N. Silva. 2000. Detecção da toxina-1 da síndrome do choquetóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.52, p.7-10.
- Chiang, Y. C., W. W. Liao, C. M. Fan, W. Y. Pai, C. S. Chiou, and H. Y. Tsen. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. International Journal of Food Microbiology, v.121, p.66-73.
- Dias, N. L., D. C. B. Silva, D. C. B. S. Oliveira, A. A. Fonseca Júnior, M. L. Sales, and N. Silva. 2011. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.63, n.6, p.1547-1552.
- Freitas, M. F. L., J. W. Pinheiro Junior, T. L. M. Stamford, S. S. A. Rabelo, D. R. Silva, V. M. Silveira Filho, F. G. B. Santos, M. J. Sena, and R. A. Mota. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados do leite de vacas com mastite no Agreste do estado de Pernambuco. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, n.2, p.171-177.
- Gandra, E. A. Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado. 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Guimarães, F. F. Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas. 2011. 127f. Dissertação (mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- Hwang, S. Y., S. H. Kim, E. J. Jang, N. H. Kwon, Y. K. Kwon, H. C. Koo, W. K. Jung, J. M. Kim, and Y. H. Park. 2007. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.117, p.99-105.
- Jarraud, S., M. A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville, and G. Lima. 2001. *Egc* a highly prevalent operon of

enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. Journal of Immunology, Baltimore, v.166, p.669-677.

Kalorey, D. R., Y. Shanmugam, N. V. Kurkure, K. K. Chousalkar and S. B. Barbuddhe, 2007. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. Journal Veterinary Science. v.8, n.2, p.151 – 154.

Karahan, M., M. N. Açık, and B. Cetinkaya. 2009. Investigation of Toxin Genes by Polymerase Chain Reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. Foodborne pathogens and disease, v.6, n.8, p.1029-1035.

Kateete, D. P., C. N. Kimani, F. A. Katabazi, A. Okeng, M. S. Okee, A. Nanteza, M. L. Joloba, and F. C. Najjuka. 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, v.9, n.23, p.1-7.

Lamaita, H. C., M. M. O. P. Cerqueira, L. S. Carmo, D. A. Santos, C. F. A. M. Penna, and M. R. Souza. 2005. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.57, p.702-709.

Le Loir, Y., F. Baron and M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v.2, n.1, p.63-76.

Luz, I. S. 2008. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE.

Mac faddin, J. F. 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2ed. Baltimore Williams & Wilkins, 527p.

Mehrotra, M., G. Wang, and W. M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. Journal of Clinical Microbiology, v.38, n.3, p.1032–1035.

Monday, S. R., and G. A. Bohach. 1999. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.37, p.3411-3414.

- Nader Filho, A., L. M. Ferreira, L. A. Amaral, O. D. Rossi Junior, and R. P. Oliveira. 2007. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.5, p.1316-1318.
- Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D. L. Hu, S. Ueda, and K. Shinagawa. 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.40, n.3, p.857-862.
- Pimentel, F. E., R. S. Dias and L. S. Carmo. 2002. Presença de *Staphylococcus sp* enterotoxigênico e de enterotoxinas em queijo ralado. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, v.57, p.227-229.
- Rahimi, E., and H. G. Safai. 2010. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. *Veterinary Microbiology*, v.141, p.393–394.
- Rodrigues, N. P. A. 2011. Utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de leite bovino em leite caprino. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição)- Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.
- Sá, M. E. P., M. L. R. S. Cunha, A. O. Elias, C. Victória, and H. Langoni. 2004. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, p.320-326.
- Silva, E. R., L. S. Carmo, and N. Silva, 2005. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology*, v.106, p.103-107.
- Stephan, R., C. Anne müller, A. A. Hassan, and C. Lämmler. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.78, p.373-382.
- Wade, J. T., N. B. Reppas, G. M. Church, and K. Struhl. 2005. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes & Development*, v.19, p.2619–2630.

Zschöck, M., D. Botzler, S. Blöcher, J. Sommerhäuser, and H.P. Hamann.2000. 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, p.569-574.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estudados

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Fragmento amplificado	Referência
	<i>nuc F</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT		
<i>nuc</i>	<i>nuc R</i>	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAA GC	279pb	Kateeteet al. (2010)
	SEA3	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG		
<i>sea</i>	SEA4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	127pb	Becker et al. (1998)
	SEB-1	GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC		
<i>seb</i>	SEB-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164pb	Mehrotraet al. (2000)
	SEC3	CTCAAGAACTAGACATAAAAAGCTAGG		
<i>sec</i>	SEC4	TCAAAAATCGGATTAACATTATCC	271pb	Becker et al. (1998)
	SEG-1	CGTCTCCACCTGTTGAAGG		Monday e
<i>seg</i>	SEG-2	CCAAGTGATTGTCTATTGTCG	328pb	Bohach(1999),Karahan et al.(2009)
	TST3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG		
<i>tst</i>	TST6	ATCGAACTTTGGCCATACTT T	445pb	Becker et al. (1998)

Tabela 2 -Pesquisa de genes toxigênicos em cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco

Genes	Quantidade de amostras positivas	Valor Relativo (%)
<i>sea</i>	-	-
<i>seb</i>	-	-
<i>sec</i>	7	35,0
<i>seg</i>	2	10,0
<i>tst</i>	11	55,0
Total	20	100,0

Tabela 3. Presença dos genes *sec*, *seg* e *tst* em cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de amostras de leite em propriedades da microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco

Propriedades	Amostras <i>sec</i> positivas	Amostras <i>seg</i> positivas	Amostras <i>tst</i> positivas
P2 (n=8)	-	2 (25,0%)	-
P6 (n=4)	1 (25,0%)	-	-
P13 (n=9)	3 (33,0%)	-	2 (22,0%)
P14 (n=8)	-	-	2 (25,0%)
P15 (n=6)	-	-	2 (33,0%)
P16 (n=7)	2 (28,0%)	-	4 (57,0%)
P17 (n=22)	1 (45,0%)	-	1 (45,0%)
Total	7	2	11

Tabela 4: Comparação dos resultados do teste da caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT) com a ocorrência dos tipos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas amplificados

Mastite	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>tst</i>
Negativo	-	-	1	2	-
Clínica	-	-	-	-	-
Subclínica (+)	-	-	-	-	2
Subclínica (++)	-	-	3	-	4
Subclínica (+++)	-	-	3	-	5
Total	-	-	7	2	11

Tabela 5: Associação entre a produção ou não da enzima coagulase em relação ao tipo de enterotoxina estafilocócica produzida a partir de isolados de *Staphylococcus aureus*

Coagulase	Gene <i>sec</i>	Gene <i>seg</i>	Gene <i>tst</i>	Valor Relativo (%)
Positiva	5	0	7	60,0
Negativa	2	2	4	40,0
Total	7	2	11	100,0

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Este foi o primeiro registro da ocorrência de genes codificadores da enterotoxina SEC e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em amostras de leite de vacas com mastite subclínica no estado de Pernambuco.
- Em relação à distribuição dos genes *sec*, *seg* e *tst*, é possível concluir que existe uma distribuição regional na prevalência dessas enterotoxinas e seus genes, indicando uma dispersão dos isolados de *S. aureus* em áreas geográficas específicas na microrregião Garanhuns.
- A importância da presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em leite de vaca deve ser ressaltada uma vez que esta acaba representando um potencial fator de risco para a saúde pública, sendo importante evitar também o consumo de leite cru e ter uma maior atenção em relação à higiene do seu processamento.

ANEXO. Normas para publicação de periódico *Journal of Dairy Science*



Instructions to Authors

Journal of Dairy Science: Selected Policies

Publication Charges and Page Charge Waivers

The *Journal of Dairy Science*® now offers two options for publication of articles: Standard Page Charges and Open Access.

Standard Page Charges: The current charge for publication is \$85 per printed page in the journal for articles if at least one author is a professional member of ADSA. If no authors are ADSA members, the publication charge is \$140 per journal page. The cost to publish a color figure is \$650 per color figure plus an offprint surcharge. There is charge for all offprints and reprints. An offprint order form will be sent to the corresponding author with the author proof.

Open Access: Under the new open access (OA) policy, authors may choose to pay the OA fee **in lieu of standard page charges** when author proofs are returned so that their paper becomes freely available upon publication in an online issue. The OA fee is \$1750 if at least one author is a professional member of ADSA or \$3500 if no authors are ADSA members. Open access articles will be freely accessible through the journal's web site (<http://www.journalofdairyscience.org/>) at the time of publication. All other (non-OA) articles are freely available on www.journalofdairyscience.org/ 12 months after publication.

Articles for Deposit: Author(s) publishing articles under OA shall bear sole responsibility for meeting the specific posting requirements of their funders. Upon payment of the OA fee, authors may deposit the accepted (peer-reviewed pre-typeset only) manuscript in a repository. The embargo period before deposit in a repository is 12 months (or as specified by the funder) after publication in a journal issue.

By signing the Manuscript Submission and Copyright Release Form at the time of submission, authors agree to bear responsibility for payment of publication charges.

Invoices for publication charges will be issued at the time an issue goes to press (approximately 2 weeks before being posted online). Payment is due within 30 days of receipt of the invoice. The preferred method of payment is by credit card, with credit card details submitted on the page charge form sent out with the author's proof. Payment may be made by check, drawn on a US bank. For payments by wire transfer, contact Vicki Paden at vickip@assochq.org.

Manuscripts will be withheld from publication for authors with past-due page charge invoice(s) until all prior payment obligations have been met.

Terms and Conditions

Requests to reproduce material published in JDS must be made through Elsevier's Rights Department (permissions@elsevier.com), online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>), or via the Copyright Clearance Center (<http://www.copyright.com>).

The Association grants to the authors the right of republication of their own material in any book, thesis, or dissertation of which they are authors or editors subject only to giving proper credit in the book to the original JDS publication. In addition, authors may post abstracts of manuscripts on the web at the time of submission. Once an author receives notification of acceptance, the peer-reviewed, pre-typesetting manuscript can be posted to the author's website. Authors may deposit their peer-reviewed, pre-typesetting manuscript into a repository upon payment of the open access fee (see above).

Page Charge Waivers

Authors who must use personal funds to pay for page charges and for whom such charges would entail hardship can request of the editor-in-chief that these charges be waived, under the following conditions: 1) the request must be made in writing at the time the manuscript is submitted; 2) the request should be accompanied by a statement from a financial officer or other official from the institution with which the author is affiliated, indicating the reasons why page charges cannot be paid; and 3) if the waiver is granted, the author is expected to become a professional member of ADSA. Only one waiver will be granted per institution per 12-month period. Authors who request waivers cannot order offprints or reprints. Waivers are generally granted only to authors in AGORA Band A countries (http://www.agointernet.org/en/about_agora/elegibility.html).

Submitting to the Journal

The American Dairy Science Association invites scientists from all countries to submit papers for the journal. Authors need not be members of ADSA. The instructions to authors detail the form and style required for papers submitted to the *Journal of Dairy Science* (JDS). Manuscripts that do not follow the form and style of JDS may be rejected without review. Refer to the instructions to authors when preparing the manuscript, when incorporating requested changes into revisions after review, and when checking author proofs.

Data (including graphs, figures, tables, and illustrations) must not have appeared in print except in abstracts, local or regional field reports, extension letters, or non-peer-reviewed, noncopyrighted proceedings of conferences. Material submitted to JDS should not be submitted for publication in popular magazines, company advertisements, or organizational proceedings until the author has received notification of acceptance of the manuscript. Before a manuscript is submitted, authors should have it read critically by others to facilitate review, and the senior author should have authorization to publish. All coauthors should approve the manuscript before its submission to the journal.

Authors should submit their papers electronically at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds>. See that web site for details on using the system. Authors who are unable to submit electronically should mail one copy of the manuscript and a disk with all manuscript materials (text, figures, and tables; preferably saved as a Microsoft Word file) to the JDS Editorial Office, American Dairy Science Association, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820. Staff at ADSA headquarters will post manuscripts to be reviewed by proxy, but authors who submit by mail should be aware that delays might occur in the review process.

Review of Manuscripts

Upon submission to JDS, a manuscript is assigned to an editor, who enlists reviewers to assist in the evaluation of the manuscript. The review process is confidential, which infers a bond of trust among the authors, editor, and reviewers. The editor is trustee of the manuscript until the review process is completed. The editor ensures that the review process is fair, thorough, and confidential. Reviewers are asked not to share the contents of the manuscript with anyone, except that they may ask a colleague to assist with the review with approval of the editor.

Communication with authors should only be through the editor. Reviewers should notify the editor of conflicts of interest that may compromise their ability to render a fair and unbiased review. Authors must recognize their responsibility in maintaining the confidential nature of the review. Authors should suggest names of appropriate reviewers

when submitting the manuscript and may list reviewers whom they consider unacceptable because of potential bias. These recommendations will be considered by the editor when assigning reviewers.

A reviewed paper returned to authors for revision must be returned to the editor within 6 weeks. If not, the paper may be treated as a new submission. Under unusual circumstances, editors may extend the revision deadline beyond 6 weeks.

Manuscript Submission and Copyright Agreement Form

The form (published in issues of the journal and available above) should be submitted for each paper; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release Form; manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright.

Author Proofs

Author proofs of all manuscripts will be provided to the corresponding author. Although the proof appears in a two-column page format, it should be considered a galley proof; page layout may change when the article is paginated into an issue.

The corresponding author will receive instructions for correcting the proof with the proof. Author proofs should be read carefully. Excessive author alterations to the proofs are liable to be charged to the author. Editor queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication. Responsibility for proofreading the article proof lies with the author. **Publication cannot proceed until the proofs, copyright form, and page charge form are returned to journal headquarters.**