



Instituto de Biociências de Botucatu.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

Capacidade de adesão, invasão e produção  
de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*  
isolados de leite de vacas com mastite subclínica e  
leite humano de um banco de leite.

**MIRELLA ROSSITTO ZANUTTO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para futura obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*.

*Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU – SP  
2015**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Capacidade de adesão, invasão e produção  
de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*  
isolados de leite de vacas com mastite subclínica e  
leite humano de um banco de leite.

**MIRELLA ROSSITTO ZANUTTO**  
**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. VERA LÚCIA MORES RALL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para futura obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*.

*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU – SP**  
**2015**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil  
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zanutto, Mirella Rossitto.

Capacidade de adesão, invasão e produção de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica e leite humano de um banco de leite / Mirella Rossitto Zanutto. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 33004064080P3

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Leite. 3. Adesão. 4. Células epiteliais. 5. Mastite.

Palavras-chave: Adesão; Célula epitelial mamária bovina; Invasão; Leite; *Staphylococcus aureus*.



## *DEDICATÓRIA*

Aos meus pais, Roseli e José Antonio Zanutto, por todo amor e esforços e por me oferecerem uma vida com mais qualidade através dos estudos.

Ao meu irmão, Murillo, por sempre me incentivar a seguir meus sonhos.

## *AGRADECIMENTOS*

À Deus, por ter realizado meu sonho de estudar na Unesp, que foi pedido à ele há 6 anos. Por ter me dado saúde, capacidade intelectual e força. Pela família em que nasci que sempre prezou os estudos e por todas as bênçãos recebidas em minha vida.

À minha família, tão maravilhosa, que em todos os momentos esteve ao meu lado, vibrando com minhas conquistas e me segurando pela mão e pelo coração nos momentos de dificuldade.

Ao meu irmão, que sempre foi meu maior companheiro e amigo. Por tudo que já superamos juntos. Sem ele nenhum sucesso profissional na minha vida existiria.

À minha querida professora e orientadora, Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall. Obrigada por acreditar em mim. Meus sinceros agradecimentos por ter me aceitado na sua equipe. Graças a você eu descobri uma nova paixão profissional. Agradeço aos ensinamentos, os conselhos e, sobretudo, a amizade.

Ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior, por me ensinar com muita dedicação e clareza a arte de cultivar células e por nos ceder gentilmente o espaço do seu laboratório para a realização deste trabalho, juntamente com sua equipe, em especial ao Didier e à Jacqueline.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa que me permitiu continuar meus estudos e desenvolver esse trabalho.

Aos demais funcionários, professores e discentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial, ao Lula, por alegrar minhas manhãs sempre cantando e brincando. Ao Luís, à Larissa, à Ivana e à Ana por todo o suporte e carinho.

À Profª. Drª. Teruê Sadatsune, por todos os ensinamentos e pela eterna paciência com minhas incessantes dúvidas.

À todos os colegas e amigos do laboratório por toda ajuda, excelente companhia e amizade.

Ao meu namorado e melhor amigo, José Rafael Pilan, que esteve ao meu lado dia pós dia com sorriso aberto, me mostrando o lado bom de tudo, tornando meus dias mais leves e, com seu amor, me motivando a ir mais longe.

Aos meus demais amigos da vida que sempre estiveram participando e me aconselhando de alguma forma.

*EPÍGRAFE*

“E qualquer desvio no meio do caminho e eu estaria em outro lugar, eu  
seria diferente.”

(Filme *Sob o Sol da Toscana*)



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1. ENTEROTOXINAS</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2. Staphylococcus aureus Meticilina Resistentes (MSRA)</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3. CULTURAS CELULARES</b> .....	<b>25</b>
1.3.1. Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC)- Primária.....	26
1.3.2. HeLa .....	27
1.3.3. HEp-2.....	27
<b>1.4. ADESÃO E INVASÃO CELULAR</b> .....	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>29</b>
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>42</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>44</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>45</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1. Obtenção das cepas de S. aureus</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2. Cultivos celulares utilizados nos testes de adesão e invasão</b> .....	<b>49</b>
2.2.1. Cultivo de células de epitélio mamário bovino.....	49
2.2.1.1. Caracterização de BMEC por PCR em Tempo Real (qPCR) .....	49
2.2.2. Cultivo de células HEp-2, HeLa e BMEC .....	51
<b>2.3. Teste de adesão das cepas de Staphylococcus aureus na cultura celular</b> .....	<b>51</b>
2.3.1. Avaliação Qualitativa por Microscopia para Adesão de S. aureus .....	51
2.3.2. Enumeração de S. aureus aderidos.....	52
<b>2.4. Teste de invasão das cepas de Staphylococcus aureus na cultura celular</b> .....	<b>52</b>
<b>2.5. Forma de Análise dos Resultados</b> .....	<b>53</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1. Cultivo e Caracterização de células de epitélio mamário bovino (BMEC)</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2. Teste de adesão e invasão em cultivo celular</b> .....	<b>55</b>
3.2.1. Avaliação Qualitativa por Microscopia para Adesão de S. aureus.....	55
3.2.2. Enumeração da adesão e invasão de Staphylococcus aureus em células HEp-2, HeLa e BMEC .....	55
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>68</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>70</b>

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>71</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>75</b>
<b>2.1. Obtenção das cepas de S. aureus</b> .....	<b>75</b>
<b>2.2. Pesquisa dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e do gene de resistência metilina</b> .....	<b>75</b>
2.2.1. Extração e Purificação de DNA.....	75
2.2.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR) .....	76
2.2.3. Visualização dos produtos amplificados .....	76
<b>2.3. Caracterização fenotípica da produção de enterotoxinas clássicas</b> .....	<b>77</b>
2.3.1. Produção de enterotoxinas clássicas por cepas de S. aureus .....	77
2.3.2. Pesquisa das cepas de Staphylococcus aureus metilina resistentes (MRSA) .....	78
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>78</b>
<b>3.1. Pesquisa dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e produção in vitro</b> .....	<b>78</b>
<b>3.2. Pesquisa das cepas Staphylococcus aureus metilina resistente (MRSA)</b> .....	<b>82</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHK-21= Baby hamster kidney cell (célula de rim de hamster bebê- mesodermal)

BHI = Caldo infusão de cérebro e coração

BLH = Bancos de Leite Humano

BMEC = Células epiteliais mamárias bovina

CA-MRSA= *Staphylococcus aureus* meticilina resistente provenientes da comunidade

cDNA = DNA complementar

CMH = Complexo Maior de Histocompatibilidade

DMEM = Meio de Eagle modificado de Dulbecco

EDTA = Ácido etileno diaminotetracético

FBS = Soro fetal bovino

HÁ-MRSA= *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquiridos no hospital

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

HeLa = Células de linhagem epitelial de adenocarcinoma de colo de útero (Henrietta Lacks)

HEp-2 = Células de linhagem tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano

IL = Interleucina

INCSSN = Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos de *Staphylococcus*

MDBK = Madin-Darby bovine kidney (célula de rim de bovino Madin-Darby- epitelial)

MRSA = *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

MSCRAMMs = *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

PBS = Solução Tampão de Fosfato – 0,01 M, pH 7,2

PCR = Reação em cadeia da polimerase

qPCR = Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SE = Enterotoxina estafilocócica

*S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

*S. epidermidis* = *Staphylococcus epidermidis*

TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TSA = Tryptone Soya Agar

UFC = Unidade formadora de colônia

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1:

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos e suas propriedades, utilizados na caracterização da célula epitelial de glândula mamária bovina de isolamento primário.....**p. 50**

**Tabela 2:** Expressão dos genes que codificam a produção de citoqueratina 18 (*krt 18*), vimentina (*vim bos*) e do controle endógeno (*gapdh*), por PCR em Tempo Real, das células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) (controle positivo), Baby Hamster Kidney (BHK-21) (controle negativo) e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC), isolada primariamente.....**p.54**

**Tabela 3:** Capacidade de adesão e invasão de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite humano de um banco de leite em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC), independente do tipo celular.....**p.56**

**Tabela 4:** Capacidade de adesão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite humano de um Banco de Leite e de leite de vaca com mastite subclínica em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC).....**p.57**

**Tabela 5:** Capacidade de adesão e invasão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC), independente do tipo celular.....**p.58**

**Tabela 6:** Invasão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite humano de um Banco de Leite e de leite de vaca com mastite subclínica em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC).....**p.59**

**Capítulo 2:**

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção de genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas e de resistência à meticilina.....p.77

**Tabela 2:** Frequencia dos genes responsáveis pela produção de algumas enterotoxinas, por *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica e de leite humano de um banco de leite (2013).....p.79

**Tabela 3:** Perfil genotípico das enterotoxinas das cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados a partir de amostras de leite de vaca com mastite subclínica e de leite humano de um banco de leite (2013).....p.81

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1:

**Figuras 1 e 2:** Microscopia óptica do cultivo celular primário de epitélio mamário bovino.....**p.53**

**Figura 3:** Microscopia óptica de adesão de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite humano em cultivo celular de linhagem HEp-2.....**p.55**

**Figura 4:** Enumeração de *Staphylococcus aureus* com capacidade de adesão em células HEp-2.....**p.57**

### Capítulo 2:

**Figura 1:** Gel de eletroforese do produto da PCR das enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*. ATCC 13565 (sea - 120 pb), ATCC 14458 (seb - 478 pb), ATCC 19095 (sec - 257 pb), FRI 361 (sed – 317 pb; seg - 287 pb; sei - 454 pb e sej - 142 pb), ATCC 27664 (see – 209 pb) e FRI 137 (seh – 213 pb).....**p.80**

**Figura 2:** Microplaca utilizada para testes qualitativos da produção de enterotoxinas in vitro, por *Staphylococcus aureus*. A imagem ilustra o resultado negativo de produção de enterotoxinas (representado por um ponto) e o resultado positivo (representado pela formação de grânulos).....**p.80**

**Figura 3:** Gel de eletroforese do produto da PCR dos *Staphylococcus aureus* expressando gene *mecA* em cepas meticilina resistente.....**p.82**

**Figura 4:** Teste de difusão em disco utilizando os antibióticos oxacilina e cefoxitina para avaliar *Staphylococcus aureus* meticilina resistente.....**p.82**

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos envolvidos na mastite humana e bovina. Entre seus diversos fatores de virulência está a capacidade de aderir e invadir células do epitélio mamário, estabelecendo a doença, produzir enterotoxinas que podem causar intoxicações de origem alimentar, caso haja consumo do leite contaminado. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o potencial de adesão e de invasão de *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica e de leite humano de um Banco de Leite, em cultura de células epiteliais mamárias bovinas (BMECs), HEP-2 e HeLa, pesquisar os genes envolvidos na formação de algumas enterotoxinas por PCR, verificar a produção das enterotoxinas clássicas *in vitro* e pesquisar a presença do gene *mecA*, que confere resistência à vários antibióticos beta lactâmicos. Foram utilizados 20 isolados de *S. aureus*, de leite de vacas com mastite subclínica e 20 de leite humano de um Banco de Leite, de um hospital público, na cidade de Botucatu, SP. Os isolados de leite humano apresentaram melhor adesão em células HeLa ( $p=0,043$ ), enquanto os isolados de leite bovino aderiram melhor em células HEP-2 e BMEC ( $p=0,01$ ). Nos testes de invasão, os isolados de leite humano e bovino invadiram os três tipos celulares indistintamente em porcentagens de invasão de 1 a 62,5% para *S. aureus* de origem humana e de 0,7 a 100%, para isolados de origem bovina. O gene que codifica a enterotoxina G (*seg*) foi o mais frequente em ambos os tipos de leite, com prevalência de 90% ( $n=18$ ) e 80% ( $n=16$ ), em humanos e bovinos, respectivamente. No leite humano, *sea* foi o segundo mais prevalente, com 75% ( $n=15$ ), dos quais 11 (73,3%) produziram SEA *in vitro*, seguido de *sec*, que foi observado em 9 (45%) isolados, dos quais 4 (44,5%) produziram a enterotoxina *in vitro*. Os genes *sea* e *sec* foram observados, simultaneamente, em 6 desses isolados e 2 deles produziram ambas as enterotoxinas. Em relação ao leite bovino, *sec* e *seh* foram os mais frequentes, depois de *seg*, ocorrendo em 12 isolados (60%) e a produção de SEC ocorreu em 8 dessas cepas (66,6%). O *sea* ocorreu em 8 (40%) isolados, dos quais 4 (50%) foram produtores de SEA. A pesquisa de cepas metilicina- resistentes (MRSA) foi realizada apenas em isolados de origem humana, com três cepas positivas no teste de difusão em disco e pela presença do gene *mecA*. Concluiu-se que, para os testes de adesão e invasão de *S. aureus*, independente da origem das cepas, podem ser usadas linhagens celulares de origem humana, já pré-estabelecidas, evitando-se o laborioso processo de obtenção de uma linhagem celular primária. Os resultados também mostraram que cepas isoladas



do leite humano, oriundos provavelmente da microbiota da pele das nutrizes, podem ser reservatórios de MRSA. Além disso, o leite humano de bancos de leite pode causar intoxicação alimentar em recém-nascidos e de origem bovina e seus derivados também podem causar intoxicação aos consumidores, devido à presença dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e a verificação da produção *in vitro*, pelas cepas de *S. aureus*, se esse leite for estocado de maneira imprópria, mesmo após a pasteurização.

Palavras-chave: mastite, *Staphylococcus aureus*, Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC), HEp-2, HeLa, enterotoxinas, MRSA.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is one of the main pathogens involved in human and bovine mastitis. Among his many virulence factors is the ability to adhere and invade mammary epithelial cells, establishing the disease, produce enterotoxin that can cause foodborne poisoning, if any contaminated milk consumption. The objective of this study was to evaluate and compare the potential of adherence and invasion of *S. aureus*, isolated from dairy cows with subclinical mastitis and breast milk from a milk bank in culture bovine mammary epithelial cells (BMEC), HEp -2 and HeLa, searching genes involved in the formation of certain enterotoxins by PCR, verify the production of enterotoxins classical *in vitro* and investigate the presence of the *mecA* gene, which confers resistance to various beta lactam antibiotics. Were used 20 *S. aureus* isolates from milk cows with subclinical mastitis and 20 human milk from a milk bank of a public hospital in the city of Botucatu, SP. The isolated human milk showed better adhesion to HeLa cells ( $p = 0.043$ ), while isolates from bovine milk adhered better to HEp-2 cells and BMEC ( $p = 0.01$ ). In invasion testing, isolates from human milk and bovine invaded the three cell types indistinctly in percentage from 1 to 62.5% invasion for *S. aureus* of human origin and 0.7 to 100% for isolates from bovine origin. It was concluded that the adhesion test for human isolates can be used and HeLa cells isolated from bovine origin, can be used Hep-2 and BMEC cells. For testing invasion any cell type may be utilized for *S. aureus* from both origins. The gene encoding the enterotoxin C (*sec*) was the most common in both types of milk, with a prevalence of 90% ( $n = 18$ ) and 80% ( $n = 16$ ) in human and bovine, respectively. In human milk, *sea* was the most prevalent second, with 75% ( $n = 15$ ), of which 11 (73.3%) produced SEA *in vitro*, followed *sec*, which was observed in 9 (45%) isolates of which 4 (44.5%) enterotoxin produced *in vitro*. The *sea* and *sec* genes were observed simultaneously in these isolates 6 and 2 produced enterotoxins. In relation to bovine milk, *sec* and *seh* were the most frequent, after *sec*, occurring in 12 isolates (60%) and the production of SEC occurred in 8 of these strains (66.6%). The *sea* occurred in 8 (40%) isolates of which 4 (50%) were SEA producers. The search methicillin resistant strains (MRSA) has been performed only on isolated human origin, with three was positive in disk diffusion test and in the presence of the *mecA* gene. The results allow the use of pre-established cell lines, avoiding the laborious process of obtaining a primary cell line. The results also showed that strains isolated from human milk coming from the microbiota of mothers

may be MRSA reservoirs. Furthermore, human milk from milk banks may cause food poisoning in newborns and bovine milk and their subproducts can also cause poisoning because the presence of the genes and the production of enterotoxins *in vitro* by strains of *S. aureus*, if milk is stored improperly, even after pasteurization.

Keywords: mastitis, *Staphylococcus aureus*, Bovine Epithelial Mammary Cell (BMEC), HEp-2, HeLa, enterotoxin, MRSA.

# 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto produtor mundial de leite e derivados, desempenhando um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. Para cada dólar na produção no sistema agroindustrial do leite, há acréscimo de, aproximadamente, cinco dólares no Produto Interno Bruto-PIB (YANKJUNIOR, 2014). Entretanto, esse sistema pode ser afetado por diferentes problemas que afetam a cadeia produtiva do leite, como a mastite bovina.

A mastite é uma inflamação nas glândulas mamárias de vacas, geralmente causada por infecção bacteriana (NAWROTEK et al., 2011), sendo reconhecida como uma das principais doenças que afetam o gado leiteiro e causando perdas financeiras devido a redução na produção de leite, depreciação da qualidade nutritiva (por mudanças físico-químicas), descarte de leite, desencadeamento de patologias nos tetos das vacas, custos com serviços veterinários e medicamentos, reposição de vacas, além do tempo extra perdido no manejo e cuidados com o animal infectado (LACASSE & ZHAO, 2008; SAEI et al., 2009).

Os agentes etiológicos da mastite podem ser classificados em ambientais e contagiosos, de acordo com a fonte de infecção. Na ambiental, a vaca se infecta por micro-organismos encontrados no ambiente (COSTA, 1998; RADOSTITS et al., 2002), sendo os coliformes os mais comuns, principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. (VOLTOLINI et al., 2001). Na mastite contagiosa, o agente é encontrado no úbere e é transmitido durante a ordenha, sendo os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, os patógenos prevalentes (Mc DOUGALL et al., 2002; MORONI et al., 2005).

O primeiro relato de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* ocorreu em 1914, após o consumo de leite de vaca com mastite, causada por *S. aureus* (HENNEKINNE et al., 2012). Esse gênero bacteriano é o mais frequentemente isolado de casos de mastite (MAROGNA et al., 2011), sendo o *S. aureus*, o agente etiológico predominante das mastites bovinas clínicas e subclínicas. É um patógeno ubíquo e o mais difícil de erradicar no rebanho, causando casos severos e agudos ou infecções crônicas (CHENG et al., 2010; MARTINS et al., 2010).

A mastite subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica e de saúde pública por alastra-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas

alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou de sua secreção, causando maior prejuízo econômico por não poder ser diagnosticada previamente (BARBALHO & MOTA, 2001; MARTINS et al., 2010).

Em humanos, o leite materno é a nutrição ideal para recém-nascidos e crianças de até 6 meses de vida devido à sua composição de mais de 250 nutrientes essenciais a saúde do bebê que auxiliam na maturação do indivíduo. O leite humano oferece proteção contra várias infecções respiratórias, diarreia, septicemia, vômito, otite média, entre outras, já que possui agentes anti-inflamatórios, anticorpos e modula o sistema imune (WAUBEN et al., 1998; HAMOSH, 2001; SILVA, 2004).

A mortalidade infantil ainda é um tema preocupante em todo o mundo. Apesar dos grandes avanços na nutrição e higiene, as infecções e a ausência da amamentação são algumas das principais causas de morbidade e mortalidade infantil no mundo. O aleitamento materno é capaz de prevenir 6 milhões de mortes em crianças de até 1 ano, pois neonatos e lactentes são imunologicamente imaturos, tornando-se mais susceptíveis a infecções (GIUGLIANI, 1994; LAWRENCE & PANE, 2007).

Os Bancos de Leite Humano (BLH) foram implementados pelo Ministério da Saúde em 1981, sendo responsáveis em oferecer proteção, apoio e incentivo ao aleitamento materno para crianças que não receberam o aleitamento materno por algum motivo clínico ou social, realizando a seleção das doadoras, coleta, processamento, controle de qualidade do leite e distribuição do produto aos lactentes (BRITO et al., 2002; HINRICHSEN, 2004; BRASIL, 2006). Esta iniciativa evita a perda de, aproximadamente, 180 milhões de litros de leite humano e, economicamente, proporciona uma economia de 540 milhões de reais por ano no Brasil (ALMEIDA & GOMES, no prelo).

A oferta do leite humano em Banco de leite é destinada, preferencialmente, à recém-nascidos de risco ou bebês doentes, prevenindo-os contra doenças e reduzindo a mortalidade. Para que isto ocorra e se expanda, a RDC Nº 171 (ANVISA, 2006) informa e capacita os profissionais de saúde de forma a garantir a qualidade do leite fornecido pelos BLHs, cumprindo com o estabelecido no Pacto da Saúde (no Brasil) e na Declaração do Milênio (em 191 países). Além disso, os BLHs são responsáveis por qualquer irregularidade encontrada no leite distribuído, registrando todas as etapas do processo e garantindo a rastreabilidade pela Vigilância Sanitária, em caso de surto (FIOCRUZ, 2014a).

A qualidade do leite ofertado pelos BLHs é de interesse à saúde pública, uma vez que os receptores deste produto possuem déficit no sistema imunológico (CARMO et al., 1990). Para que este alimento não cause agravos à saúde do bebê é necessário que passe por criterioso processo de controle de qualidade, além de condições higiênico-sanitárias adequadas durante ordenha, a fim de se evitar a contaminação do leite.

Apesar das diversas vantagens do leite materno, este não possui proteção física contra contaminantes da microbiota primária (micro-organismos que passam diretamente pela corrente sanguínea, como o vírus do HIV) ou contra a microbiota secundária (oriundos da pele materna e meio ambiente, devido manipulação em condições higiênico-sanitárias insuficientes), podendo sofrer contaminação pela manipulação das lactantes e dos profissionais dos BLHs (ALMEIDA, 1999; GIUGLIANI, 2000). *S. aureus* também é um dos principais agentes etiológicos de mastite em mulheres lactentes, doença que pode afetar até 30% das nutrizes (JONSSON & PULKKINEM, 1994).

Kinlay et al. (2000) realizaram um estudo com 1075 mulheres, que declararam ter interesse em amamentar e dessas, 20% apresentaram mastite. Foxman et al. (2002) avaliaram 840 lactentes por 12 semanas, com incidência de mastite de 9,5%. Embora esses trabalhos não tenham disponibilizado o número de casos associados à *S. aureus*, Amir (2002) afirmou que este patógeno prevalece como principal agente etiológico na mastite puerperal (humana).

Do ponto de vista microbiológico, embora devesse haver cuidado extremo com este alimento, podem ocorrer falhas na cadeia do processo que tornam o leite uma possível fonte de infecção para os receptores (GIUGLIANI, 2000). Para o controle microbiológico, a RDC N° 171 (ANVISA, 2006) preconiza a ausência de coliformes totais no leite pasteurizado, que indicaria a qualidade higiênica durante a ordenha ou manipulação do leite.

Além da preocupação quanto à forma como este leite é coletado e conservado pelas doadoras até chegar ao profissional do BLH, ainda há o problema deste produto ser analisado microbiologicamente apenas após a pasteurização. Caso o leite cru apresente contaminação bacteriana, o dano pode ser irreversível mesmo após a pasteurização, uma vez que pode estar contaminado com bactérias produtoras de enterotoxinas termoestáveis, como *S. aureus*.

NG et al. (2004) analisaram 59 amostras de leite materno de um banco de leite na China, das quais, 2 amostras estavam contaminadas por *S. aureus*, com contagens de

1,4 x 10<sup>5</sup> e 2,8 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, sendo que, a quantidade elevada desta bactéria no leite pode desencadear doenças de origem alimentar, se fossem cepas enterotoxigênicas.

Desta forma, cuidados com a higienização e antissepsia durante a lactação, ordenha e estocagem devem ser observados para garantir a segurança no consumo deste alimento e auxiliar na redução dos índices de infecções causadas por mastite e, conseqüentemente, nos quadros de intoxicações de origem alimentar, perdas agropecuárias e mortalidade infantil.

### **1.1. ENTEROTOXINAS**

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) clássicas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de, aproximadamente, 30 KD. Os cinco tipos sorológicos clássicos foram identificados e designados pelas letras de A a E (SEA – SEE) (BERGDOLL & ROBBINS, 1973, BERGDOLL et al, 1981), ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, com duas cisteínas formando ponte de dissulfeto (BERGDOLL, 1981). Além das clássicas, outras enterotoxinas tem sido descritas e seus genes seqüenciados, sendo nomeadas como enterotoxinas G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V e X (JARRAUD et al., 2001; KURODA et al., 2001; ORWIN et al., 2001; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003; THOMAS et al., 2006; WILSON et al., 2011). Até o momento somente SEG, SEH e SEI mostraram atividade emética (OMOE et al., 2003).

Os genes das enterotoxinas estafilocócicas podem ser carreados por plasmídios (*seb*, *sed* e *sej*) (BAYLES E IANDOLO, 1989; ZHANG et al., 1998), por fagos (*sea* e *see*) (BETLEY E MEKALANOS, 1985) ou por cromossomos (*seb*, *sec*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*) (FITZGERALD et al., 2001; JARRAUD et al., 2001; ORWIN et al., 2001, 2003; OMOE et al., 2002; LETETRE et al., 2003).

A enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) é a mais comumente implicada nos casos de intoxicação alimentar, sendo composto por 771 pares de base (BORST & BETLEY, 1994). O gene *seb* regula a produção da enterotoxina do tipo B (SEB), que apresenta, aproximadamente, 900 nucleotídeos (JOHNS & KHAN, 1988). Esse gene pode estar integrado ao DNA bacteriano, no caso de amostras clínicas ou carreado por um plasmídio de 750Kb, em amostras de outras origens (SHAFER & IANDOLO, 1978). Entre as diferentes enterotoxinas, SEA é a mais comumente associado com intoxicação alimentar (ORDEN et al, 1992).

O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC3. Segundo Marr et al. (1993), a enterotoxina C é heterogênea e apresenta variações antigênicas em sua seqüência molecular.

A enterotoxina estafilocócica tipo D (SED) é o segundo tipo mais comum, associado a casos de intoxicação alimentar. O gene responsável por essa toxina está localizado no plasmídeo PIB 485 (BAYLES e IANDOLO, 1989). O gene para a enterotoxina E (SEE) codifica uma proteína de 29 Kda (VAN de BUSSCHE et al., 1993). Em 1992, Betley et al. caracterizaram a toxina G e REN *et al.* (1994), sequenciaram o gene da toxina H. Mempel et al. (2003) observaram que os genes para as toxinas G, I, M, N e O pertencem ao mesmo *cluster* e a detecção de um desses genes, geralmente indica a presença dos outros quatro.

A enterotoxina tipo I (SEI), codificada pelo gene *sei*, apresenta a menor homologia entre as enterotoxinas, apresentando 218 nucleotídeos e, junto com a SEG, têm a capacidade de causar resposta emética e proliferação de células T, com produção de Interleucina II e Interferon gama (MUNSON et al., 1998).

As novas enterotoxinas tem sido designadas como membros da família das enterotoxinas estafilocócicas baseadas na sequencia de similaridade com as enterotoxinas clássicas. O Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos de *Staphylococcus* (INCSSN) recomendou que somente superantígenos que induzam emese por administração oral em experiências utilizando primatas sejam chamadas de enterotoxinas, enquanto outras toxinas relacionadas, mas que não causam emese nesse modelo experimental sejam designadas como “enterotoxina estafilocócica semelhante a superantígeno” (staphylococcal enterotoxin-like (Sel) superantigens) (LINA et al., 2004). Baseando-se nas recomendações do INCSSN, as toxinas SEJ, SEK, ..., SEX deveriam ser renomeadas como SEIJ, SEIK, ..., SEIX, respectivamente (OMOE et al, 2005). Com exceção de SEH, SEI e SEG, que já apresentaram atividade emética (SU & WONG, 1995; MUNSON et al., 1998), o envolvimento das outras SEI em surtos de origem alimentar ainda não está totalmente esclarecido.

As SE são consideradas superantígenos por ligarem-se ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II, na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, simultaneamente, ocasionando liberação exacerbada de citocinas pelo sistema imune do hospedeiro. Os sintomas da intoxicação estafilocócica englobam febre alta, vômito, dor abdominal, dor de cabeça, câibra muscular, diarreia,



calafrio, prostração e disfunções hepáticas e renais. A doença é autoeliminada e dura de 24 -48h (BERGDOLL, 1989; FERNANDEZ et al., 2006).

A intoxicação ocorre após a ingestão de alimentos contaminados com as toxinas pré-formadas e, aproximadamente, 95% dos surtos são causados por alguma SE clássica (SEA a SEE). As enterotoxinas são capazes de permanecer ativas no meio ambiente por vários dias, além de resistirem a várias enzimas proteolíticas, permitindo sua passagem pelo trato gastrointestinal sem perda de atividade (CLIVER, 1994; HUY, 1994). Entre as características das SEs, uma das mais relevantes é a resistência à pasteurização, devido ao seu perfil termoestável (100°/30'). Sendo assim, o leite pasteurizado pode apresentar risco à saúde, já que a pasteurização elimina a bactéria, mas não a enterotoxina.

Existe uma grande controvérsia sobre o papel das enterotoxinas na mastite. Segundo Sutra & Poutrel (1994), SEC e SED são as mais importantes nos processos infecciosos intramamários, uma vez que induzem a liberação de fatores inflamatórios. Zecconi et al. (2006) identificaram ao menos um gene das enterotoxinas em todos os bovinos estudados na Itália e o gene *sej*, em particular, pareceu ser um fator de risco. Por outro lado, autores como Larsen et al. (2000) argumentaram que os genes dessas enterotoxinas não parecem ter um papel importante no quadro de mastite, uma vez que somente 1 em 414 animais com mastite apresentou *S. aureus* com o gene *sec*, na Dinamarca.

De acordo com Tranter (1996), a ingestão de, pelo menos, 1 µg de toxina em 100g de alimento já induz o aparecimento de sintomas clínicos e a toxina começa a ser produzida quando a população de *S. aureus* excede 10<sup>5</sup> UFC/g (*quorum sensing*). Já segundo Balaban & Rasooly (2001), a dose mínima de enterotoxinas ingerida para a ocorrência desses sintomas é menor, de 10 ng. Assim, devido à importância destas toxinas na saúde pública, uma triagem eficiente para detectar a prevalência de cepas enterotóxicas nos alimentos é necessária, neste caso, tanto no leite de origem animal, quanto no leite de origem humana, principalmente devido ao seu caráter termoestável.

## **1.2. *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes (MSRA)**

A partir da década de 60, com o aparecimento de cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina, pela produção de enzimas que hidrolizam o anel β-lactâmico, foi desenvolvido um anel β- lactâmico sintético, a meticilina. Porém, resistente as β-

lactamases produzidas pelo *S. aureus*. Entretanto, rapidamente surgiram cepas resistentes, denominadas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (HIRAMATSU et al., 2002).

Os antimicrobianos  $\beta$ - lactâmicos impedem que as proteínas que sintetizam a parede celular (PBPs- proteínas ligadoras de penicilina) consigam formar a parede, causando lise bacteriana. Os patógenos resistentes a meticilina adquiriram um elemento genético móvel, o gene *mecA*, integrante de um elemento genômico denominado “cassete cromossômico estafilocócico mec” (SCCmec), que conferiu o desenvolvimento de uma PBP adicional (PBP2), que possuem baixa afinidade à oxacilina e a outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (LOWY, 2003; SANTOS et al., 2007).

As infecções causadas por MRSA tem crescimento contínuo em instituições hospitalares, em todo mundo. Anteriormente, as infecções por MRSA estavam relacionadas exclusivamente a casos hospitalares (HA-MRSA), contudo, gradativamente, essas infecções passaram a ser documentadas como adquiridas ou associadas na comunidade (CA-MRSA). As CA-MRSA possuem menor resistência a antibióticos e não possuem ligação aparente com o sistema hospitalar, sendo responsáveis por infecções de pele e subcutânea, como impetigo, erisipela, celulite e foliculite, em população não ligada ao sistema de saúde (BUSTOS-MARTÍNEZ et al., 2006; COHEN et al., 2008).

Segundo NOVAK et al. (2000), em 500 amostras de leite humano originadas de várias cidades brasileiras, foram identificadas 171 cepas de *S. aureus*, dentre as quais, 57 eram MRSA e 7 amostras também eram enterotoxigênicas.

Pinheiro (2008) realizou um estudo com 44 mulheres com mastite associada a *S. aureus* (grupo caso) e 88 mulheres sem doença (grupo controle). Destas, 87% das cepas isoladas foram resistentes à penicilina e 100% sensíveis à vancomicina. Cepas MRSA foram observadas em 11,3% do grupo caso e 7,1% do grupo controle.

### **1.3. CULTURAS CELULARES**

As células de culturas são classificadas em primárias, de linhagem e transformadas.

As células primárias provêm de um fragmento de tecido, a partir do qual pode ser realizado um explante. Essas células mantêm as características do tecido original,

preservando as informações genóticas e fenóticas, sendo recomendadas para comparar seu comportamento *in vitro* (FIOCRUZ, 2014b). Porém, são mais difíceis de serem cultivadas e não proliferam normalmente, devido à alta capacidade de realizar apoptose.

As células de linhagem mantêm as características do tecido de origem, mas possuem alta taxa de proliferação, ao contrário das primárias. Desta forma, são as mais utilizadas para pesquisa, como a HEp-2 e a HeLa.

Quando as características genéticas são alteradas, a morfologia dessas células também se alteram, quando comparada à morfologia do tecido original, sendo chamadas de transformadas. A luz ultravioleta, compostos químicos e vírus são exemplos de agentes capazes de transformar células. A transformação celular consiste em uma alteração genética em genes que controlam o ciclo celular, ou seja, super- expressão de proto-oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. Levando-se em consideração seu comportamento, essas células não são utilizadas para vacinas, já que há o risco da alteração no DNA celular causar alteração no DNA do indivíduo que fizer uso da vacina.

Sistemas de culturas celulares são empregados no estudo de características de patógenos, pois micro-organismos patogênicos apresentam diversos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, como a capacidade de adesão e invasão (FINLAY, 1990).

### **1.3.1. Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC)- Primária**

As células epiteliais mamárias bovinas sintetizam citoqueratina e proteínas desmossomais (SCHMID et al., 1983b). Essas células possuem uma morfologia atípica, apresentando aspecto alongado com processos longos delgados que se sobrepõe à superfície das células vizinhas e quando cultivadas, sintetizam baixo nível de caseína, proteína encontrada no leite (SCHMID et al., 1983a).

O potencial que algumas cepas têm de invadir as células epiteliais mamárias bovinas (BMECs) é um importante fator para o estabelecimento da mastite (ANAYA-LÓPEZ et al., 2006). Almeida et al. (1996) demonstraram que *S.aureus* foi capaz de invadir e se replicar dentro de células epiteliais mamárias bovinas. Anaya-López et al. (2006) testaram a capacidade de invasão de cepas de diferentes espécies de

*Staphylococcus* e apenas *S.aureus* e *S.epidermidis* foram capazes de invadir BMECs, em níveis similares ao controle positivo.

A compreensão de como as células se comportam frente a um patógeno é necessária para maiores esclarecimentos sobre sinalização durante condições de estresse, adesão e invasão celular, bem como sobre o desenvolvimento da infecção bacteriana.

### **1.3.2. HeLa**

As células HeLa foram estabelecidas em 1951, após uma mulher de 31 anos, Henrietta Lacks, desenvolver um tumor maligno de colo de útero. O médico responsável, Dr. George Gey cultivou essas células, estabelecendo a linhagem, que é utilizada até hoje em todo o mundo (JONES et al., 1971). Devido a sua alta taxa de proliferação, essas células possibilitaram inúmeros tipos de pesquisa, como o desenvolvimento da vacina de poliovírus e pesquisas de citotoxicidade (FIOCRUZ, 2014b).

### **1.3.3. HEp-2**

A origem das células HEp-2 ocorreu em 1952, a partir de um tumor metastático nodular de um paciente masculino de 57 com câncer de laringe. Através de procedimento cirúrgico, as células foram removidas e implantadas em ratas imunossuprimidas por irradiação com raio-X e cortisona, para serem estabelecidas para cultivo celular (FJELDE, 1955).

## **1.4. ADESÃO E INVASÃO CELULAR**

A adesão de *S. aureus* nas células hospedeiras é essencial para o estabelecimento da mastite, porque posiciona o patógeno no tecido alvo apropriado. Após a adesão, algumas bactérias patogênicas permanecem localizadas extracelularmente (MOLINARI & CHHATWAL, 1999). Entretanto, pode haver internalização por fagocitose e alguns patógenos bacterianos conseguem induzir sua internalização por células não fagocitárias, mecanismo conhecido como invasão (FINLAY & COSSART, 1997).

*S. aureus* não é um patógeno intracelular obrigatório. Esta bactéria liga-se à fibronectina (KUUSELA, 1978; HERRMANN et al., 1988), laminina (LOPES et al.,

1985) e colágeno tipo IV da célula (FINLAY, 1990). A bactéria pode aderir, ainda, a uma superfície através de um antígeno capsular polissacarídico denominado polissacarídeo/adesina capsular (PS/A). Em seguida ocorre multiplicação para formar um biofilme de múltiplas camadas que está associado com a produção de adesina polissacarídica intracelular/proteína de adesão intracelular (PIA) (KRISTIAN et al., 2004).

A invasão requer dois passos principais: adesão à superfície da célula hospedeira e internalização. Esses passos envolvem a participação da bactéria patogênica e da célula eucariótica hospedeira, pois ambas precisam facilitar a aderência, proporcionando ligantes e seus receptores correspondentes. Além disso, a bactéria precisa transmitir um sinal de invasão através da membrana da célula hospedeira para induzir os rearranjos de citoesqueleto necessários para a entrada do patógeno. (TANG et al., 1993). Segundo Veiga et al. (2007), *S.aureus* expressa proteínas de invasão que interagem diretamente ou indiretamente com receptores da célula hospedeira, iniciando uma cascata de sinalização que resulta em extensões da membrana que circundam a bactéria e a internaliza.

A internalização das bactérias patogênicas pelas células hospedeiras permite às bactérias ocupar um microambiente livre de mecanismos de defesa dos hospedeiros, que chegam a atingir a superfície dessas células (FINLAY & COSSART, 1997). Dentro das células, as bactérias garantem uma fonte de nutrientes e ficam protegidas não só do sistema de defesa do hospedeiro, como também da ação de antibióticos (CIFRIAN et al., 1994; ALVA-MURILLO et al., 2011).

## 2. OBJETIVO

- Avaliar o potencial de adesão e invasão de cepas de *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica e de leite humano de um banco de leite, em culturas de células de epitélio mamário bovino (BMEC), HeLa e HEp 2.
- Comparar a eficiência de adesão e invasão nas três linhagens celulares, levando-se em conta a origem das cepas.
- Caracterizar genotipicamente as cepas, quanto à presença de genes responsáveis pela produção de algumas enterotoxinas (clássicas, *seg*, *seh* e *sei*).
- Verificação da produção das enterotoxinas clássicas, pelas cepas de *S. aureus*.

### 3. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.A.G. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: Fiocruz, 120p, 1999.

ALMEIDA, R.A.; MATTHEWS, K.R.; CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; OLIVER, S.P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1021-1026, 1996.

ALMEIDA, J.A.G.; GOMES, R. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. **Ver Latino-Amer. Enf** (no prelo).

ALVA-MURILLO, N.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. **Veterinary Microbiology**, v. 55, n. 2–4, p. 324–331, 2011.

AMIR, L.H. Breastfeeding and *Staphylococcus aureus*: Three case reports. **Breastfeed Rev.** v. 10, n.1, p-15-8, 2002.

ANAYA-LÓPEZ, J.; CONTRERAS-GUZMÁN, O.E.; CÁRABEZ-TREJO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; OCHOA-ZARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 358–361, 2006.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 64, p. 33-40, 2001.

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R.A. Isolation of bacterial agents associated with subclinical mastitis in bovine in the State of Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.

BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BETLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B.; Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and Streptococcal exotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chemistry and Immunology**, v.55, p.1-35, 1992.

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**. v. 229, p. 185-187, 1985.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. Bacterial foodborne pathogens. New York: Marcel Dekker, p. 464-523, 1989.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock-syndrome in *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**, v.1, p.1017, 1981.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 36, p. 610-2, 1973.

BORST, D.W.; BETLEY, M.J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with sea allele class. **Infection and Immunity**, v.62, p. 113-118, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2006.

BRITTO, M.G.M.; BARBOSA, L.L.; HAMANN, E.M. Avaliação sanitária dos bancos de leite humano na rede hospitalar do Distrito Federal. **Revista de Saúde do Distrito Federal**, v.13, n. 3/4, p. 17-28, 2002.



BUSTOS-MARTÍNEZ, J.A.; HAMDAN-PARTIDA, A.; GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. **Revista de Biomedicina**, v. 17, p.287-305, 2006.

CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Revista de Microbiologia**, v.21, p.320-323, 1990.

CHENG, D.; ZHU, S.; YIN, Z.; DING, W.; UM, Z.; SU, Z.; SUN, H. Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. **African Journal Of Microbiology Research**, v. 4, n. 11, p. 1110-1116, 2010.

CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N.; NICKERSON, S.C.; MARQUARDT, W.W. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.970-983, 1994.

CLIVER, D.O. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker, 1994, 613p.

COHEN, E.C.; AUSTIN, J.; WEINSTEIN, M.; MATLOW, A.; REDELMEIER, D.A. Cohort Study Care of Children Isolated for Infection Control: A Prospective Observational. **Pediatrics**, v. 122, p.411-415, 2008.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 1, p. 3-9, 1998.

FERNANDEZ, M.M.; MARZI, M.C., BERGUER, P.; BURYZN, D.; LANGLEY, R.J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 927, 938, 2006.

FINLAY, B.B. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 2, p. 815-820, 1990.

FINLAY, B.B.; COSSART, P. Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens. **Science**, v. 276, n.718, 1997.

FIOCRUZ. National Network Human Milk Banks from Health Minister- Brazil. Disponível em <http://www.redeblh.fiocruz.br>. Acessado em: 23/06/2014 (a).

FIOCRUZ. Cultivo Celular. Disponível em [http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo\\_5\\_vol2.pdf](http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf). Acessado em 10 de julho de 2014 (b).

FITZGERALD, J.R.; MONDAY, S.R.; FOSTER, T.J.; BOHACH, G.A.; HARTIGAM, P.J.; MEANEY, W.J.; SMITH, C.J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 63-70, 2001.

FJELDE, A. Human tumor cells in tissue culture. **Cancer**. v. 4, p, 845-851, 1955.

FOXMAN, B.; D'ARCY, H.; GILLESPIE, B.; BOBO, J.K.; SCHWARTZ, K. Lactation mastitis: Occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. **American Journal of Epidemiology**, v. 55, n. 2, p. 103-113, 2002.

GIUGLIANI, E.R.J. Amamentação: como e porque promover. Rio de Janeiro: **Jornal de Pediatria**, v.70, n.3, p.138-151, 1994.

GIUGLIANI, E.R.J. O aleitamento materno na prática clínica. Rio de Janeiro: **Jornal de Pediatria**, v.76, n.3, p.238-252, 2000.

HAMOSH, M. Bioactive factors in human milk. Breastfeeding- The evidence for breastfeeding. **Pediatrics Clinics of North America**, v.48, n.1, p.69-86, 2001.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Review**, v. 36, p.815-836, 2012.

HERRMANN, M.; VAUDAUX, P.E.; PITTET, D.; AUCKENTALER, R.; LEW, P.D.; SCHUMAKER-PERDREAU, F.; PETERS, G.; WALDVOGEL, F.A. Fibronectin, fibrinogen, and laminin as mediators of adherence of clinical Staphylococcal isolates of foreign material. **Journal of Infectious Disease**, v.158, p.693-701, 1988.

HINRICHSEN, S.L. Biossegurança e controle de infecções: risco sanitário hospitalar. Rio de Janeiro: **Medsa**, p. 153-157, 2004.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YUZAWA, H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 67-74, 2002.

HUY, Y.H. Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker; 1994.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. Cgc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of immunology**, v. 166, n.1, p.669-677, 2001.

JOHNS JUNIOR, M.B.; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4033-4039, 1988.

JONSSON, S.; PULKKINEN, M.O. Mastitis today: incidence, prevention and treatment. **Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Supplementum**, v.208, p.84-87, 1994.

JONES, H.W., JR., V.A. MCKUSICK, et al. George Otto Gey (1899–1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. **Obstetrics and Gynecology**, v. 38, n.6, p. 945–949, 1971.

KINLAY, J.R.; O'CONNELL, D.L.; KINLAY, S. Incidence of mastitis in breastfeeding women during the six months after delivery: a prospective cohort study. **Journal of Public Health**, v. 25, p. 115-120, 2000.

KRISTIAN, S.A.; GOLDA, T.; FERRACIN, F.; CRAMTON, S.E.; NEUMEISTER, B.; PESCHEL, A.; GÖTZA, F.; LANDMANN, R. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 237–245, 2004.

KURODA, M.; et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v.357,n.9264, p. 1225-1250, 2001.

KUUSELA, P. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. **Nature**.v. 276, p. 718-720, 1978.

LACASSE, P.; ZHAO, X. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and Control. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 57-65, 2008.

LARSEN, H.D., HUDA, A., ERIKSEN, N.H.R., JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, n. 76, p.153–162. 2000.

LAWRENCE, R.M.; PANE, C.A. Human Breast Milk: Current concepts of immunology and infectious diseases. **Pediatric and Adolescent Health Care**. p. 7-36, 2007.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.38-43, 2003.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K., JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 2334-2336, 2004.

LOPES, J.D.; DOS REIS, M.; BRENTANI, R.R. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. **Science**. v. 229, p.275-277, 1985.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.9, p. 1265-1273, 2003.

MAROGNA, G.; PILO, C.; VIDILI, A.; TOLA, S.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S.G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 102, n. 1, p. 74-83, 2011.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; DAVIS, W. C; BOHACH, G. A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection and Immunology**, v.61, p.4254-4262, 1993.

MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E.S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MCDUGALL, S.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; MURDOUGH, P.A.; SCRUTON, D. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. **Small Ruminant Research**, v. 46, p.115–121, 2002.

MEMPEL, M.; VOELCKER, V.; KOLLISCH, G.; PLANK, C.; RAD, R.; GERHARD, M.; et al. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, p.1389–1396, 2003.

MOLINARI, G.; CHHATWAL, G.S. Streptococcal invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 56–61, 1999.

MORONI, P.; PISONI, G.; VIMERCATI, C.; RINALDI, M.; CASTIGLIONI, B.; CREMONESI, P.; BOETTCHER, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chronically infected dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3500–3509, 2005.

MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J., WELCH, R.A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3337- 3348, 1998.

NAWROTEK, P.; CZERNOMYSY-FUROWICZ, D.; BORKOWSKI, J.; FIJALKOWSKI, K.; POBUCEWICZ, P. The effect of auto-vaccination therapy on the phenotypic variation of one clonal type of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2–4, p. 434-437, 2011.

NG, D.K.; LEE, S.Y.Y.; LEUNG, L.C.K.; WONG, S.F.; HO, J.C.S. Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. **Journal of Hospital Infection**, v.58, p.146-150, 2004.

NOVAK, F.R.; DA SILVA, A.V.; HAGLER, A.N.; FIGUEIREDO, A.M.S. Contamination of expressed human milk with an epidemic multiresistent *Staphylococcus aureus* clone. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 1109-1117, 2000.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v.71, n.6, p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K.; ISHIKAMA, M.; SHIMODA, Y. et al. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolated harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 857-862, 2002.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **Fems Microbiology Letters**. v. 256, p. 191-198, 2005.

ORDEN, J.A.; GOYACHE, J.; HERNÁNDEZ, J.; DOMÉNECH, A.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCIA, E. Detection of enterotoxinas and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. **Journal of Applied Microbiology**, v. 72, p.486-489, 1992.

ORWIN, P.M.; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M.; GUTIERREZ, J.A.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. L. **Infection and Immunity**, v.71, p. 2916-2919, 2003.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; DONAHUE, H.L. et al. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 360-366, 2001.

PINHEIRO, M.S. Mastite puerperal e seus condicionantes na nutriz portadora de *Staphylococcus aureus*. Tese- Fiocruz/Saúde da Mulher e da Criança. 2008.

RADOSTITIS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. Veterinany medicine. 8 ed. London, Baillieri Tindal, 2002.

REN, K.; BANNAN, J.D.; PANCHOLI, V.; CHEUNG, A.L.; ROBBINS, J.C.; FISCHETTI, V.A.; ZABRISKIE, J.B. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxins. **Journal of Experimental Medicine**, v.180, p. 1675-1683, 1994.

SAEI, H.D.; AHMADI, M.; MARDANI, K.; BATAVANI, R.A. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1–2, p. 202-206, 2009.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n.6, p. 413-423, 2007.

SCHMID, E.; FRANKE, W.W.; GRUND, C.; SCHILLER, D.L.; KOLB, H.; PAWELETZ, N. **Experimental Cell Research**. v. 146, p. 309-328, 1983a.

SCHMID, E.; SCHILLER, D.L.; GRUND, C.; STADLER, J.; FRANKE, W.W. **Journal of Cell Biology**. v.96, p.37-50, 1983b.

SHAFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infection and Immunity**, v. 20, p. 273- 278, 1978.

SILVA, V.G. Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para Boas Práticas. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança) – Instituto Fernandes Figueira/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin. H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p.1438-1443, 1995.

SUTRA, L., POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 79–89, 1994.

TANG, P.; FOUBISTER, V.; PUCCIARELLI, M. C.; FINLAY, B. B. Methods to study bacterial invasion. **Journal of Microbiological Methods**, v.18, 227-240, 1993.

THOMAS, D.Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K.; ETIENNE, J.; GOUGEON, M.L.; LINA, G.; VANDENESCH, F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4724-34, 2006.

TRANter, H.S. Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, v.336, p.1044-1046, 1996.



VAN DE BUSSCHE, R.A.; LYON, J.D.; BOHACH G.A. Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.2, p.281-292, 1993.

VEIGA, E.; GUTTMAN, J. A.; BONAZZI, M.; BOUCROT, E.; TOLEDO-ARANA, A.; LIN, A. E.; ENNINGA, J.; PIZARRO-CERDA, J.; FINLAY, B.B.; KIRCHHAUSEN, T.; COSSART, P.P. Invasive and Adherent Bacterial Pathogens Co-Opt Host Clathrin for Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 2, p. 340–351, 2007.

VOLTOLINI, T.V.; SANTOS, G.T.; ZAMBOM, M.A.; RIBAS, N.P.; MÜLLER, E.E.; DAMASCENO, J.C.; ÍTAVO, L.C.V.; VEIGA, D.R. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

WAUBEN, I.P.; ATKINSON, S.A.; GRAD, T.L.; SHAH, J.K.; PAES, B. Moderate nutrient supplementation of mother's milk for preterm infants supports adequate bone mass and short-term growth: a randomized, controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, p.465-472, 1998.

WILSON, G.J.; SEO, K.S.; CARTWRIGHT, R.A.; CONNELLEY, T.; CHUANG-SMITH, O.N.; MERRIMAN, J.A.; GUINANE, C.M.; PARK, J.Y.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M.; MORRISON, W.I.; FITZGERALD, J.R.. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002271, 2011.

YANKJUNIOR, R. Avaliação do impacto econômico de tecnologias de produção de leite na agricultura familiar. Problemas da transição à agricultura sustentável – A importância econômica, social e nutricional do leite. Atualidades e perspectivas para o mercado de lácteo, em: <http://www.samvet.com.br/site/palestras/jank.pdf> Acesso em 17 de julho de 2014.

ZECCONI, A., CESARIS, L., LIANDRIS, E., DAPRA, V., PICCININI, R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, v. 40, p. 177–183. 2006.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998.

## CAPÍTULO 1

Este trabalho originou o artigo “Adesão e invasão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica e leite humano de um banco de leite em células HEp-2, HeLa e BMEC”.

**Adesão e invasão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica e leite humano de um banco de leite em células HEp-2, HeLa e BMEC**

Mirella Rossitto Zanutto<sup>1</sup>, Ivana Giovannetti Castilho<sup>1</sup>, Leandro Maia<sup>2</sup>; Didier Quevedo Cagnini<sup>1</sup>; Jacqueline Kasue Kurissio<sup>1</sup>, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga<sup>2</sup>, Josias Rodrigues<sup>1</sup>, João Pessoa Araújo Júnior<sup>1</sup>, Vera Lúcia Mores Rall<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

**Autor para correspondência:**

Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

Caixa-Postal 510

CEP 18618-970, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP – Brasil.

Telefone: (14) 3880-0438; Fax (14) 3880-0440

e-mail: vlmores@ibb.unesp.br

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais prevalentes em casos de mastite humana e bovina. Entre os diversos fatores de virulência, está a capacidade de aderir e invadir células do epitélio mamário, estabelecendo a doença. Este trabalho descreveu a comparação da capacidade de adesão e invasão de *S. aureus* isolados de leite de vaca com mastite subclínica e de leite humano de um Banco de leite em células HEp-2, HeLa e células de epitélio mamário bovino (BMEC). A BMEC foi obtida a partir de explante de um micro fragmento de tecido mamário bovino. Os isolados de leite humano apresentaram melhor adesão em células HeLa ( $p= 0,043$ ), enquanto os isolados de leite bovino aderiram melhor em células HEp-2 e BMEC ( $p=0,01$ ). Nos testes de invasão, os isolados de leite humano e bovino invadiram os três tipos celulares indistintamente em porcentagem de invasão de 1 a 62,5% para *S. aureus* de origem humana e de 0,7 a 100% para isolados de origem bovina. Concluiu-se que para os testes de adesão, com *S. aureus*, isolados de humanos, pode ser usada células HeLa e para isolados de origem bovina, podem ser utilizadas células Hep-2 e BMEC. Para os testes de invasão, qualquer tipo celular pode ser utilizado para *S. aureus* de ambas as origens. Os resultados possibilitam o uso de linhagens celulares pré-estabelecidas de origem humana, para testes de adesão e de invasão, mesmo em cepas de *S. aureus*, de origem bovina, evitando-se o laborioso processo de obtenção de uma linhagem celular primária.

Palavras chave: Adesão, Invasão, BMEC, HEp-2, HeLa, *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is the prevalent pathogen in cases of human and bovine mastitis. Among the many factors of virulence is the ability to adhere and invade the mammary epithelium cells, establishing the disease. This paper describes the comparison of adhesion and invasion of *S. aureus* isolated from cow's milk with subclinical mastitis and breast milk from a milk bank in different cell types [Hep-2, HeLa and Bovine Mammary Epithelial Cell (BMEC)]. The BMEC was obtained from a micro fragment of bovine mammary tissue. The isolated human milk showed better adhesion to HeLa cells ( $p = 0.043$ ), while isolates from bovine milk adhered better to HEp-2 cells and BMEC ( $p = 0.01$ ). In invasion testing, isolates from human milk and bovine invaded the three cell types indistinctly in percentage from 1 to 62.5% invasion for *S. aureus* of human origin and 0.7 to 100% for isolates from bovine origin. It was concluded that the adhesion test for human isolates can be used and HeLa cells isolated from bovine origin, can be used Hep-2 and BMEC cells. For testing invasion any cell type may be utilized for *S. aureus* from both origins. The results allow the use of pre-established cell lines, avoiding the laborious process of obtaining a primary cell line.

Keywords: Adhesion, Invasion, BMEC, HEp-2, HeLa, *Staphylococcus aureus*.

## 1.INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação das glândulas mamárias, geralmente causada por infecção bacteriana, sendo *Staphylococcus aureus* uma das espécies mais frequentes (BELKUM et al., 2002; SMITH, 2006; NAWROTEK et al., 2011).

Em bovinos de leite, a mastite é responsável por grandes perdas financeiras em todo mundo, devido ao descarte de leite, gastos com tratamento veterinário, diminuição da produção do leite e dos subprodutos lácteos ou descarte do animal (SAEI et al., 2009). Estudos estimam prejuízos de, aproximadamente, US\$ 200 para cada vaca acometida pela doença por ano (CASSOL, 2010). Além dos prejuízos econômicos, a doença oferece risco à Saúde Pública através do consumo do leite contaminado pela bactéria, capaz de ocasionar infecções e intoxicações de origem alimentar no homem (ZECCONI & HAHN, 2000).

A mastite é classificada como ambiental quando o animal se infecta com micro-organismos presentes no ambiente, sendo os coliformes os mais comuns, com predominância das espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*; ou contagiosa quando o agente etiológico é encontrado no úbere e é transmitido durante a ordenha, sendo *S. aureus* o patógeno de maior importância (VOLTOLINI et al., 2001; Mc DOUGALL et al., 2002; MORONI et al., 2005).

O aleitamento materno é capaz de prevenir até 13% de mortes em crianças de até cinco anos e em até 22%, em recém-nascidos, pois neonatos e lactentes são imunologicamente imaturos, tornando-se mais susceptíveis a infecções (JONES et al., 2008; MULLANY et al., 2008; LAWRENCE & PANE, 2007), por isso o leite materno é considerado a melhor nutrição para o recém-nascido, além de protegê-lo imunologicamente. Contudo, não oferece proteção contra contaminantes da própria microbiota ou contra contaminantes secundários vindos do ambiente, adquiridos no momento da coleta (GIUGLIANI, 2000). Casos de mastite em mulheres são denominados de mastite puerperal, cujos sintomas podem variar de apenas uma inflamação local, até casos graves com abscessos e septicemia, com sintomas sistêmicos como febre, calafrios e prostração (GIUGLIANI, 2004). Várias espécies de micro-organismos podem estar envolvidas em casos de mastite puerperal, afetando até 30% das nutrizas, mas *S. aureus* prevalece como principal agente causador da doença (AMIR, 2002; FOXMAN et al., 2002).

*S. aureus* é o mais frequente tanto em mastite clínica quanto em subclínica (HENSEN et al., 2000). É considerado um patógeno ubíquo e o mais difícil de erradicar

do rebanho, podendo causar casos severos de infecções crônicas e danos permanentes no tecido (CHENG et al., 2010; MARTINS et al., 2010). Esse micro-organismo é capaz de colonizar tecidos mamários por internalização de células epiteliais e endoteliais e desencadear resposta imune, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), além de induzir apoptose das células epiteliais mamárias bovinas pela ativação de caspases (WESSON et al., 2000; ANAYA-LÓPEZ et al., 2006).

Entre os tipos de mastite, a subclínica apresenta maior importância epidemiológica por se alastrar silenciosamente pelo rebanho, sem que sejam percebidas as alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou do leite, causando maiores danos econômicos, por não ser diagnosticada previamente (BARBALHO E MOTA, 2001; MARTINS et al., 2010).

A infecção bacteriana é um processo com diversos estágios, iniciando-se com a simples ligação entre a bactéria e a célula hospedeira. Inicialmente, ocorre a colonização do epitélio com interação física não específica, que se torna específica por ligações entre os receptores da bactéria e da célula alvo. A invasão do tecido ocorre por diversas vias de sinalização, seguido pela multiplicação bacteriana. A seguir, ocorre interferência do sistema de defesa do hospedeiro, que é essencial para manter o estado de colonização e causar o dano tecidual (BELKUM et al., 2002).

A adesão e a invasão são importantes mecanismos de virulência nas infecções bacterianas, exercendo papel significativo na patogênese da mastite (HENSEN et al., 2000). Uma série de fatores participam na adesão do *S. aureus* às células, como fímbrias, ácido teicóico, proteínas ligantes de fibronectina, proteína A, o complexo *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM), leucocidinas e coagulase (RICH et al., 1999; FOURNIER & HOOPER, 2000; VON EIFF et al., 2002).

A adesão de *S. aureus* nas células hospedeiras posiciona o patógeno no tecido alvo, podendo ou não ocorrer a internalização por fagocitose, processo denominado de invasão (FINLAY & COSSART, 1997). A internalização das bactérias patogênicas pelas células hospedeiras permite que estas ocupem um microambiente livre das defesas do hospedeiro e de antibióticos, garantindo uma fonte de nutriente segura (ALVA-MURILLO et al., 2011). Este fato pode ser uma das razões pelo caráter crônico da infecção intramamária por *S. aureus* e pela ausência de sucesso apresentada nos tratamentos com antibióticos (HENSEN et al., 2000).



Para estudar a adesão e a invasão de *S. Aureus*, é preciso utilizar um modelo celular *in vitro*. Em muitos países, não existem células epiteliais mamárias bovinas (BMEC) estabelecidas, sendo necessário sempre realizar o processo de cultivo celular primário para efetuar os estudos com amostras de origem bovina. Diversos autores estudaram estes mecanismos de virulência em célula epitelial mamária, muitas vezes com resultados conflitantes.

Lammers et al. (1999) realizaram um estudo comparativo utilizando, além da BMEC, células de linhagem de ducto e alvéolos bovinos, para estudar a adesão e invasão de *S. aureus*, obtendo diferentes resultados para cada tipo celular. Hensen et al. (2000) analisaram o papel da adesão e da invasão na patogênese da mastite utilizando cepas de *S. aureus* em cultivo de BMEC, concluindo que o uso de BMEC foi um método confiável para o estudo destes mecanismos utilizando estirpes de origem bovina. Anaya-López et al. (2006) avaliaram a capacidade de algumas cepas de invadir BMEC e instaurar o processo infeccioso, mas essas cepas não foram testadas em células humanas.

Existem diversas linhagens celulares epiteliais humanas estabelecidas, como as células Human Epithelial (HEp-2) de carcinoma de laringe e a Henrietta Lacks (HeLa), de adenocarcinoma de colo de útero, largamente utilizadas em diversos tipos de pesquisas em todo o mundo, para fabricação de vacinas e testes de citotoxicidade (LACROIX, 2008; FIOCRUZ, 2014).

O objetivo deste trabalho foi a comparação da capacidade de adesão e invasão de *S. Aureus*, isolados de leite de vaca com mastite subclínica e de leite humano de um Banco de Leite em células BMEC, HEp-2 e HeLa, visando a utilização de linhagens de mais fácil obtenção para pesquisas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção das cepas de *S. aureus*

Foram utilizadas 40 isolados de *S. aureus*, previamente obtidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu. Desse total, 20 foram oriundas a partir de leite de vacas com mastite subclínica e 20 de leite cru ou pasteurizado de doadoras do Banco de Leite de um hospital público, na cidade de Botucatu, SP.

### 2.2. Cultivos celulares utilizados nos testes de adesão e invasão

Foram utilizados três tipos celulares diferentes. Não existem linhagens celulares, estabelecidas em laboratório, de células de epitélio mamário bovino no Brasil, que seria, a princípio, o tipo celular mais adequado para ensaios com cepas isoladas de mastite bovina.

#### 2.2.1. Cultivo de células de epitélio mamário bovino

O isolamento da BMEC foi realizado através de micro fragmentos do tecido, que foram depositados em placas de Petri em meio de crescimento constituído por meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com antimicrobianos e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) para facilitar a ligação das células. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução e Biotecnologia do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu. As concentrações dos antimicrobianos foram 10X a concentração usual: gentamicina (50µg/mL), penicilina (250 U/mL), estreptomycinina (1mg/mL), polimixina B (50 U/mL) e anfoterixina B (2,5 µg/mL). Após 48 h, o meio foi substituído por DMEM-10% FBS com os mesmos antibióticos, já na concentração usual (1x). Após 72h de cultura, as monocamadas de células epiteliais mamárias primárias formaram ilhas agregadas a fibroblastos, que foram selecionadas por tripsinização seletiva.

##### 2.2.1.1. Caracterização de BMEC por PCR em Tempo Real (qPCR)

Para caracterização da BMEC, foi realizada PCR em Tempo Real para os genes citoqueratina 18 (*krt18*), expresso pelas células epiteliais e para o gene vimentina

(*vim bos*), expresso pelas células mesenquimais (ANAYA-LÓPEZ et al., 2006). Como controle endógeno da reação de PCR foi utilizado o gene “gliceraldeído 3-fosfatase desidrogenase” (*gapdh*) (Tabela 1). Os primers para os genes *vim bos* e *krt18* foram desenhados utilizando-se o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos e suas propriedades, utilizados na caracterização da célula epitelial de glândula mamária bovina de isolamento primário.

Gene	Marcador	Sequência (5'- 3')	Produto
<i>gapdh Bos taurus</i> F	Controle Endógeno	TGACCCCTTCATTGACCTTC	120pb
<i>gapdh Bos taurus</i> R		ATGGCCTTTCCATTGATGAC	
<i>vim Bos</i> F	Fibroblasto	CAGGATGTTGACAATGCGTCTC	100pb
<i>vim Bos</i> R		CCGCATCATGCAGTTTCTTCAA	
<i>krt18</i> F	Célula epitelial	ATAATGCCCGTCTTGCTGCT	90pb
<i>krt18</i> R		GCCCGTGTATGTCACTCTCC	

Extração de RNA: O RNA total foi extraído de amostras de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK), utilizadas como controle positivo, de Baby Hamster Kidney (BHK-21), utilizadas como controle negativo e das células BMEC. A extração do RNA total foi realizada com o kit comercial Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de RNA tiveram a quantificação e a qualidade avaliadas pelo espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™), considerando valores apropriados de relação A260/280 acima de 1,7.

Obtenção do cDNA: 1 µL de Random Primer e 4 µL de amostra de RNA, totalizando 5 µL, foram incubados a 70°C/5 min. Após este período, foram adicionados 15µL contendo: 1 µL de RNase out (Invitrogen), 4 µL de Impron II 5x reaction buffer, 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL Impron II RT e 6,1 µL H<sub>2</sub>O Nuclease Free (MgCl<sub>2</sub> de 20 mM), totalizando 20 µL, os quais foram incubados a 25°C/5 min, 42°C/60 min, 70°C/15 min e resfriado.

PCR em Tempo Real: As reações de tempo real foram padronizadas para o volume final de 20µL contendo 0,3µM de cada primer, 10µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 6,8µL de água RNase-Free e 2µL de amostra. As condições usadas foram 1 ciclo de 95°C/2 min, 40 ciclos de 95°C/15 seg, 60°C/1 min e 1 ciclo de 60-95°C , para curva de dissociação.

### **2.2.2. Cultivo de células HEp-2, HeLa e BMEC**

As linhagens humanas (HEp-2 e HeLa) foram mantidas em DMEM Glicose Max (Life), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 50 UI de penicilina/mL, 200 UI de estreptomicina/mL e 100mg de neomicina/mL. As culturas foram mantidas em garrafas a 37°C/ 5-7 dias, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As BMECs foram mantidas em solução com 50% de DMEM Glicose Max, 50% F-12 (Life), acrescido de 10% SFB, 50 UI de penicilina/mL, 200 UI de estreptomicina/mL e 100mg de neomicina/mL. As culturas foram mantidas em garrafas a 37°C/ 5-7 dias, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram subcultivadas utilizando-se solução de tripsina-EDTA (ácido etileno diaminotetracético) e resuspensas em DMEM com 10 % de SFB.

## **2.3. Teste de adesão das cepas de *Staphylococcus aureus* na cultura celular**

### **2.3.1. Avaliação Qualitativa por Microscopia para Adesão de *S. aureus***

Crescimentos *overnight* de *S. aureus* em Brain Heart Infusion (BHI, Difco) foram diluídas em DMEM até a obtenção de uma suspensão bacteriana contendo, aproximadamente,  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL.

O crescimento das células foi realizado como descrito no item 2.2.2., porém ocorreu sobre lamínulas em placas de 24 poços. Esses poços foram lavados quatro vezes com PBS, para a retirada dos antibióticos e das células não aderidas. A seguir, 1mL da suspensão bacteriana foi adicionada, em triplicata, nos poços e a placa, incubada por 90 min/37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, cada poço foi lavado com PBS, por quatro vezes, para remoção das bactérias não aderidas. As lamínulas foram mantidas *overnight* em metanol e coradas com uma solução corante de May-Grünwald por 5 minutos e com uma solução corante de Giemsa, por 20 minutos. O teste foi considerado positivo quando foram observadas bactérias aderidas na superfície das células. (ALMEIDA & OLIVER, 2001).

### **2.3.2. Enumeração de *S. aureus* aderidos**

As cepas de *S. aureus* em BHI foram diluídas em meio DMEM até a obtenção de uma suspensão bacteriana contendo, aproximadamente,  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. As culturas celulares foram cultivadas em placas de 24 poços, conforme descrito no item 2.2.2. Antes do teste de adesão, cada poço foi lavado três vezes com tampão PBS+ (PBS 0,01M, suplementado com 0,1 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 0,2 g/L de MgCl<sub>2</sub>) e 1mL da suspensão bacteriana foi adicionada em cada poço sem lamínula. Após 3 horas de incubação, a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, as monocamadas foram lavadas 4 vezes com o tampão PBS+, para remoção das bactérias não aderidas. A seguir, as células foram resuspensas pela adição de 500 µl de tripsina + EDTA (0,1% / 0,04%) em cada poço. As placas foram incubadas numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C durante 10 a 15 min. Após a incubação, as suspensões foram homogeneizadas por pipetagem e o desprendimento das células foi verificado utilizando-se um microscópio de contraste de fase invertida. Após a ressuspensão das células, a tripsinização foi interrompida pela adição de 500 µl de DMEM, sem antibiótico. A seguir, foram preparadas diversas diluições decimais a partir das células lisadas. As diluições foram inoculadas em placas de ágar Tryptone Soya Agar (TSA, Difco), pela técnica de gota em superfície e incubadas a 35°C/24 horas. O resultado positivo foi determinado pela presença de crescimento de unidades formadoras de colônias no TSA, demonstrando a recuperação das bactérias aderidas (HENSEN et al., 2000).

### **2.4. Teste de invasão das cepas de *Staphylococcus aureus* na cultura celular**

As estirpes de *S. aureus* em BHI foram diluídas em DMEM até a obtenção de uma suspensão bacteriana contendo, aproximadamente,  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. Após o cultivo celular, conforme item 2.2.2., cada poço foi lavado três vezes com tampão PBS+ (PBS 0,01M, suplementado com 0,1 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 0,2 g/L de MgCl<sub>2</sub>) e adicionado de 1mL da suspensão bacteriana (sem lamínula). A placa foi incubada por 3 horas/37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, as monocamadas das células foram lavadas três vezes com tampão PBS+. Após a lavagem, 1mL de solução de Eagle com 5% de SFB e 10 mg/mL de gentamicina foi adicionada, em cada poço, para eliminar as bactérias extracelulares e a placa foi reincubada sob as mesmas condições. Após este tratamento, os poços foram lavados quatro vezes com PBS e cada poço recebeu 1 mL de Triton X-100, numa concentração final de 0,1% (vol/vol) em água destilada, a 37°C/10 minutos para a lise das células. A seguir, foram preparadas diluições decimais a partir das células

lisadas, que foram inoculadas em placas de TSA, pela técnica de gota em superfície e incubadas a 35°C/24 horas. O resultado positivo foi determinado pela recuperação e contagem das colônias, em relação percentual aos valores determinados no teste de adesão (HENSEN et al, 2000).

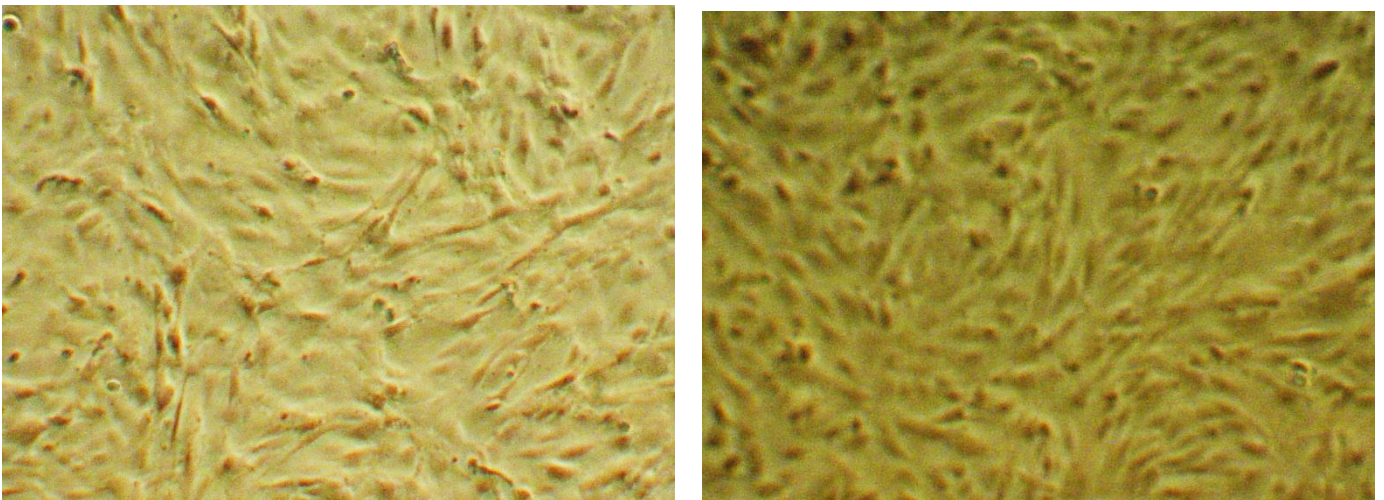
### **2.5. Forma de Análise dos Resultados**

A comparação dos ensaios de adesão e invasão celular foi ajustada ao teste de proporção, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Cultivo e Caracterização de células de epitélio mamário bovino (BMEC)**

As BMEC foram isoladas e cultivadas formando monocamadas confluentes em 4 a 5 dias de incubação (Figuras 1 e 2). O fibroblasto foi o principal contaminante celular presente nesta cultura, tornando-se necessário selecionar as células epiteliais de glândula mamária bovina por tripsinização seletiva.



**Figuras 1 e 2:** Microscopia óptica do cultivo celular primário de epitélio mamário bovino.

Após o isolamento, as células foram avaliadas quanto à expressão de RNA para os genes que codificam a citoqueratina 18 (marcador de célula epitelial) e vimentina

(marcador de fibroblasto) (VANSELOW et al., 2008). Como controle de expressão para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado RNA total extraído de células MDBK, de origem epitelial. Os resultados da qPCR para as células MDBK e das BMEC estão apresentados na Tabela 2, onde pode-se observar que as células MDBK apresentaram expressão elevada do gene *gapdh*, seguido de alta expressão de citoqueratina 18 e baixa de vimentina. O comportamento da expressão desses genes para BMEC foi similar ao da MDBK, confirmando sua origem epitelial.

Os resultados foram expressos pela diferença de Ct (*threshold cycle*), que é uma medida relativa da concentração do alvo na reação de PCR, baseada na intersecção entre a curva de amplificação e uma linha limiar. A diferença encontrada nos valores de Ct está relacionada com a quantidade inicial de RNA, que foi muito menor para as amostras de BMEC (28ng/μL) quando comparadas as células MDBK (900ng/μL).

**Tabela 2:** Expressão dos genes que codificam a produção de citoqueratina 18 (*krt 18*), vimentina (*vim bos*) e do controle endógeno (*gapdh*), por PCR em Tempo Real, das células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) (controle positivo), Baby Hamster Kidney (BHK-21) (controle negativo) e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC), isolada primariamente.

Genes/Células	ΔCt		
	MDBK	BHK-21	BMEC
<i>krt 18</i>	19,9	0	32,8
<i>vim bos</i>	23,4	22,8	40
<i>Gapdh</i>	14,9	17,3	28,9

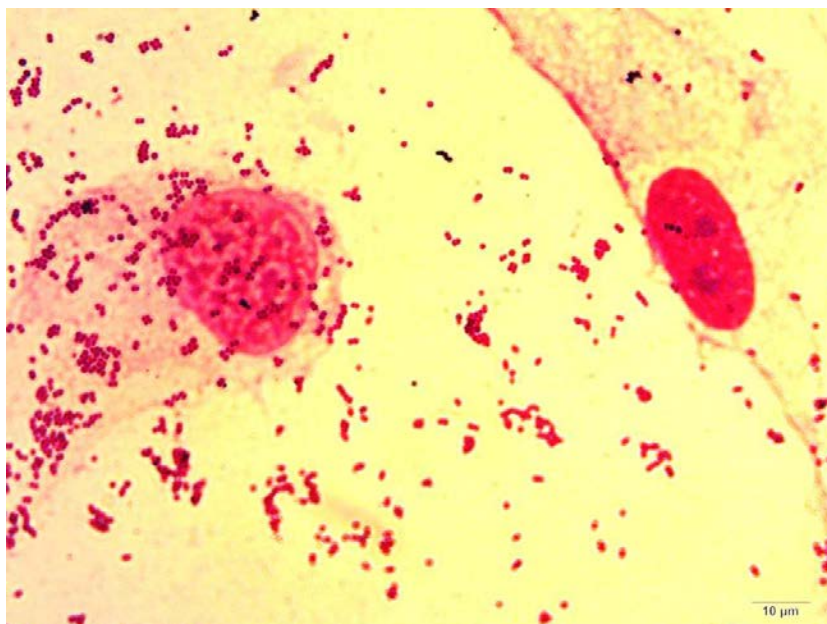
Os testes foram feitos em triplicata.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se comprovar a origem epitelial das BMEC devido à maior expressão de citoqueratina 18 quando comparada a vimentina, possibilitando o uso destas células para os testes de capacidade de adesão e de invasão celular por *S. aureus*.

### 3.2. Teste de adesão e invasão em cultivo celular

#### 3.2.1. Avaliação Qualitativa por Microscopia para Adesão de *S. aureus*

Neste teste, as bactérias se distribuíram de modo desigual sobre o cultivo celular e sobre a lamínula de vidro, mostrando inespecificidade pelo cultivo, formando aglomerados bacterianos e impossibilitando uma avaliação qualitativa (Figura 3).



**Figura 3:** Microscopia óptica de adesão de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite humano em cultivo celular de linhagem HEp-2.

#### 3.2.2. Enumeração da adesão e invasão de *Staphylococcus aureus* em células HEp-2, HeLa e BMEC

Pelas dificuldades observadas quando foi realizado o método de avaliação qualitativa por microscopia, optou-se pela adoção de um método quantitativo, largamente utilizado na literatura, para adesão e invasão que permite a avaliação das cepas capazes de desenvolver tais mecanismos.

Pela Tabela 3, pode-se observar que todas as cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de um banco de leite humano, que invadiram qualquer uma das linhagens celulares, anteriormente foram positivas para o teste de adesão, mostrando que esse passo é imprescindível para a invasão. Somente duas cepas não aderiram em nenhuma das linhagens celulares utilizadas.



**Tabela 3:** Capacidade de adesão e invasão de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite humano de um banco de leite em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC), independente do tipo celular.

Cepas de Origem Humana	Células					
	HEp-2		HeLa		BMEC	
	Adesão	Invasão	Adesão	Invasão	Adesão	Invasão
1	-	-	+	-	-	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	-	+	-
4	+	-	+	-	+	-
5	+	-	+	-	+	-
6	+	-	+	-	-	-
7	+	-	+	-	-	-
8	+	-	+	-	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	-	-	-	-	-	-
11	+	-	+	-	-	-
12	+	-	+	-	+	+
13	-	-	+	+	+	-
14	+	-	+	-	+	-
15	-	-	-	-	-	-
16	+	-	+	-	-	-
17	-	-	+	-	-	-
18	+	-	+	-	+	+
19	+	-	+	+	+	-
20	+	-	+	-	-	-
Total (N %)	15 (75)	0	18 (90)	4 (20)	11 (55)	2 (10)

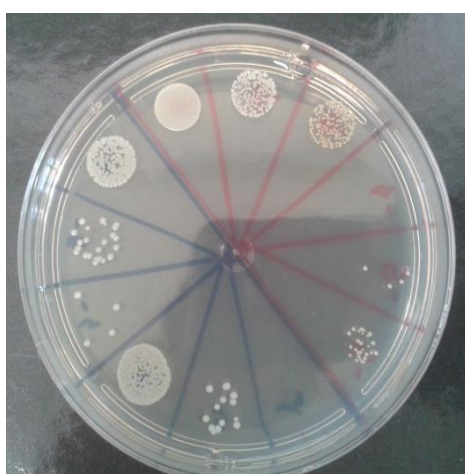
No teste de adesão, *S. aureus* proveniente de leite humano aderiram melhor em células HeLa ( $p=0,043$ ). Dos isolados bovinos, tiveram adesão significativa em HEp-2 e BMEC ( $p=0,01$ ), conforme Tabela 4.

Pela Figura 4, observa-se a recuperação das células de *S. aureus*, em teste de adesão.

**Tabela 4:** Capacidade de adesão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite humano de um Banco de Leite e de leite de vaca com mastite subclínica em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC).

Origem das Cepas (n=20)	Adesão			<i>p</i>
	HEp-2	HeLa	BMEC	
<i>S. aureus</i> humano	15 (75%) <sup>Aa</sup>	18 (90%) <sup>Aab</sup>	11 (55%) <sup>Aac</sup>	<i>p</i> = 0,043
<i>S. aureus</i> bovino	19 (95%) <sup>Aa</sup>	11 (55%) <sup>Bb</sup>	16 (80%) <sup>Aab</sup>	<i>p</i> = 0,010
<i>P</i>	<i>p</i> = 0,184	<i>p</i> =0,033	<i>p</i> = 0,176	

Letras minúsculas: comparação da linha. Letras maiúsculas: comparação da coluna. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.



**Figura 4:** Enumeração de *Staphylococcus aureus* com capacidade de adesão em células HEp-2.

Pela Tabela 5, observam-se os resultados dos testes de adesão e invasão das cepas de *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica e, ao contrário das cepas de origem humana, todas aderiram a, pelo menos, um tipo celular. Nesse teste, foi realizada a porcentagem de bactérias recuperadas após lise das células, em relação à quantidade de isolados aderentes.

É interessante notar que as quatro cepas de origem bovina que não aderiram em células BMEC, aderiram em ambas as linhagens de origem humana. Entre as 16 (80%) cepas que aderiram BMEC, 10 (62,5%) também invadiram.

**Tabela 5:** Capacidade de adesão e invasão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC), independente do tipo celular.

Cepas de Origem Bovina	Células					
	HEp-2		HeLa		BMEC	
	Adesão	Invasão	Adesão	Invasão	Adesão	Invasão
1	-	-	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	-	+	-
4	+	-	+	+	+	-
5	+	+	+	-	+	+
6	+	-	-	-	+	+
7	+	-	+	-	-	-
8	+	-	-	-	+	+
9	+	-	-	-	+	+
10	+	-	-	-	+	+
11	+	-	-	-	+	-
12	+	-	+	+	+	-
13	+	-	+	-	-	-
14	+	-	+	-	+	+
15	+	+	+	+	-	-
16	+	-	+	-	-	-
17	+	-	-	-	+	+
18	+	-	-	-	+	-
19	+	+	-	-	+	+
20	+	-	-	-	+	+
<b>Total (N %)</b>	<b>19 (95)</b>	<b>4 (20)</b>	<b>11 (55)</b>	<b>5 (25)</b>	<b>16 (80)</b>	<b>10 (50)</b>

As cepas de *S. aureus* isoladas de ambos os tipos de leite invadiram os três tipos celulares de maneira indistinta, isto é, sem diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Invasão de *Staphylococcus aureus* isolados de leite humano de um Banco de Leite e de leite de vaca com mastite subclínica em células HEp-2, HeLa e Célula Epitelial Mamária Bovina (BMEC).

Origem das Cepas (n=20)	Invasão			<i>p</i>
	HEp-2	HeLa	BMEC	
<i>S. aureus</i> humano	0 (0%) <sup>Aa</sup>	4 (20%) <sup>Aa</sup>	2 (10%) <sup>Aa</sup>	<i>p</i> = 0,108
<i>S. aureus</i> bovino	4 (20%) <sup>Aa</sup>	5 (25%) <sup>Aa</sup>	10 (50%) <sup>Ba</sup>	<i>p</i> = 0,091
<i>P</i>	<i>p</i> = 0,11	<i>p</i> =1	<i>p</i> =0,01	

Letras minúsculas: comparação da linha. Letras maiúsculas: comparação da coluna. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Nenhuma cepa de *S. aureus* de origem humana invadiu células HEp-2, entretanto, 4 isolados de leite bovino invadiram estas células com porcentagem de 20%, 3,3%, 0,7% e 0,5%.

Em HeLa, os isolados de leite humano invadiram com porcentagens de 1%, 10%, 62,5% e 27,7% e de leite bovino com 38%, 5,8%, 100%, 2,8% e 100%.

Em relação às células BMEC, os isolados de leite humano foram capazes de invadir com 4,5% e 18,8% e os de leite bovino, com 2,1%, 1,7%, 17,7% e 100%.

## 4. DISCUSSÃO

*S. aureus* é um dos patógenos mais importantes que causam danos à glândula mamária bovina e a interação entre o micro-organismo e este tecido é fundamental para o desenvolvimento da mastite (LAMMERS et al., 1999). Ademais, *S. aureus* é um patógeno oportunista de grande importância em humanos.

Segundo Fonseca & Santos (2007), a mastite por *S. aureus* pode ser um reservatório de infecção para o rebanho por ocorrerem, predominantemente, na forma subclínica. Esta bactéria possui uma grande capacidade de penetração na glândula mamária, podendo levar a formação de tecido fibroso, limitando a ação dos antibióticos, caracterizando a infecção como crônica e com baixa taxa de cura espontânea ou por antibióticoterapia.

Sears e McCarthy (2003) afirmaram que isolados de *S. aureus* de animais apenas podem causar doenças em animais, ocorrendo o mesmo com cepas de origem humana. Contudo, de acordo com Peton e Loir (2014), esse micro-organismo deve ser monitorado por poder ser transmitido de animais para humanos e vice-versa, mostrando-se a importância de analisar se a capacidade de adesão e de invasão ocorre especificamente ou não. Sakwinska et al. (2011) analisaram a transmissão de genótipos de 500 cepas de *S. aureus*, isolados de mastite bovina, 57 isolados nasais de agricultores e 133 de não agricultores. Genótipos específicos mostraram transmissão de vacas para humanos e, inesperadamente, mais de um terço dos isolados encontrados em casos de mastite bovina pertenciam a estirpes CC8, bem documentadas em infecções humanas. Os resultados mostraram que a especificidade do hospedeiro é um traço que pode evoluir, já que, embora a CC8 tenha uma relação estreita com humanos, o novo genótipo de CC8 foi isolado de apenas um agricultor, sugerindo que o novo clone se adaptou ao passar de humanos para a vaca, diminuindo a capacidade de colonizar humanos.

Na literatura consultada não foram encontrados outros artigos que compararam a capacidade de adesão e de invasão em cepas de *S. aureus* isolados de leite com mastite entre linhagens celulares de diferentes origens. Após o trabalho de Finlay (1990) que afirmou que a adesão e invasão dependem de receptores específicos, a maioria dos trabalhos que se seguiram utilizaram exclusivamente BMEC (OLMSTED &

NORCROSS, 1992; CIFRIAN et al., 1994; ALMEIDA et al., 1996; HENSEN et al., 2000; ANAYA-LÓPEZ et al. 2006).

No Brasil e em muitos outros países, não há uma linhagem de BMEC estabelecida, tornando-se necessário o isolamento primário de uma linhagem celular de complexa obtenção, que mesmo após o trabalhoso processo, pode ainda apresentar fibroblastos, caso não sejam feitas sempre a tripsinização seletiva.

As BMEC foram isoladas e cultivadas formando monocamadas confluentes, na presença de alguns fibroblastos. Neste trabalho, observou-se pequena quantidade de vimentina, cuja presença pode ser explicada pelos fibroblastos ocasionais, visto que a expressão de citoqueratina 18 foi maior. Além disso, a vimentina também pode ser expressa por células epiteliais *in vitro* (FRANKE, et al., 1979). Segundo Schmid et al. (1983), essa expressão pode ser suprimida pelo acréscimo de prolactina, hidrocortisona e insulina, o que não foi usado nesse teste.

Não houve adesão e invasão de todas as cepas de *S. aureus* isolados de vacas com mastite subclínica, mesmo estes tendo sido realizados em células BMEC. Este resultado está de acordo com o realizado por Anaya-López et al. (2006), que sugeriram que a invasão bacteriana não é um mecanismo necessário para o estabelecimento da doença. Anteriormente, entretanto, Hensen et al. (2000) concluíram que a capacidade de adesão e invasão do *S. aureus* em células epiteliais eram importante na patogênese da mastite, uma vez que protege o micro-organismo contra as defesas do hospedeiro.

No teste de adesão por avaliação qualitativa em microscopia óptica, foi observado que as bactérias não se distribuíram uniformemente sobre a monocamada celular das três linhagens utilizadas (HeLa, HEp-2 e BMEC), formando pequenos aglomerados ao longo da lamínula de vidro. Esta técnica não distinguiu *S. aureus* aderentes, pois estes se também aderiram ao vidro, em regiões desprovidas de células, sugerindo possível formação de biofilme sobre a lamínula ou simples adesão inespecífica, impossibilitando uma análise morfológica clara e uma contagem. Resultados semelhantes também foram observados por Hensen et al.(2000).

Hensen et al. (2000) observaram que a invasão de *S. aureus*, isolados de mastite em células BMEC foi consequência da adesão, sendo que, 60% das cepas que aderiram, também foram internalizadas. No presente estudo, também invadiram apenas as cepas que aderiram previamente, mostrando que estes eventos estão correlacionados para os três tipos celulares testados. Também foram observados resultados muito semelhantes

aos de Hensen et al. (2000), pois ocorreu invasão em 62,5% das cepas de *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite, em células BMEC.

A baixa invasão de *S. aureus*, isolados de leite humano de Banco de Leite pode ser explicada pela origem dessas cepas, que provavelmente pertenciam à microbiota da nutriz, que para se tornar doadora de leite, deve estar isenta de qualquer doença, principalmente mastite e, por isso, essas cepas teriam menor potencial patogênico. Ao contrário das cepas isoladas de leite de vaca com mastite subclínica, que são estirpes patogênicas e, conseqüentemente, podem apresentar mais mecanismos de virulência, como capacidade de adesão e invasão.

## 5. CONCLUSÃO

*S. aureus*, isolados de leite com mastite aderiram igualmente células HEp-2 e BMEC e invadiram os 3 tipos celulares de maneira indistinta, permitindo-se o uso de linhagens celulares de origem humana pré-estabelecidas e evitando-se o uso de linhagens primárias de BMEC, método laborioso e demorado.

## 6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Role of collagen in adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 48, p. 759–763, 2001.

ALMEIDA, R.A.; MATTHEWS, K.R.; CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; OLIVER, S.P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1021-1026, 1996.

ALVA-MURILLO, N.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. **Veterinary Microbiology**, v. 55, n. 2–4, p. 324–331, 2011.

AMIR, L.H. Breastfeeding and *Staphylococcus aureus*: Three case reports. **Breastfeed Review**, v. 10, n.1, p-15-8, 2002

ANAYA-LÓPEZ, J.; CONTRERAS-GUZMÁN, O. E.; CÁRABEZ-TREJO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; OCHOA-ZARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 358–361, 2006.

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R. A. Isolation of bacterial agents associated with subclinical mastitis in bovine in the State of Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.

BELKUM, A.V.; KOOLS-SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. **Journal of Microbiological Methods**, v. 48, p.19-42, 2002.

CASSOL, D.M.S.; SANDOVAL, G.A.F.; PERICOLE, J.J.; GIL,P.C.N.; MARSON, F.A. Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento. **A Hora Veterinária**—Ano29, n°175, maio/junho/2010. Disponível em:[http://www.ourofinovet.com.br/portal/files/espaco\\_veterinario/HV175-MastitebovinaDaniela.pdf](http://www.ourofinovet.com.br/portal/files/espaco_veterinario/HV175-MastitebovinaDaniela.pdf) acessado em: 20/agosto/2010.

CHENG, D.; ZHU, S.; YIN, Z.; DING, W.; UM, Z.; SU, Z.; SUN, H. Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 11, p. 1110-1116, 2010.



CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N.; NICKERSON, S.C.; MARQUARDT, W.W. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.970-983, 1994.

FINLAY, B.B. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.2, p.815-820, 1990.

FINLAY, B. B.; COSSART, P. Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens. **Science**, v. 276, n.718, 1997.

FIOCRUZ. Cultivo Celular. Disponível em [http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo\\_5\\_vol2.pdf](http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf). Acessado em 10 de julho de 2014.

FONSECA, L. F. L., SANTOS, M. V. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. - Barueri,SP: Manole; Pirassununga,SP: Ed. dos autores, 2007. P. 163-171.

FOURNIER, B.; HOOPER, D.C. A new two-component regulatory system involved in adhesion autolysis and extra-cellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 3955-3964, 2000.

FOXMAN, B.; D'ARCY, H.; GILLESPIE, B.; BOBO, J.K.; SCHWARTZ, K. Lactation mastitis: Occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. **American Journal of Epidemiology**, v. 55, n. 2, p. 103-113, 2002.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; WINTER, S.; OSBOM, WEBER, K. Widespread occurrence of intermediate-size filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Experience in Cell Research*, v. 123, p. 25-46, 1979.

GIUGLIANI, E.R.J. O aleitamento materno na prática clínica. Rio de Janeiro: **Jornal de Pediatria**, v.76, n.3, p.238-252, 2000.

GIUGLIANI, E.R.J. Problemas comuns na lactação e seu manejo. **Jornal de Pediatria**, v.80, P.147-154, 2004.

HENSEN, S.M.; PAVICIC, M.J.A.M.P.; LOHUIS, J.A.C.M.; POUTREL, B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.3, p.418-430, 2000.

JONES, G.; STEKETEE, R.W.; BLACK, R.E.; BHUTTA, Z.A.; MORRIS, S.S. Bellagio Child Survival Study Group. How many child deaths can we prevent this year? **Lancet**. v.362, p.65-71, 2003.

LACROIX, M. Persistent use of “false” cell lines. **International Journal of Cancer**. v. 1, p. 1-4, 2008.

LAMMERS, A.; NUIJTEN, P.J.M.; KRUIJT, E.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; VECHT, U.; SMITH, H.E.; VAN ZIJDERVELD, F.G. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 77-89, 1999.

LAWRENCE, R.M.; PANE, C.A. Human Breast Milk: Current concepts of immunology and infectious diseases. **Pediatric and Adolescent Health Care**, p. 7-36, 2007.

MARTINS, R P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MCDUGALL, S., PANKEY, W., DELANEY, C., BARLOW, J., MURDOUGH, P.A., SCRUTON, D. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. **Small Ruminant Research**, v. 46, p.115–121, 2002.

MORONI, P.; PISONI, G.; VIMERCATI, C.; RINALDI, M.; CASTIGLIONI, B.; CREMONESI, P.; BOETTCHER, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chronically infected dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3500–3509, 2005.

MULLANY, L.C.; KATZ, J.; LI, Y.M.; KHATRY, S.K.; LECLERQ, S.C.; DARMSTADT, G.L.; et al. Breast-feeding patterns, time to initiation, and mortality risk among newborns in southern Nepal. **Journal of Nutrition**, v. 138, p.599-603, 2008.

NAWROTEK, P.; CZERNOMYSY-FUROWICZ, D.; BORKOWSKI, J.; FIJALKOWSKI, K.; POBUCEWICZ, P. The effect of auto-vaccination therapy on the phenotypic variation of one clonal type of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2–4, p. 434-437, 2011.

OLMSTED, S.B.; NORCROSS, N.L. Effect of specific antibody on adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.60, p.249-256, 1992.

PETON, V. & LOIR, Y.L. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, n.21, p.602-615, 2014.

RICH, R.L.; DEIVANAYAGAM, C.C.; OWENS, R.T.; CARSON, M.; HOOK, D.; MOORE, D.; SYMERSKI, J.; YANG, V.W.; NARAYANA, S.V.; HOOK, M. Trench-shaped binding sites promote multiple classes of interactions between collagen and the adherence receptors, alpha (1) beta (1) integrin and *Staphylococcus aureus* cna microbial surface component recognising adhesive matrix molecules. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 274, p.24906-24913, 1999.

SAEI, H. D.; AHMADI, M.; MARDANI, K.; BATAVANI, R. A. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1–2, p. 202-206, 2009.

SAKWINSKA, O.; GIDDEY, M.; MOREILLON, M.; MORISSET, D.; WALDVOGED, A.; MOREILLON, P. *Staphylococcus aureus* host range and human bovine host shift. **Appl. Environ. Microbiol**, n.77, p.5908-5915, 2011.

SCHMID, E.; SCHILLER, D.L.; GRUND, C.; STADLER, J.; FRANKE, W.W. Tissue type-specific expression. Of the intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *Journal of Cell Biology*, v. 96, p.37-50, 1983.

SEARS, P.M., MCCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinical Food Animal**, v.19, p.171–185, 2003.

SMITH, B.P. *Medicina Interna de Grandes Animais.*, 3° ed. Barueri, SP., 2006.

VOLTOLINI, T. V.; SANTOS, G. T.; ZAMBOM, M. A.; RIBAS, N. P.; MÜLLER, E. E.; DAMASCENO, J. C.; ÍTAVO, L. C. V.; VEIGA, D. R. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum Maringá**, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

VANSELOW, J.; FURBASS, R.; TIEMANN, U. Cultured Bovine Trophoblast Cells Differentially Express Genes Encoding Key Steroid Synthesis Enzymes. **Placenta**, v. 29, p. 531-538, 2008.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; METZE, D.; LUBRITZ, G.; HOCKMANN, J.; SCHWARZ, T.; PETERS, G. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. **Clinical Infectious Disease**, v.32, p.1643-1647, 2001.

WESSON, C.A.; DERINGER, J.; LIOU, L.E.; BAYLES, K.W., BOHACH, G.A.; TRUMBLE, W.R. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. **Infection and Immunity**, v.8, p. 2998-3001, 2000.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and health risk. **Bulletin of IDF**, v. 345, p. 15-18, 2000.

## **CAPÍTULO 2**

Este trabalho deu origem ao artigo “Perfil genotípico e fenotípico de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leites de vacas com mastite subclínica e de leite humano de um banco de leite.”

**Perfil genotípico e fenotípico de enterotoxinas e resistência à metilicina (MRSA) de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica e de leite humano de um banco de leite**

Mirella Rossitto Zanutto<sup>1</sup>, Stéfani Thais Alves Dantas<sup>1</sup>; Paulo Eduardo Budri<sup>1</sup>, Nathália Cristina Cirone<sup>2</sup>, João Pessoa Araújo Júnior<sup>1</sup>, Vera Lúcia Mores Rall<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

**Autor para correspondência:**

Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

Caixa-Postal 510

CEP 18618-970, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP – Brasil.

Telefone: (14) 3880-0438, Fax (14) 3811-6240

e-mail: vlmores@ibb.unesp.br

## RESUMO

O leite humano é essencial para a saúde de recém-nascido. Crianças que não tem acesso ao aleitamento materno podem receber o leite através dos Bancos de Leite, que são responsáveis pela qualidade do alimento ofertado. O leite bovino e seus subprodutos, importantes na nutrição de crianças e adultos, são susceptíveis à contaminação devido ao contato com o animal, os manipuladores e o ambiente. *Staphylococcus aureus* é um dos principais contaminantes no leite de ambas as origens, pela produção de enterotoxinas termoestáveis, resistentes aos principais tratamentos térmicos que o leite recebe. Este patógeno também pode apresentar resistência à meticilina (MRSA), o que torna a pesquisa de enterotoxina e de resistência à meticilina de interesse à Saúde Pública. Este trabalho pesquisou os genes envolvidos na produção de enterotoxinas de *S. aureus* (*sea-sei*) por PCR e verificou a produção das enterotoxinas clássicas *in vitro* (SET-RPLA), em 20 cepas de *S. aureus* isolados de leite humano de um Banco de Leite e em 20 de leite de vacas com mastite subclínica e avaliou a resistência a meticilina nos isolados de leite humano. O gene *seg* foi o mais frequente em ambos os tipos de leite, com prevalência de 90% (n=18) e 80% (n=16), em humanos e bovinos, respectivamente. No leite humano, *sea* foi o segundo mais prevalente, com 75% (n=15), dos quais 11 (73,3%) produziram SEA *in vitro*, seguido de *sec*, que foi observado em 9 (45%) isolados, dos quais 4 (44,5%) produziram a enterotoxina *in vitro*. Os genes *sea* e *sec* foram observados, simultaneamente, em 6 desses isolados e 2 deles produziram ambas as enterotoxinas. Em relação ao leite bovino, *sec* e *seh* foram os mais frequentes, depois de *seg*, ocorrendo em 12 isolados (60%) e a produção de SEC ocorreu em 8 dessas cepas (66,6%). O gene *sea* ocorreu em 8 (40%) isolados, destes, 4 (50%) foram produtores de enterotoxina. Entre as 20 cepas isoladas de leite humano, 3 apresentaram resistência a meticilina, pela presença do gene *mecA*. Assim, além de poder ser reservatório de MRSA, o leite humano de banco de leite pode causar intoxicação em recém-nascidos, devido a contaminação com cepas enterotoxigênicas. Pelas mesmas características, o leite de origem bovina e seus derivados também podem causar intoxicações em adultos e crianças pelo consumo de leite, mesmo após a pasteurização.

Palavras-chave: Enterotoxinas, MRSA, *Staphylococcus aureus*, Leite humano, leite bovino.

## ABSTRACT

Human milk is essential for the health of the newborn. Children who do not have access to breastfeeding can receive milk through milk banks, which are responsible for the quality of food offered. Bovine milk and subproducts, important in nutrition of children and adults are susceptible to contamination due to contact with the animal, the handlers and the environment. *Staphylococcus aureus* is one of the major contaminants in milk from both sources by enterotoxin producing thermostable, resistant to thermal treatments leading to receive milk. This pathogen can also exhibit resistance to methicillin (MRSA), which makes the search enterotoxin and methicillin resistance of interest to public health. This study investigated the genes involved in the production of enterotoxins of *S. aureus* (sea-know) by PCR and verified the production of classic enterotoxin *in vitro* (SET-RPLA), 20 *S. aureus* strains isolated from human milk from a Bank milk and 20 of milk cows with subclinical mastitis and evaluated the resistance to methicillin in human milk isolated. The *sec* gene was the most common in both types of milk, with a prevalence of 90% (n = 18) and 80% (n = 16) in human and bovine, respectively. In human milk, *sea* was the most prevalent second, with 75% (n = 15), of which 11 (73.3%) produced SEA *in vitro*, followed *sec*, which was observed in 9 (45%) isolates of which 4 (44.5%) enterotoxin produced *in vitro*. The *sea* and *sec* genes were observed simultaneously in these isolates 6 and 2 both enterotoxins produced them. In relation to bovine milk, *sec* and *seh* were the most frequent, after *sec*, occurring in 12 isolates (60%) and the production of SEC occurred in 8 of these strains (66.6%). The *sea* gene occurred in 8 (40%) isolates of these, four (50%) were enterotoxin producers. Among the 20 strains isolated from human milk, 3 were resistant to methicillin, the presence of the *mecA* gene. Thus, in addition to be MRSA reservoir, human milk of milk bank can cause poisoning in infants due to contamination with enterotoxin. For the same characteristics, the bovine milk and dairy products can also cause poisoning in adults and children by drinking milk, even after pasteurization.

Keywords: Enterotoxins, MRSA, *Staphylococcus aureus*, human milk, cow's milk.



# 1. INTRODUÇÃO

O leite bovino e seus subprodutos e o leite de origem humana podem servir como substrato para o crescimento da bactéria e ser fontes de toxinfecções (LE THOMAS et al., 2001; JORGENSEN et al., 2005).

*Staphylococcus aureus* é um patógeno ubíquo e associado a doenças em humanos e animais, podendo ser encontrado na pele e narinas dos mamíferos (SCHUBERTH et al., 2000) encontrado na pele e narinas dos mamíferos (LE LOIR et al., 2003). O primeiro relato de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* ocorreu em 1914, após o consumo de leite de vaca com mastite, causada por *S. aureus* (HENNEKINNE et al., 2012). O gênero *Staphylococcus* é o mais frequentemente isolado de casos de mastite, sendo *S. aureus* o agente etiológico predominante das mastites bovinas clínicas e subclínicas (PANTOJA et al., 2009; MAROGNA et al., 2011). Além de serem causadoras de intoxicações, as enterotoxinas podem participar do processo infeccioso da mastite, induzindo fatores inflamatórios (LLEWELLYN & COHEN, 2002).

Em humanos, o leite materno é o alimento ideal para os recém-nascidos (SILVA, 2004). Crianças que não tem acesso ao aleitamento materno podem receber a alimentação por intermédio dos Bancos de Leite Humano, que se responsabilizam pela qualidade do leite distribuído aos lactentes (BRASIL, 2006).

Do ponto de vista microbiológico, embora deva haver cuidado extremo com este alimento, podem ocorrer falhas durante o processamento, levando a uma contaminação por *S. aureus*, por antisepsia inadequada da pele antes da ordenha, má higienização dos coletores ou manipulação incorreta pelos profissionais no banco de leite (GIUGLIANI, 2000). Uma vez contaminado com *S. aureus*, pode ocorrer a produção de enterotoxinas, se ocorrer tocagem em temperatura acima do recomendado, durante muito tempo

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de, aproximadamente, 30 kD. No total, 22 tipos de enterotoxinas foram descritos (SCHELIN et al., 2011). Foram identificados 5 tipos sorológicos clássicos: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (BERGDOLL & ROBBINS, 1973). A partir dos anos 90, novas SEs foram relatadas e os seus genes sequenciados, de *seg a selx* (SU e WONG, 1995; MUNSON et al., 1998;. ZHANG et al., 1998; ZSCHOCK et al., 2005, FITZGERALD et al., 2001; JARRAUD et al. ., 2001; ORWIN et al., 2001, 2003; OMOE et al., 2002;. LETERTRE et al., 2003). Até o momento, somente SEG, SEH e

SEI apresentaram atividade emética (OMOE et al., 2003). As demais, cujo potencial emético ainda não foi estabelecido, foram denominadas “como enterotoxina estafilocócica” (LINA et al., 2004).

As SE são consideradas superantígenos por ligarem-se o Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, simultaneamente, ocasionando liberação exacerbada de citocinas pelo sistema imune do hospedeiro. (BERGDOLL, 1989; FERNANDEZ et al., 2006).

As toxinas clássicas são responsáveis por mais de 95% dos surtos e a intoxicação ocorre após a ingestão de alimentos contaminados com as toxinas pré-formadas, em concentração de, pelos menos, 100 ng (BENNETT, 2005). Após ingestão de toxina, há um rápido (1-4 horas) aparecimento de vômitos, que podem ou não ser acompanhada por náuseas, dor abdominal, dor de cabeça, febre, cãibra muscular, calafrios, prostração e disfunções hepáticas e renais. A doença é autoeliminada, sendo revertida entre 24-48 horas ((BERGDOLL, 1988; CARMO et al., 2001; JETT et al., 2001).

As enterotoxinas são termoestáveis (100°C/30min) e resistentes a várias enzimas proteolíticas, como tripsina e pepsina, permitindo sua passagem pelo trato gastrintestinal sem perda de atividade (CLIVER, 1994). Essas características as tornam resistentes aos mecanismos que destroem a bactéria que as produziram. Agem no nervo vago, estimulando o centro emético e aumentando o peristaltismo (LARRY, 2007). Portanto, o leite pasteurizado pode apresentar risco à saúde, já que o processo térmico elimina a bactéria, mas não as enterotoxinas (ASAO et al., 2003).

Para o controle microbiológico, a lei RDC nº 171 (ANVISA, 2006) preconizou a ausência de coliformes totais no leite pasteurizado e nenhuma análise é realizada no leite cru, (NOVAK & ALMEIDA, 2002).

Além de poderem causar intoxicações, *S. aureus* podem causar infecções de difícil tratamento, quando apresenta resistência a meticilina.

A partir da década de 60, surgiram cepas resistentes à penicilina e para solucionar o problema, foi desenvolvido um anél  $\beta$ - lactâmico sintético, a meticilina, também a base de penicilina, porém, resistente as  $\beta$ -lactamases produzidas pelo *S. aureus*. No entanto, logo após iniciar a terapêutica com a meticilina surgiram as primeiras cepas resistentes, denominadas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (HIRAMATSU et al., 2002).

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos impedem que as proteínas que sintetizam a parede celular (Proteínas Ligante de Penicilina, PBPs) consigam formar a parede, causando lise bacteriana. As estirpes resistentes à meticilina adquiriram um elemento genético móvel denominado “cassete cromossômico estafilocócico *mec*” (SCC*mec*), que é capaz de desenvolver uma proteína adicional responsável pela síntese da parede celular, denominada Proteína Ligante de Penicilina 2A (PBP2A), que conferiu a resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e à oxacilina. Este fragmento possui de 15 a 60 kb, formado pelos genes *mecA*, *ccrA* e *ccrB*. Sendo que, o gene *ccrA* e *ccrB* estão relacionados a mobilidade do gene e o gene *mecA* está relacionado a resistência (LOWY, 2003; SANTOS et al., 2007).

As infecções causadas por MRSA tem crescimento contínuo em instituições hospitalares em todo mundo. Anteriormente, as infecções por MRSA estavam relacionadas exclusivamente a casos hospitalares (HA-MRSA), contudo, gradativamente, essas infecções passaram a ser documentadas a nível mundial como adquiridas ou associadas à comunidade (CA-MRSA), que não possuem ligação aparente com o sistema hospitalar, sendo responsáveis por infecções de pele e subcutânea, como impetigo, erisipela, celulite e foliculite, em população não ligada ao sistema de saúde (BUSTOS-MARTÍNEZ et al., 2006; COHEN et al., 2008).

Assim, torna-se necessária a pesquisa dos genes responsáveis pela produção de algumas enterotoxinas em cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e leite cru e pasteurizado de banco de leite humano, bem como a verificação da produção de enterotoxinas clássicas por essas cepas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção das cepas de *S. aureus***

Foram utilizadas 40 isolados de *Staphylococcus aureus*, previamente obtidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, da UNESP de Botucatu. Desse total, 20 foram oriundos de leite de vacas com mastite subclínica e 20 de leite cru ou pasteurizado, de doadoras do Banco de Leite de um Hospital público em Botucatu-SP-Brasil.

### **2.2. Pesquisa dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e do gene de resistência metilina**

#### **2.2.1. Extração e Purificação de DNA**

Cada cepa isolada foi cultivada em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco), a 35°C/24 h e 1 mL foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e submetidos a extração e purificação do DNA empregando-se o kit comercial “MiniSpin” (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

O tubo foi centrifugado em rotação máxima (13.000 rpm) por 30 segundos (Eppendorf 5415R), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40µL de tampão de lisozima (USB), imediatamente homogeneizado com o auxílio de um vortex para ressuspensão das células bacterianas. Em seguida, foram adicionados 10 µL lisozima, o tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 15 min, com homogeneização ocasional. Após, foram adicionados 10µL de proteinase K (USB), homogeneizado e incubado a 55°C/ 15 min, homogeneizando ocasionalmente. Após o período de incubação, foram adicionados 500µL de solução de extração, homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 10 min.

A mistura foi transferida para a coluna e centrifugada a 8.000 rpm/1 min. O volume filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500µL de solução de extração na coluna que foi centrifugada a 8.000 rpm/1 min, descartando-se o volume filtrado. Em seguida, foram adicionados 500µL de solução de lavagem e centrifugado a 12.000 rpm/3 min, com descarte do filtrado. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (Axygen), com adição de 500µL de solução de eluição (água Milli Q autoclavada e previamente aquecida a 56°C em banho-maria), incubado à

temperatura ambiente por 1 min e centrifugado a 8.000 rpm/1 min. A amostra foi congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

### **2.2.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)**

Foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em um volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x, 2,0 µM de Cloreto de Magnésio, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer* (Tabela 2), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C /5 min para desnaturação inicial, 94°C/ 2 min para desnaturação e 72°C/1 min para extensão. Em relação à temperatura de anelamento dos *primers*, as diferentes temperaturas estão listadas na Tabela 1. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura.

Os controles positivos usados foram *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), FRI 361 (*sed, seg, sei*), ATCC 27664 (*see*), FRI 137 (*seh*) e N315 (*mecA*).

### **2.2.3. Visualização dos produtos amplificados**

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com SYBR Safen (Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (100 Base Pair Ladder), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção de genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas e de resistência à meticilina.

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho produto (bp)	Temperatura de anelamento	Referências
<i>sea</i>	SEA-1	ttggaaacggttaaacgaa	120	50°C	Johnson et al. (1991)
	SEA-2	gaaccttcccatcaaaaaca			
<i>seb</i>	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg	478	50°C	Johnson et al. (1991)
	SEB-2	gcaggactctataagtgcc			
<i>sec</i>	SEC-1	gacataaaagctaggaattt	257	50°C	Johnson et al. (1991)
	SEC-2	aaatcggattaacattatcc			
<i>sed</i>	SED-1	ctagtttgtaatatctct	317	50°C	Johnson et al. (1991)
	SED-2	taatgctatatcttataggg			
<i>see</i>	SEE-1	aggtttttcacaggatcc	209	50°C	Mehrotra et al. (2000)
	SEE-2	ctttttttcttcggtaac			
<i>seg</i>	SEG-1	aagtagacattttggcggtcc	287	55°C	Omoe et al. (2002)
	SEG-2	agaaccatcaaactcgtatagc			
<i>seh</i>	SEH-1	gtctatatggaggtaacaact	213	46,4°C	Omoe et al. (2002)
	SEH-2	gaccttactatttcgctgtc			
<i>sei</i>	SIE-1	ggtgatattggtgtaggtaac	454	50°C	Omoe et al. (2002)
	SIE-2	atccatattctttgccttaccag			
<i>mecA</i>	mecA-1	gggatcatagcgtcattattc	886	55°C	CRL-AR, (2009)
	mecA-2	aacgattgtgacacgatagcc			

### 2.3. Caracterização fenotípica da produção de enterotoxinas clássicas

#### 2.3.1. Produção de enterotoxinas clássicas por cepas de *S. aureus*

As cepas de *S. aureus* foram cultivadas em caldo BHI e incubadas a 37°C/24 horas. A seguir, 0,1ml do crescimento foi transferido para placas de ágar BHI, acrescido de 1% de extrato de levedura, com um papel celofane esterilizado na sua superfície. Esse volume foi espalhado com o auxílio de uma alça em “L” e essas placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período, uma alíquota de 2,5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M foi adicionada à superfície e, após homogeneização com o crescimento, o

volume foi transferido para um eppendorf, submetido a uma centrifugação a 10.000 rpm/10 min/4°C (ROBBINS et al., 1974).

Os sobrenadantes foram submetidos ao kit de aglutinação reserva passiva em látex (PRPLA – OXOID), conforme recomendações do fabricante, para as enterotoxinas A, B, C e D. Para as demais enterotoxinas não existe kit capaz de detectar a produção *in vitro*.

### **2.3.2. Pesquisa das cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA)**

As cepas isoladas de leite humano foram submetidas a dois procedimentos para avaliar a resistência a meticilina:

- Teste de difusão em disco: cada cepa foi cultivada em caldo BHI e diluída em solução salina de NaCl (8,5%) até atingir  $10^8$  UFC/mL. Após, o crescimento foi espreitado em placa com ágar Müller-Hinton e a avaliação da sensibilidade à oxacilina (1µg) e cefoxitina (30 µg) foi realizada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Após 24h/35°C, foi realizada a leitura do diâmetro do halo de inibição, sendo classificadas como sensíveis as cepas que apresentaram halos  $\geq 13$ mm para oxacilina e  $\geq 22$ mm para cefoxitina. As amostras foram consideradas resistentes quando apresentaram halos menores do que os citados acima (CLSI, 2008).

- Presença do gene *mecA*: a pesquisa do gene *mecA* foi realizada de acordo com o item 2.2.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Pesquisa dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e produção *in vitro***

Entre as 20 cepas de *S. aureus* isoladas de leite humano, o gene responsável pela produção da enterotoxinas G (*seg*) esteve presente em 18 amostras (90%), sendo o mais prevalente. O gene *sea* foi o segundo mais frequente, ocorrendo em 15 cepas (75%), das quais 11 (73,3%) produziram SEA *in vitro* (Tabela 2). O gene *sec* foi observado em 9 (45%) cepas e, dessas, 4 (44,5%) produziram a enterotoxina. Foi utilizado o mesmo número de cepas de *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica. O gene *seg* novamente foi o mais frequente, ocorrendo em 16 (80%) amostras, seguido pelos genes *sec* e *seh*, ambos observados em 12 (60%) amostras de leite bovino. Quanto à produção de enterotoxinas *in vitro*, *sea* ocorreu em 8 (40%) cepas, dessas, 4 (50%)

foram produtoras e a produção de SEC ocorreu em porcentagem semelhantes, uma vez que das 12 cepas de *sec* positivas, 8 (66,6%) produziram a enterotoxina.

Os genes *seb* e *sed* não foram observados em nenhuma das cepas pesquisadas, sendo observados somente nos controles positivos das reações da PCR e, por esse motivo, não foram analisados quanto à produção de toxina *in vitro*.

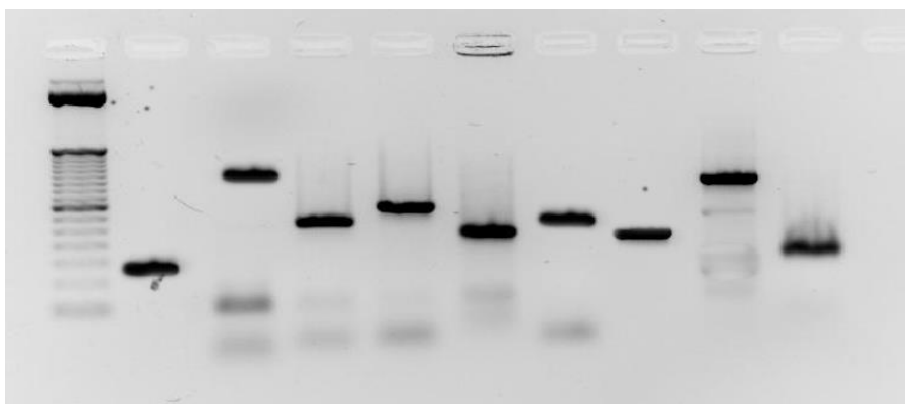
**Tabela 2.** Frequencia dos genes responsáveis pela produção de algumas enterotoxinas, por *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica e de leite humano de um banco de leite (2013).

	Leite Humano n=20 (%)		Leite Bovino n=20(%)	
	gene	Produção <i>in vitro</i>	gene	Produção <i>in vitro</i>
<i>sea</i> /SEA	15 (75)	11 (55)	8 (40)	4 (20)
<i>seb</i> /SEB	-	-	-	-
<i>sec</i> /SEC	9 (45)	4 (20)	12 (60)	8 (40)
<i>sed</i> /SED	-	-	-	-
<i>See</i>	2 (10)	NT	0	NT
<i>Seg</i>	18 (90)	NT	16 (80)	NT
<i>Seh</i>	6 (30)	NT	12 (60)	NT
<i>Sei</i>	2 (10)	NT	1 (5)	NT

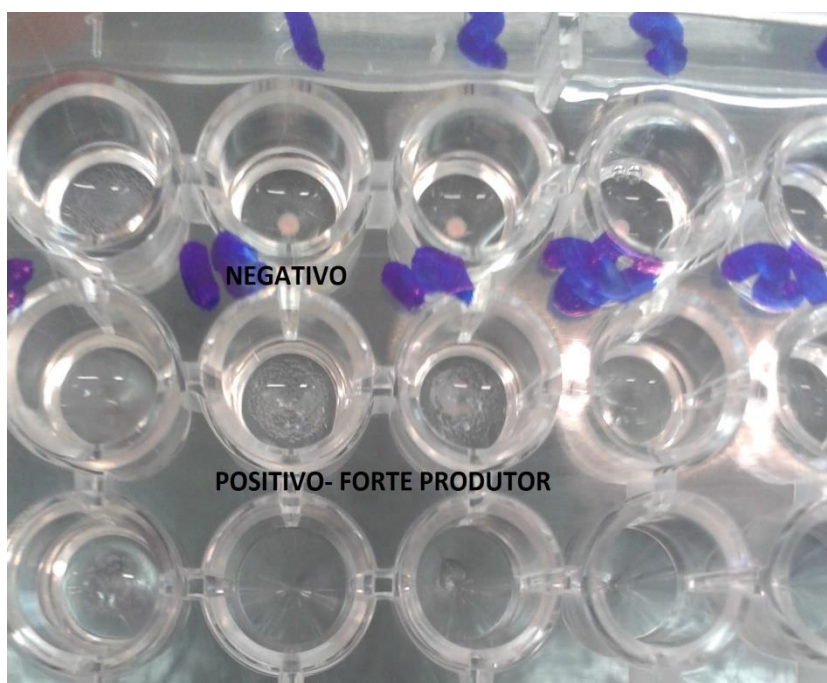
NT: não testado



A figura 1 ilustra a PCR das cepas padrão, utilizadas como controle positivo, no teste de detecção das enterotoxinas clássicas e alguns dos genes mais recentemente descobertos.



**Figura 1.** Gel de eletroforese do produto da PCR das enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*. ATCC 13565 (*sea* - 120 pb), ATCC 14458 (*seb* - 478 pb), ATCC 19095 (*sec* - 257 pb), FRI 361 (*sed* - 317 pb; *seg* - 287 pb; *sei* - 454 pb e *sej* - 142 pb), ATCC 27664 (*see* - 209 pb) e FRI 137 (*seh* - 213 pb).



**Figura 2:** Microplaca utilizada para testes qualitativos da produção de enterotoxinas *in vitro*, por *Staphylococcus aureus*. A imagem ilustra o resultado negativo de produção de enterotoxinas (representado por um ponto) e o resultado positivo (representado pela formação de grânulos).

Os genes *sea* e *sec* estavam presentes, simultaneamente, em 6 isolados e 2 produziram ambas as enterotoxinas (Tabela 3 e Figuras 1 e 2).

Foi possível observar diferentes genótipos, em relação à presença e distribuição dos genes pesquisados, ocorrendo 10, nas cepas isoladas de leite humano e 11, nos isolados de leite de vacas com mastite subclínica, segundo Tabela 3.

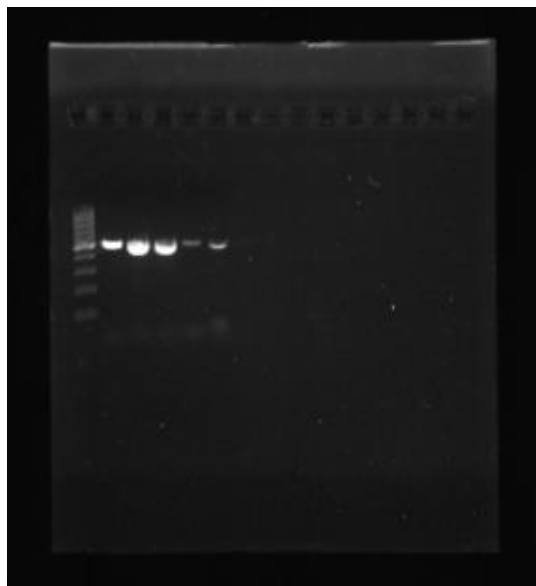
O genótipo *sea/seg* foi o mais frequente em leite de origem humana, ocorrendo em 4 (20%) das 20 cepas e um isolado (5%) da mesma origem apresentou positividade para 5 genes diferentes (*sea/sec/see/seg/seh*). É interessante notar que o genótipo mais frequente nas cepas isoladas de leite de vaca também continham *sea/seg*, podendo estar acompanhados ou não de outros genes (*sea/sec/seg/seh*), ocorrendo em 3 (15%) cepas. Tal percentagem também foi observada para o genótipo *sec/seg*.

**Tabela 3.** Perfil genotípico das enterotoxinas das cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados a partir de amostras de leite de vaca com mastite subclínica e de leite humano de um banco de leite (2013).

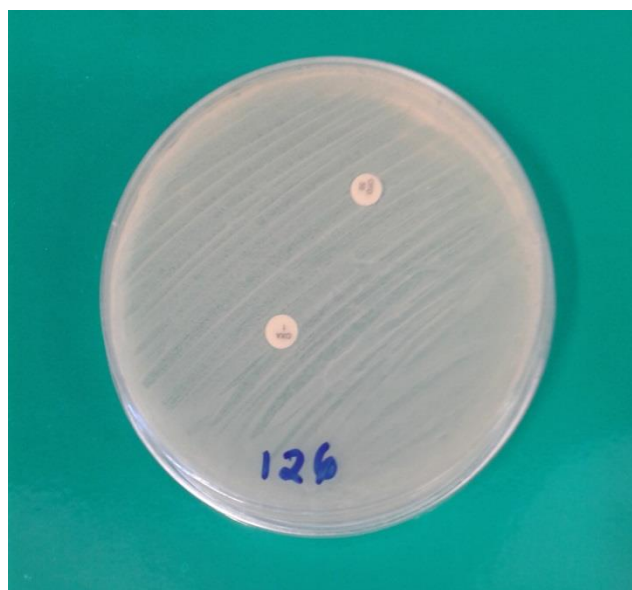
Perfil genotípico	Leite Humano		Leite Bovino	
	n=20	%	n=20	%
<i>sea/seg</i>	4	20	1	5
<i>sea/see/seg</i>	1	5	0	0
<i>sea/sec/seg</i>	3	15	2	10
<i>sea/seh</i>	2	10	0	0
<i>sea/sec/seg/seh</i>	2	10	3	15
<i>sea/seg/seh</i>	1	5	1	5
<i>sec/seg/sei</i>	1	5	0	0
<i>sea/sec/see/seg/seh</i>	1	5	0	0
<i>sec/seg</i>	2	10	3	15
<i>seh/sei</i>	0	0	1	5
<i>sea/seg/sei</i>	1	5	0	0
<i>seg/seh</i>	0	0	1	5
<i>sec/seg/seh</i>	0	0	2	10
<i>sec/seh</i>	0	0	1	5
<i>sea/sec/seh</i>	0	0	1	5
<i>seg/sei</i>	0	0	1	5

### 3.2. Pesquisa das cepas *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA)

As 20 cepas de *S. aureus* isoladas de leite humano de um banco de leite foram submetidas ao teste de difusão em disco utilizando os antibióticos oxacilina e cefoxitina e à pesquisa da presença do gene *mecA* para verificar a resistência à meticilina, das quais, 3 apresentaram resultado positivo.



**Figura 3:** Gel de eletroforese do produto da PCR dos *Staphylococcus aureus* expressando gene *mecA* em cepas meticilina resistente.



**Figura 4:** Teste de difusão em disco utilizando os antibióticos oxacilina e cefoxitina para avaliar *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

## 4. DISCUSSÃO

O gene mais frequente foi o *seg*, com 90% de positividade em leite humano e 80% em leite bovino. Essa maior ocorrência também foi observada por Zschöck et al. (2005), que realizaram um estudo com 104 cepas *S. aureus* isolados de vacas com mastite e observaram que 36 (59%) apresentaram o gene *seg*, seguido por 23 (22,1%) positivas para *sej* e 22 (21%), para *sei* e nenhuma das cepas foi positiva para *seh*. Ao contrário, no presente trabalho, *seh* foi encontrada em 12 (60%) das cepas de *S. aureus* de origem bovina. O gene *sei* ocorreu em 2 (10%) cepas isoladas de leite humano e em 1 (5%) de leite bovino.

Quanto às enterotoxinas clássicas, os resultados estão de acordo com outros estudos, nos quais a SEC foi a toxina mais frequentemente produzida por cepas isoladas de bovinos (STEPHEN et al., 2001; LONCAREVIC et al., 2005; JORGENSEN et al., 2005; KATSUDA et al., 2005; DA SILVA et al., 2005) e a SEA, a toxina predominante em amostras humanas (ORDEN et al., 1992).

Os resultados diferem desse trabalho de outros estudos, nos quais encontraram maior proporção de SEA, SED e *sej*, relatando que as enterotoxinas A e D foram as mais encontradas em isolados lácteos de vacas, na Itália (NORMANNO et al., 2005; MORANDI et al., 2007). Boynukara et al. (2008) não encontraram nenhum gene *sea* em 106 amostras de *S. aureus* isolados de vacas com mastite subclínica.

De acordo com Sutra e Poutrel (1994), as enterotoxinas *sec* e *sed* são as mais importantes para as infecções intramamárias por induzirem a liberação de fatores de inflamação. Larsen et al. (2000) isolaram apenas 1 cepa com a presença do gene *sec* em 414 amostras de *S. aureus*, isolados de mastite bovina e também concluíram que a presença de enterotoxinas não exercem papel importante no desenvolvimento da mastite. Gómez et al. (2007) analisaram o perfil genotípico das enterotoxinas *sea*, *seb* e *sec* de 41 *S. aureus* isolados de vacas com mastite no México e não encontraram nenhum desses genes. Diferentemente desses resultados, no atual trabalho, encontrou-se cinco tipos diferentes de genes que codificam para enterotoxinas (*sea*, *sec*, *seg*, *seh* e *sei*) em isolados de leite de vaca com mastite subclínica. Não foram observados os genes *seb* e *sed* em bovinos ou humanos. No entanto, *sec* esteve presente em 9 isolados humanos e em 12 isolados de bovinos com mastite subclínica. Embora os isolados de mastite tenham apresentado alta porcentagem de *sec*, ainda não há uma relação com o

processo infeccioso quando comparado ao perfil humano, uma vez que o leite humano também apresentou elevada quantidade de *sec*, mesmo sendo obtido de mães saudáveis.

Cepas MRSA foram encontradas em 3 (15%) das 20 cepas isoladas de leite humano. Novak (2000) analisou 500 amostras de leite humano de Banco de Leite de várias cidades brasileiras e 171 estavam contaminadas com *S. aureus*, das quais 57 eram MRSA (11,4%) e apenas 7 (1,4%) amostras estavam contaminadas com cepas enterotoxigências.

Pinheiro (2008) realizou um estudo com 44 mulheres com mastite associada a *S. aureus* (grupo caso) e 88 mulheres sem a doença (grupo controle) e MRSA foram observadas em 11,3% do grupo caso e 7,1% do grupo controle.

*S. aureus* resistente à meticilina provenientes da comunidade (CA-MRSA) estão, comumente, ligados à produção de enterotoxinas SEB e SEC e nenhuma das cepas de *S. aureus* deste estudo apresentaram *seb*, contudo, uma das três cepas MRSA foi produtora de SEC.

Em um estudo realizado por Garcia (2013), foram analisadas a presença de *S. aureus* e portadores de MRSA em 403 recém-nascidos, em 382 mães e em 148 profissionais da saúde, dos quais, 59 recém nascidos (15%) foram positivos para esse micro-organismo, além de 18 (4,7%) das mães e 5 (3,4%) dos profissionais de saúde.

## 5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o leite humano, de bancos de leite, pode causar intoxicação alimentar em recém-nascidos, devido à presença de *S. aureus* enterotoxigênicos, se esse leite for estocado de maneira imprópria. Pelas mesmas características, o leite de origem bovina e derivados também podem causar intoxicações em adultos e crianças, pelo consumo de leite, mesmo após a pasteurização.

A presença do gene *mecA*, aumenta o potencial patogênico de *S. aureus*, isolados do leite de banco de leite, principalmente se for considerado o consumidor alvo, que são recém nascidos prematuros, com baixa imunidade.

## 6. REFERÊNCIAS

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZYKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v.130, p.33–40, 2003.

BENNETT, R.W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v. 68, p.1264–1270, 2005.

BERGDOLL, M.S. Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxin. **Methods in Enzymology**, v.165, p.324-333, 1988.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: Dean, C. **Foodborne Diseases**. 4ª ed, San Diego, California. Academic Press, p. 85-106, 1990.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. **Bacterial Foodborne Pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 464-523, 1989.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 36, p. 610-2, 1973.

BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.209–211, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2006.

BUSTOS-MARTÍNEZ, J.A.; HAMDAN-PARTIDA, A.; GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. **Annual Reviews of Biomedical**. v. 17, p.287-305, 2006

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARD, V.R.; et al. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, Minas Gerais (Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n.4, p.581-586, 2001.

CLIVER, D.O. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker, 1994, 613p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth informational supplement document M100S18. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

COHEN, E.C.; AUSTIN, J.; WEINSTEIN, M.; MATLOW, A.; REDELMEIER, D.A. Cohort Study Care of Children Isolated for Infection Control: A Prospective Observational. **Pediatrics**, v. 122, p.411-415, 2008.

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

FERNANDEZ, M.M.; MARZI, M.C., BERGUER, P.; BURYZN, D.; LANGLEY, R.J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 927, 938, 2006.

FITZGERALD, J.R.; MONDAY, S.R.; FOSTER, T.J.; BOHACH, G.A.; HARTIGAM, P.J.; MEANEY, W.J.; SMITH, C.J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 63-70, 2001.

GARCIA, C.P. Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar. 104p. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). São Paulo. 2013.

GIUGLIANI, E.R.J. O aleitamento materno na prática clínica. Rio de Janeiro: **Jornal de Pediatria**, v.76, n.3, p.238-252, 2000.

GÓMEZ, C.; PINAL, L.; FRANCO, J.; CARRILO, J.M.; RAMÍREZ, J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A,B and C isolated from bovine mastitis in México. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, p.249-253, 2007.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p.815-836, 2012.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YUZAWA, H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 67-74, 2002.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. Cgc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166, n.1, p.669-677, 2001.

JETT, M.; IONIN, B.; DAS, R.; NEILL, R. The staphylococcal enterotoxins. **Gastro-intestinal Infections: Toxin Associated Diseases**. p. 1089-1116, 2001.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 426-430, 1991.



JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; ROVIK, L.M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p.158-167, 2005.

KATSUDA, K.; HATA, E.; KOBAYASHI, H.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H.; EGUCHI, M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastite milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.301-305, 2005.

LARRY, J.T. Enterotoxin. In: **Veterinary Toxicology**. C. 62. Ed: Gupta, R.C. p. 771-772, 2007.

LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R.; JENSEN, N.E. Difference between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.153-162, 2000.

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

LE THOMAS, I.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; COLLIGNON, A.; GRAVET, A.; CLERMONT, O.; BRAHIMI, N.; GAUDELUS, J.; AUJARD, Y.; NAVARRO, J.; BEAUFILS, F.; BINGEN, E. Breast Milk transmission of a panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strain causing infantile pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, 728-729, 2001.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.38-43, 2003.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K., JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 2334-2336, 2004.

LLEWELLYN, M.; COHEN, J., 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. **The Lancet Infectious Disease**. v.2, p.156–162, 2002.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H.J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; RORVIK, L.M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p.344-350, 2005.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.9, p. 1265-1273, 2003.

MAROGNA, G.; PILO, C.; VIDILI, A.; TOLA, S.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S. G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 102, n. 1, p. 74-83, 2011.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.3, p.1032-1035, 2000.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONE, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.66–72, 2007.

MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J., WELCH, R.A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3337- 3348, 1998

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A.P.; LA SALANDRA, G.; BATOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G.V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p.73–79, 2005.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano ordenhado. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 587-591, 2002.

NOVAK, F.R.; DA SILVA, A.V.; HAGLER, A.N.; FIGUEIREDO, A.M.S. Contamination of expressed human milk with an epidemic multiresistent *Staphylococcus aureus* clone. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 1109-1117, 2000.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.6, p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**. v. 256, p. 191-198, 2005.

OMOE, K.; ISHIKAMA, M.; SHIMODA, Y. et al. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolated harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 857-862, 2002.

ORDEN, J.A.; GOYACHE, J.; HERNÁNDEZ, J.; DOMÉNECH, A.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCIA, E. Detection of enterotoxinas and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. **Journal of Applied Microbiology**, v. 72, p.486-489, 1992.

ORWIN, P.M.; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M.; GUTIERREZ, J.A.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. L. **Infection and Immunity**, v.71, p. 2916-2919, 2003.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; DONAHUE, H.L. et al. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 360-366, 2001.

PANTOJA, J.C.F.; HULLAND, C.; RUEGG, P.L. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.139-148, 2009.

PINHEIRO, M.S. Mastite puerperal e seus condicionantes na nutriz portadora de *Staphylococcus aureus*. Tese- Fiocruz/Saúde da Mulher e da Criança. 2008.

ROBBINS, R.; GOULD, S., BERGDOLL, M., Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.28, p. 946-50, 1974.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n.6, p. 413-423, 2007.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M.T.; LINDQUIST, R.; BARKER, G.C.; RADSTROM, P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v.2, p.580-592, 2011.

SCHUBERTH, H.J. Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.82, p.187-199, 2000.

SILVA, V. G. Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para Boas Práticas. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança) – Instituto Fernandes Figueira/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

STEPHEN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A.A.; LAMMLER, CH. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p.373-382, 2001.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin. H. **Applied Environmental Microbiology**.v. 61, p.1438-1443, 1995.

SUTRA, L., POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 79–89, 1994.

THOMAS, D.Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K.; ETIENNE, J.; GOUGEON, M.L.; LINA, G.; VANDENESCH, F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4724-34, 2006.

TRANter, H.S. Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, v.336, p.1044-1046, 1996.

WILSON, G.J.; SEO, K.S.; CARTWRIGHT, R.A.; CONNELLEY, T.; CHUANG-SMITH, O.N.; MERRIMAN, J.A.; GUINANE, C.M.; PARK, J.Y.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M.; MORRISON, W.I.; FITZGERALD, J.R.. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002271, 2011.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998.

ZSCHÖCK, M.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; HAMANN H.P.; LAMMLER, C. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastites. **Veterinary Microbiology**. v. 108, p.243-249, 2005.