



## EXOTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E SUA IMPORTÂNCIA NA MASTITE BOVINA

---

Fernanda Antunha de Freitas<sup>1\*</sup>, Marília Cristina Sola<sup>1</sup>, Eraldo Lourenço de Souza Sena<sup>2</sup>, Ronaldo Figueiredo Alves<sup>3</sup>, Albenones José de Mesquita<sup>4</sup>

<sup>1\*</sup>Doutoranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>2</sup> Biomédico, Gerente do Laboratório de Especialidades Biológicas, Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>3</sup> Residente, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>4</sup>Doutor, Professor titular na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

\*fernandaantunha@gmail.com

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

---

### RESUMO

*Staphylococcus aureus*, pertencente ao gênero *Staphylococcus*, é uma bactéria esférica do grupo de cocos Gram positivos. Pode existir como comensal do organismo humano, integrando a microbiota da pele, de membranas mucosas e de outros sítios anatômicos. É considerado o principal patógeno humano, mas também está associado com uma variedade de doenças animais, reconhecido mundialmente como um dos principais patógenos causadores de mastites em vacas leiteiras. O microrganismo é capaz de produzir uma grande variedade de fatores de virulência associados à parede bacteriana ou secretados, entre eles as exotoxinas, como a toxina da síndrome do choque tóxico, um superantígeno bacteriano capaz de ativar a resposta imunológica do hospedeiro; as toxinas esfoliativas A e B, responsáveis por manifestações clínicas de Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada; e a leucocidina Pantón-Valentine, capaz de formar estruturas em forma de poros em células mielóides do hospedeiro. A patogenicidade de *S. aureus* para o úbere bovino não está completamente elucidada, mas as exotoxinas estafilocócicas secretadas e suas combinações podem desempenhar papel no potencial patogênico do microrganismo. Levando em consideração que o conhecimento dos fatores de virulência de *S. aureus* fornece informações importantes para o estabelecimento de estratégias efetivas de controle de infecções intramamárias, objetivou-se relatar os avanços da ciência em relação às principais exotoxinas estafilocócicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** exotoxinas, mastite, *Staphylococcus aureus*

### STAPHYLOCOCCAL EXOTOXIN AND ITS IMPORTANCE IN BOVINE MASTITIS

#### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus*, belongs to the *Staphylococcus* gender and is a spherical bacterium of the group of Gram-positive cocci. It can exist as commensal of the human body, integrating the microbiota of the skin, mucous membranes and other

anatomical sites. It is considered the major human pathogen, but is also associated with a great variety of animal diseases, recognized worldwide as one of the main pathogens causing mastitis in dairy cows. The microorganism can produce a wide variety of virulence factors secreted or associated with bacterial wall, among them the exotoxins, such as toxic shock syndrome toxin, a bacterial superantigen able to activate the host immune response, the exfoliative toxins A and B, responsible for the clinical manifestations of Staphylococcal scalded skin syndrome, and Pantone-Valentine leukocidin, able to produce a pore-form structure in myeloid cells of the host. The pathogenicity of *S. aureus* to the bovine udder is not quite clarified, but the secreted staphylococcal exotoxins and their combinations may play a role in the pathogenic potential of the microorganism. Considering that knowing the virulence factors of *S. aureus* provides an important information of the establishment of effective control strategies of intramammary infections we aimed to report the advances of science in relation to major staphylococcal exotoxins.

**KEYWORDS:** exotoxins, mastitis, *Staphylococcus aureus*

## INTRODUÇÃO

No ano de 2010 o Brasil foi classificado como o quinto maior produtor de leite no mundo, com uma produção de mais de 31 milhões de toneladas, representando 5,3% da produção mundial (FAO, 2010), com produtividade média de 1,70 mil Kg de leite/ vaca (USDA, 2012). O Estado de Goiás, nesse mesmo ano, teve a quarta maior produção de leite no país, com um total de 3.193.713 mil litros produzidos, ficando atrás de Minas Gerais (8.388.039 mil litros), Rio Grande do Sul (3.663.834 mil litros) e Paraná (3.595.775 mil litros), representando 10,4% da produção do país e 72% da produção da Região Centro-Oeste (IBGE, 2010).

De acordo com as projeções do agronegócio brasileiro, entre os anos de 2012/2013 e 2022/2023, realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite foi considerado um dos produtos com maiores possibilidades de crescimento, com uma taxa anual de 1,9%, correspondendo a uma produção de 41,3 bilhões de litros de leite cru ao final do período das projeções. O consumo de leite também deverá crescer à mesma taxa anual da produção de leite do país (1,9%), mas como o consumo deverá estar em um nível acima da produção, sendo necessário o aumento do volume de importação ou implantação de políticas públicas específicas para incentivar um maior desenvolvimento do setor (BRASIL, 2013).

Levando em conta a importância da matéria-prima (leite) tanto para a economia como para a indústria e consumidores, o MAPA editou a Instrução Normativa de nº 51, de 2002, que estabeleceu parâmetros para avaliação da qualidade do leite cru, como a contagem bacteriana total, contagem de células somáticas, determinação da composição centesimal e de resíduos de antimicrobianos em leite (BRASIL, 2002). Tais parâmetros foram escolhidos com o intuito de se tornarem ferramentas indispensáveis na produção, beneficiamento e industrialização, uma vez que fornecem informações relacionadas à qualidade do leite, englobando a sanidade da glândula mamária, condições higiênicas de obtenção do leite, valor nutricional, além de outros.

Diante da necessidade de adequação dos critérios pré-estabelecidos, o MAPA no ano de 2011 promoveu a alteração da IN 51 pela Instrução Normativa 62, publicada em 29 de dezembro de 2011, trazendo à cadeia produtiva do leite novos

limites para Contagem Total Bacteriana (CBT) e para Contagem de Células Somáticas (CCS), além de uma classificação diferenciada aos tipos de leite.

Na medicina veterinária a mastite bovina é considerada a doença de maior ocorrência e importância econômica na atividade leiteira, acarretando graves prejuízos decorrentes principalmente da diminuição da produção láctea, comprometimento na qualidade do leite e até da perda total da capacidade secretora da glândula mamária (NADER FILHO et al., 2007; KOSKINEN, 2009).

Os prejuízos causados pela mastite bovina incluem os custos de diagnóstico microbiológico, medicamentos, mão de obra, descarte de leite, entre outros (SANTOS et al., 2011). Ao calcular o ICP/Leite do ano de 2012, índice que mede a variação no custo de produção do leite, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), reportou que mais de 36% dos custos da produção está relacionado à sanidade do rebanho e à qualidade do leite, percentual considerado alto quando comparado com mão-de-obra (14,01%) e produção e compra de volumosos (9,87%) (BRASIL, 2012).

A mastite bovina pode ser causada por inúmeros microrganismos, mas o patógeno *Staphylococcus aureus* é considerado o agente de maior importância e de maior ocorrência nos rebanhos mundiais, sendo frequentemente isolado em amostras de leite cru (NADER FILHO et al., 2007). Este patógeno é causador de mastite do tipo contagiosa, sendo comumente disseminado de vacas infectadas para vacas sadias durante a ordenha (MICHEL et al., 2011).

O *S. aureus*, microrganismo do gênero *Staphylococcus* spp., é capaz de sobreviver como comensal da pele, membranas mucosas, fossas nasais e outros sítios anatômicos de humanos e animais. Pode estar associado a infecções em hospedeiros de forma localizada ou sistêmica, comumente associado a infecções recorrentes, sendo assim, considerado um patógeno importante tanto para a medicina humana quanto para a veterinária. Em animais domésticos, o *S. aureus* está envolvido principalmente em infecções intramamárias de fêmeas de produção leiteira, principalmente na forma subclínica (SUTRA & POUTREL, 1993).

O potencial de virulência dos diferentes isolados de *S. aureus* é determinado pela presença ou ausência de genes de fatores de virulência, como genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas, leucocidinas, exfoliatinas, hemolisinas e outras exotoxinas (SPANU et al., 2012).

Essas exotoxinas são responsáveis por intoxicações alimentares e outros tipos de infecções em humanos e animais. Sua função principal é inibir a resposta imunológica do hospedeiro ao *S. aureus* contribuindo com a patogênese da doença, bem como no desenvolvimento da enterotoxemia resultado da ingestão de toxinas termoestáveis. Esses fatores de virulência podem ser produzidos tanto por isolados de *S. aureus* de leite de vacas com mastite clínica como na forma subclínica (ARGUDIN et al., 2010). A produção dos fatores de virulência está envolvida com a patogenicidade do microrganismo, uma vez que contribui para a invasão tecidual e para a resistência a determinados antibióticos.

Dessa forma, conhecer parte do perfil molecular dos isolados causadores de mastite e sua distribuição assume papel fundamental no entendimento dos mecanismos de instalação das infecções intramamárias, auxiliando a elaboração de estratégias de controle e prevenção da mastite bovina.

## **MASTITE BOVINA POR *Staphylococcus aureus***

A mastite, ou inflamação intramamária (IIM) ocorre quando um agente infeccioso, químico, mecânico ou térmico, acomete a glândula mamária, produzindo uma reação inflamatória e danos ao tecido glandular (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). A enfermidade em bovinos pode ser causada por aproximadamente 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, sendo a bactéria com maior prevalência e de principal relevância é *S. aureus*, o qual sua contaminação e disseminação ocorrem durante a ordenha (CAPURRO et al., 2010; MICHEL et al., 2011, KEEFE, 2012).

Uma vez que o reservatório primário da infecção é o gado infectado, o foco de controle está relacionado à biossegurança do rebanho. O controle de agentes patogênicos contagiosos é realizado pela diminuição de novas infecções e redução do reservatório da infecção no rebanho. Rebanhos devem ser fechados ou ter protocolos de biossegurança rigorosos para prevenir a introdução de novas estirpes de patógenos causadores de mastite contagiosa. Os procedimentos de desinfecção dos tetos nos intervalos de pré e pós – ordenha e a terapia da vaca seca auxiliam na diminuição da prevalência de mastite. Há evidências de que a utilização de luvas de ordenha é uma parte integrante do controle de mastite contagiosa e para a produção de leite de alta qualidade (KEEFE, 2012).

O *National Mastitis Council* – Estados Unidos (NMC) enumera 10 princípios básicos para o controle de mastite: (1) estabelecimento de metas para a saúde do úbere, (2) a manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável, (3) procedimentos adequados de ordenha, (4) manutenção e uso adequado dos equipamentos de ordenha, (5) boa manutenção dos registros, (6) apropriado manejo de mastite clínica durante a lactação, (7) manejo eficaz da vaca seca, (8) manutenção da biossegurança para patógenos contagiosos e para comercialização de vacas cronicamente infectadas, (9) o acompanhamento regular do estado de saúde do úbere, (10) revisão periódica do programa de controle de mastite (KEEFE, 2012).

*S. aureus* é reconhecido mundialmente como um dos principais patógenos causadores de mastite em vacas leiteiras, possuindo grande importância econômica em fazendas leiteiras, sobretudo devido à diminuição da qualidade do leite e da produção. É o responsável por mais de 80% de casos de mastite subclínica bovina, o que pode resultar em perda de aproximadamente US\$300,00 por animal (KARAHAN et al., 2009). Os prejuízos causados pela mastite incluem os custos de diagnóstico microbiológico, medicamentos, mão de obra, descarte de leite, redução da produção de leite em razão da mastite clínica e subclínica, descarte do animal ou perda do quarto mamário, risco de transmissão da infecção para outras vacas, além do risco de veiculação de patógenos aos alimentos (SANTOS et al., 2011, KEFEE, 2012).

*S. aureus* produz uma grande variedade de fatores de virulência, associados à parede bacteriana ou secretados, entre eles incluem-se toxinas superantigênicas, enzimas, citotoxinas, exotoxinas e toxinas esfoliativas, que possuem como função principal transformar os componentes do hospedeiro em nutrientes para o crescimento bacteriano. Contribuem com a patogenicidade e são responsáveis pelos sintomas e severidade de infecções subclínicas e crônicas (SRINIVASAN et al., 2006; L-SUNG et al., 2008; HWANG et al., 2010; PINCHUK et al., 2010; SANTANA et al., 2010; FUSCO et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2011).

A patogenicidade de *S. aureus* para o úbere bovino não está

completamente elucidada, mas as exotoxinas estafilocócicas secretadas e suas combinações podem atuar no potencial patogênico do microrganismo (HAVERI et al., 2007).

*S. aureus* é capaz de produzir diversos fatores de virulência e toxinas extracelulares que podem contribuir na patogenicidade de mastites subclínicas e clínicas de vacas e pequenos ruminantes. As técnicas de análise moleculares permitem a identificação de cepas com potencial para produção de determinadas toxinas, já que nem sempre são expressas, permitindo a detecção de genes de fatores de virulência de maneira rápida e confiável, com alta sensibilidade e especificidade (SANTANA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011). Muitos estudos foram conduzidos com o intuito de identificar, por meio do diagnóstico molecular, os genes codificadores de exotoxinas (SRINIVASAN et al., 2006; UNAL et al., 2012).

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus*, pertencente ao gênero *Staphylococcus*, é uma bactéria esférica do grupo de cocos Gram - positivos. Pode apresentar-se de diversas formas, isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente, como um cacho de uva. Em geral, é considerado não encapsulado. É um micro-organismo com dimensões de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, imóvel e não esporulado. Pode ser aeróbio ou microaerófilo, quando sobrevive em baixas concentrações de oxigênio. Produz a enzima catalase, permitindo degradar o peróxido de hidrogênio (SNEATH et al., 1986; ROOIJAKKERS et al., 2005; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007).

A identificação da espécie é baseada na variedade das características fenotípicas, incluindo composição da parede celular, morfologia da colônia, atividade e propriedades moleculares de enzimas, fermentação de carboidratos, resistência à concentração de sal (NaCl), produtos do metabolismo da glicose, resistência a certos antibióticos, requerimentos nutricionais e gás oxigênio, entre outras (SNEATH et al., 1986; SANTOS et al., 2007). Apesar de possuir crescimento em meios comuns, como ágar e caldo simples, em pH 7,0 e temperatura ótima de 37°C, a incubação de amostras em ágar *Baird Parker* é um meio diagnóstico para a espécie, no entanto, para isolamento em amostras clínicas como sangue, pus e fluidos, a primeira inoculação deve ser feita em ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5% a temperatura de 37°C por 18 a 24 horas em condições aeróbias (SNEATH et al., 1986; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007).

É capaz de formar colônias amarelas em meio enriquecido além de produzir  $\alpha$  e  $\beta$ -hemólise em placas de ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5% (PINCHUK et al., 2010). É classificado como mesófilo, e possui temperatura de crescimento que varia de 7 a 47,8°C. O pH ideal para o desenvolvimento é de 7,0 a 7,5, mas é possível o crescimento microbiano em alimentos com pH de 4,2 a 9,3. Em relação à concentração de sódio, microrganismos do gênero *Staphylococcus* tem a capacidade de sobreviver e multiplicar em concentrações de até 15%. O valor mínimo de atividade de água é de 0,86 (SANTANA et al., 2010). Possui a capacidade de fermentar lentamente muitos carboidratos, produzindo ácido láctico, mas não produz gás (SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007).

O microrganismo pode existir como um comensal do organismo humano, integrando a microbiota da pele, de membranas mucosas e de outros sítios

anatômicos (ROOIJAKKERS et al., 2005; SANTOS et al., 2007). Também é encontrado nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Segundo KIM et al. (2012), 20 a 30% da população humana alberga o microrganismo na pele e vias aéreas. Para FOSTER (2009), os hospedeiros colonizados pelo *S. aureus* nas vias respiratórias de forma assintomática são os principais reservatórios do patógeno.

É um patógeno associado a infecções adquiridas tanto no ambiente doméstico como no ambiente hospitalar, também chamado nosocomial (FOSTER, 2009; SINHA & FRAUNHOLZ, 2010). O microrganismo pode sobreviver em tecidos e sangue, provocando infecções de simples resolução até casos mais graves da doença (ROOIJAKKERS et al., 2005; SANTOS et al., 2007). Alguns microrganismos podem ser isolados de vários produtos de origem animal, tais como carne, leite e derivados, e fontes ambientais, como ar, poeira e água. (SNEATH et al., 1986). De acordo com RIVAS et al., (2006), cepas de *S. aureus* isoladas de animais sintomáticos e animais que não apresentam sintomatologia clínica são indistinguíveis, o que evidencia que o desencadeamento da doença causada pelo patógeno depende do sistema imunológico do portador.

*S. aureus* é considerado o principal patógeno humano, mas também está associado com uma variedade de doenças animais. Análises da distribuição genotípica de cepas de *S. aureus* de origens diversas demonstrou certa especificidade do hospedeiro, sugerindo a ocorrência de algumas linhagens estafilocócicas restritas aos animais (L-SUNG et al., 2008; BYSTRÓN et al., 2010). Assim, *S. aureus* associado à pecuária pode ser uma fonte subestimada de cepas patogênicas. Sua virulência depende de uma grande variedade de fatores, principalmente, proteínas extracelulares, como enzimas e exotoxinas, que contribuem no desencadeamento da doença.

Cepas de *S. aureus* podem albergar diferentes genes de virulência que codificam enterotoxinas estafilocócicas (SEs), leucocidinas, esfoliatinas, hemolisinas, toxinas da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) e alelos do gene acessório regulador (*agr*), sendo que a presença ou ausência desses genes é essencial para determinar o potencial de virulência das cepas. O padrão dos genes de virulência e do polimorfismo genético pode ser usado para determinar o “biovar” e a relação com a origem dos isolados (SPANU et al., 2012). Cada linhagem de *S. aureus* tem uma única combinação de proteínas de superfície e reguladores, chamados genes variáveis centrais (CV), e correspondem aos complexos clonais (CCs), resultando em múltiplos recombinantes de genes CV entre as linhagens. Além disso, todas as cepas são portadoras de uma variedade de elementos genéticos móveis (MGE) que codificam genes de resistência e virulência, e há muita variação dentro das linhagens, indicando frequente transferência horizontal. (L-SUNG et al., 2008).

Entre os fatores que contribuem para a virulência deste patógeno, a resistência a antibióticos possui um importante papel. Cepas de *S. aureus* podem ser caracterizadas como resistentes a uma única ou a várias drogas, representando a principal ameaça para a saúde pública, como é o exemplo das cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes (MRSA) (SPANU et al., 2012), patógeno importante na medicina humana, mas que também pode colonizar e causar infecções em várias espécies animais (FEBLER et al., 2010). Em relação ao MRSA, este é um assunto de importância para a saúde pública, já que a cepa MRSA encontrada em bovinos parece agir de maneira similar de outras cepas (KEFEE, 2012).

O uso generalizado de antibióticos em animais pode levar a seleção e a

resistência a antimicrobianos por cepas bacterianas. A detecção de patógenos resistentes a antibióticos, especialmente aqueles resistentes a meticilina, é importante não somente para fins terapêuticos, mas também para monitorar a propagação de cepas resistentes (UNAL et al., 2012). O genótipo bacteriano também pode afetar a capacidade de espécies e estirpes em adquirir resistência, influenciando na habilidade da bactéria em adquirir genes de resistência através da transferência horizontal (BARLOW et al., 2011).

*S. aureus* produz uma grande variedade de fatores de virulência, associados à parede bacteriana ou secretados, entre eles incluem-se toxinas superantigênicas, enzimas, citotoxinas, exotoxinas e toxinas esfoliativas, que possuem como função principal transformar os componentes do hospedeiro em nutrientes para o crescimento bacteriano. Contribuem com a patogenicidade e são responsáveis pelos sintomas e severidade das infecções subclínicas e crônicas (SRINIVASAN et al., 2006; L-SUNG et al., 2008; HWANG et al., 2010; PINCHUK et al., 2010; SANTANA et al., 2010; FUSCO et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2011).

A investigação da distribuição dos fatores de virulência de *S. aureus* fornece informações importantes para estabelecimento de estratégias efetivas de controle de infecções (HWANG et al., 2010; SANTANA et al., 2010). Os produtos do gene associados com a especificidade do hospedeiro poderiam ser alvos ideais para agentes terapêuticos visando prevenir o carreamento e infecções em animais ou humanos, reduzindo a morbidade, letalidade ou perdas na agricultura (L-SUNG et al., 2008).

### **EXOPROTEÍNAS**

*S. aureus* é produtor de diversos fatores de virulência, dentre eles as proteínas extracelulares, ou exoproteínas, que auxiliam na patogenicidade em infecções em organismos humano e animal além de serem responsáveis por casos de intoxicação alimentar (UNAL et al., 2012). As exotoxinas são representadas por enzimas e citocinas como as hemolisinas, nucleases, proteases, lípases, leucocidinas, hialuronidases e colagenases. Alguns microrganismos ainda são capazes de produzirem enterotoxinas estafilocócicas (SEs), toxinas esfoliativas (ETs) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (BALABAN & RASSOLY, 2000; UNAL et al., 2012).

As principais funções das exotoxinas são: mediar aderência do microrganismo ao tecido lesionado, a matriz tecidual ou à superfície das células do hospedeiro; facilitar a destruição tecidual e a disseminação do microrganismo; promover a captura do ferro; auxiliar na evasão de anticorpos e respostas imunes mediadas pelo sistema complemento, incluindo a ação dos fagócitos; e promover lise da célula do hospedeiro (GRUMANN et al., 2013), além da inibição da resposta imune do hospedeiro frente ao *S. aureus*, contribuindo na patogênese da mastite bovina. Sabe-se que *S. aureus* isolados de mastite clínica ou subclínica podem produzir enterotoxinas termoestáveis, responsáveis pelo desenvolvimento de enterotoxemia devido a ingestão destas, inclusive em leite pasteurizado (BARRIO et al., 2006; ARGUDIN et al. 2010; UNAL et al., 2012).

### **SUPERANTÍGENOS ESTAFILOCÓCICOS**

Superantígenos bacterianos (SAGs) são proteínas secretadas com peso molecular entre 22 e 29 kDa. São considerados potentes estimuladores de células



imunes, as quais possuem a função principal de ativação de elevados números de células T de uma maneira não convencional (McCORMICK et al., 2001; KAPPLER et al., 1989; VAISHNANI, 2009; XU & McCORMICK, 2012). Os fatores de virulência e os SAGs podem ser considerados um agente importante na patogênese da mastite bovina, uma vez que esses são capazes de deprimir as atividades bactericidas das células polimorfonucleadas (PMNs), principais células de defesa do sistema imunológico contra patógenos invasores, levando a infecções crônicas e persistentes (MULLARKY et al., 2001; HAVERI et al., 2007; FIJALKOWSKI et al., 2012).

Os SAGs podem ser produzidos por bactérias, vírus e micoplasmas, sendo encontrados principalmente em *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*, mas também podem ser observadas em algumas outras espécies  $\beta$ -hemolíticas de *Streptococcus*, *Staphylococcus* coagulase negativos, *Mycoplasmas arthritidis* e *Yersinia pseudotuberculosis* (XU & McCORMICK, 2012). Os SAGs incluem as SEs, as proteínas semelhantes à enterotoxinas (SEs) e a TSST-1 (LINA et al., 2004; XU & McCORMICK, 2012).

Uma classificação filogenética realizada por McCORMICK et al. (2001) dividiu, de acordo com critérios baseados na evolução, os SAGs de *S. pyogenes* e *S. aureus* em cinco grupos distintos. A TSST-1 é um distinto SAGs que não produz emese, sendo a única toxina enquadrada no Grupo I, esta toxina é conhecida por ser a principal, se não a única, causadora da síndrome do choque tóxico menstrual. O Grupo II é formado por SAGs estafilocócicos e estreptocócicos, como as enterotoxinas estafilocócicas B e C e a exotoxina estreptocócica pirogênica A (SpeA). O Grupo III inclui somente SAGs estafilocócicos, geralmente associados com a intoxicação alimentar estafilocócica, como as SEs A, D e E. Toxinas tanto do Grupo II quanto do Grupo III possuem uma estrutura em forma de laço da cisteína, a qual é importante para a atividade emética. O Grupo IV é formado apenas por SAGs estreptocócicos. No Grupo V a maioria das toxinas são SEI, com exceção da SpeI e a SEI, que possui fraca atividade emética (XU & McCORMICK, 2012).

O sistema imune humano é capaz de reconhecer e delimitar patógenos e seus antígenos, entretanto SAGs representam os únicos fatores de virulência conhecidos que possuem como papel principal a ativação do sistema imune adquirido e ainda são um dos mais potentes mitógenos de células T humanas; sendo considerado um contrassenso devido aos inúmeros fatores de virulência de *S. aureus* com funções designadas para a subversão e evasão imune (VAISHNANI, 2009; XU & McCORMICK, 2012). Os SAGs, apesar de não possuírem atividade direta na fagocitose, são capazes de estimular seletivamente a morte de neutrófilos, aumentando em até 30% a atividade de linfócitos T (SCHUBERTH et al., 2000; FIJALKOWSKI et al., 2012). Muito pouco se sabe sobre a importância dos SAGs na patogênese das IIMs bovinas, porém mais de 60-70% dos isolados de *S. aureus* de origem bovina produzem toxinas ou carregam os respectivos genes (HAVERI et al., 2007).

A forma clássica de ativação de células T do sistema imunológico se dá pela ligação dos receptores das células T (TCR) aos antígenos processados e apresentados pelos complexos maiores de histocompatibilidade (MHC) de células apresentadoras de antígenos (APC). Se a célula T reconhecer o antígeno como não próprio ocorre a produção de tirosina-quinase Lck, a qual irá estimular a proliferação e diferenciação de células T. A resposta é altamente regulada para limitar efeitos nocivos (VAISHNANI, 2009; XU & McCORMICK, 2012). A ativação de células T



mediada por SAGs é devido à sua característica e habilidade em ativar linfócitos T no domínio  $\beta$  da cadeia variante ( $V\beta$ ) do TCR, assim, um elevado número de células T podem ser estimuladas sob a exposição à SAGs (XU & McCORMICK, 2012).

SAGs podem se ligar às superfícies laterais tanto dos TCRs quanto das moléculas de MHC de classe II, fora do sítio de ligação do antígeno, com a finalidade de “distorcer” a interação normal de TCR-MHC-II, de tal modo os laços CDR3 tanto de cadeia  $\alpha$  quanto  $\beta$  de TCR, as quais são importantes para o reconhecimento de antígenos, estão fixados e longe do peptídeo antigênico. Por este mecanismo a ativação de células T passa, então, a não depender mais de antígenos, mas sim da ligação das cadeias  $V\beta$ s ao SAG (LAPIN & FERGUSON, 2009; XU & McCORMICK, 2012).

A ativação massiva de células T por SAGs leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias em grandes quantidades, como por exemplo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), IL-2 e TNF- $\beta$ , fenômeno conhecido como “*cytokine storm*”, resultando em extravasamento capilar e choque sistêmico, característicos de síndromes de choque tóxico (McCORMICK et al., 2001; VAISHNANI, 2009; XU & McCORMICK, 2012).

Os genes de SAG podem existir em diferentes tipos de elementos genéticos móveis como fagos, plasmídeos ou *clusters*, denominados ilhas de patogenicidade (SaPI), como por exemplo o locus *egc*. Genes de virulência ou elementos gênicos podem, também, estar associados a determinantes de resistência e hipervirulência (HAVERI et al., 2007).

### ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são um grupo de proteínas secretadas que se relacionam estruturalmente. Foram identificados nove tipos diferentes de SEs (SEA-SEE, SEG, SEH, SEI e SER), e 12 tipos de SE/ (SE/J-SE/Q, SE/S, SE/U, SEM e SE/X) (XU&McCORMICK, 2012). As SEs estão relacionadas com casos de intoxicação alimentar, devido à ingestão da toxina pré-formada no alimento, sendo a 95% dos surtos são atribuídos aos tipos clássicos das SEs (SEA-SEE), e o restante dos surtos são causados pelas novas SEs (SRINIVASAN et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2011; LYRA et al., 2013). Além da atividade emética, todas as SEs e SE/s referidas previamente apresentam uma característica biológica de pirogenicidade e superantigenicidade, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro à síndrome do choque tóxico (FUSCO et al., 2011), além de possuírem habilidade para provocar êmese e gastroenterite (PINCHUK et al., 2010).

As SEs pertencem ao grupo dos superantígenos das toxinas pirogênicas (DERZELLE et al., 2009), que tem a capacidade de desviar do reconhecimento de antígenos convencional através da ligação cruzada das moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) das células apresentadoras de antígenos para os TCRs, com isso tem-se a estimulação de alta produção de células T possuindo um elemento V particular nos receptores, e a liberação de citocinas, o que pode ocasionar em uma síndrome do choque tóxico (BALABAN&RASOOLY, 2000; OMOE et al., 2002; SRINIVASAN et al., 2006; DERZELLE et al., 2009).

De acordo com o Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos Estafilocócicos (*International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature* – INCSSN), apenas os superantígenos que induzem êmese após administração oral em modelo experimental em primatas pode ser designado SEs. Aqueles que não promovem êmese ou não foram testados

devem ser denominados de proteínas semelhantes a enterotoxinas (SEs), mesmo possuindo homologia e similaridade estrutural com as SEs (LINA et al., 2004; DERZELLE et al., 2009; SANTANA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011; XU & McCORMICK, 2012).

As SEs são proteínas de baixo peso molecular, com massa molecular entre 24 e 30 kDa, e possuem ponto isoeletrico entre 7 e 8,6 (JOHNSON et al., 1991; BORGES et al., 2008; SANTANA et al., 2010). São estáveis em altas temperaturas e em ácido, além de serem resistentes a enzimas proteolíticas, como tripsina, quimiotripsina, renina e outras, permitindo, assim, sua passagem pelo trato gastrointestinal (BORGES et al., 2008; PELISSER et al., 2010; SANTANA et al., 2010). Apresentam altas concentrações de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina, que juntos representam aproximadamente 25-30% dos aminoácidos da proteína. A produção de SEs pode ser influenciada pela temperatura, pH, atividade de água, tamanho do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e condições atmosféricas do substrato (WONG & BERGDOLL, 2002; SANTANA et al., 2010).

Cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de enterotoxinas possuem diferentes perfis genéticos de SEs, podendo albergar vários genes simultaneamente. Os genes codificadores de enterotoxinas estão localizados em elementos genéticos móveis, como fagos, que alberga *sea*, *see* e *sep*; plasmídeos, que alberga, por exemplo, *sed*, *sej*, *ser* e *set*; e ilhas de patogenicidades, conhecidas como SaPIs (KURODA et al., 2001; OMOE et al., 2005; DERZELLE et al., 2009). Ainda podem estar localizados em um *cluster* genético, como é o caso dos genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo*, e ocasionalmente *seu* ou *sev*; estes fazem parte do *enterotoxin gene cluster* (*egc*), que ainda agrupa dois pseudogenes ( $\square ent1$  e  $\square ent2$ ), esse *cluster*, organizado na ilha de patogenicidade SaPI3, é descrito como o início das SEs, no qual novos genes codificadores de superantígenos estafilocócicos poderiam ser formados a partir de recombinações genéticas (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006; DERZELLE et al., 2009; ZOCHE et al., 2010).

### TOXINA DA SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO

A toxina da síndrome do choque tóxico -1 (TSST-1) é reconhecida como a principal causa de síndrome do choque tóxico (TSS), caracterizada por febre, hipotensão, congestão de múltiplos órgãos e choque em humanos (BERGDOLL et al., 1981; TAKEUCHI et al., 1998; LERICHE et al., 2012). A toxina possui muitas propriedades biológicas em comum com outras exotoxinas pirogênicas, incluindo a habilidade de induzir febre, de aumentar o choque endotóxico, estimular a proliferação não específica das células T, e em induzir a liberação de IL-1 e TNF- $\alpha$  (TAKEUCHI et al., 1998).

A TSS foi primeiramente relatada em 1978, por TODD et al. (1978) associada com uma doença sistêmica não invasiva de *S. aureus* em crianças e adolescentes (SCHLIEVERT et al., 1981; DINGES et al., 2000; KIMBER et al., 2013). No início dos anos 80 uma epidemia de TSS ocorreu nos Estados Unidos em mulheres jovens. Quase todos os casos de TSS foram associados com menstruação, uso de tampões e colonização vaginal ou cervical de *S. aureus*. TSST-1 foi a primeira toxina identificada como causadora de TSS, e esta toxina é aceita como a causa de 100% dos casos de TSS associados com menstruação, já que em estudos prévios de casos de TSS, não foi observado bacteremia, sugerindo que a TSS fosse ocasionada por intoxicação por produtos previamente elaborados por *S.*

*aureus* (SCHLIEVERT et al., 1981; BERGDOLL & SCHLIEVERT, 1984; DINGES et al., 2000).

A TSS pode ser dividida em duas formas: menstrual (mTSS) e não menstrual (nmTSS) (LAPIN & FERGUSON, 2009; LERICHE et al., 2012), esta resultado de uma infecção estafilocócica inicial ou pela colonização por cepas *S. aureus* produtoras de toxinas. Pode ocorrer após lesão da pele ou membrana mucosa, em associação com abscessos, ou até mesmo após procedimentos cirúrgicos, embora nenhuma fonte de infecção foi confirmada (LAPIN & FERGUSON, 2009). De acordo com o *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos, foram estabelecidos cinco critérios para determinar o estabelecimento da TSS em um paciente, sendo que um caso positivo é aquele que atende os cinco critérios, e caso provável é aquele com quatro critérios. Os critérios são: febre acima de 38,9°C; eritema macular difuso; descamação após uma a duas semanas do aparecimento do eritema; hipotensão; e comprometimento múltiplo dos órgãos (CDC, 2011; LERICHE et al., 2012).

A TSST-1 atua como um SAg, no qual a toxina possui a habilidade de ativar excessivamente e de forma não convencional células T e inibindo, conseqüentemente, a ativação de outras células, além de estimular a liberação de citocinas e quimiocinas. Os SAgS identificados são proteínas de cadeia única expressas com moléculas precursoras, que após passarem por clivagens, liberam a toxina extracelular funcional. A TSST-1 é capaz de formar uma ponte entre o TCR e as moléculas de MHC II, sem que estes dois componentes do sistema imune do hospedeiro se interajam diretamente, compondo uma interação similar á interação convencional TCR-MHC II, tornando um ativador celular potente (LAPIN & FERGUSON, 2009).

A TSST-1 é codificada pelo gene *tst* presente no cromossomo bacteriano em um elemento genético móvel de 15,2 kb conhecido como ilha de patogenicidade 1 (DINGES et al., 2000). A proteína é formada por um polipeptídeo de cadeia única com peso molecular igual a 22 kDa e um ponto isoelétrico de 7,2. Possui uma alta porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos, mas é altamente solúvel em água. A toxina é resistente ao calor e proteólise, ficando estável e não alterando sua atividade biológica mesmo após permanecer uma hora em ebulição ou após exposição prolongada à tripsina (DINGES et al., 2000). O gene *tst*, que codifica o SAg TSST-1 é comumente encontrado em *S. aureus* isolados de mastites bovinas, geralmente associado com as enterotoxinas SEC e SEB (PETON & LELOIR, 2013).

A presença do gene *tst* está associada com alguns genes para enterotoxinas, como o gene para enterotoxina J, enterotoxina G, e, principalmente, o gene para enterotoxina C (*sec*). Nos estudos de AKINEDEN et al. (2001) e STEPHAN et al. (2001), realizado com 103 e 34 isolados de *S. aureus* de leite de vacas com mastite bovina, respectivamente, os autores verificaram que todos os isolados positivos para a presença do gene *tst*, foram também positivos para o gene *sec*. Contudo, GUNAYDIN et al. (2011), identificaram que apenas um dos sete isolados de *S. aureus* que carregava o gene *tst* estava associado a presença do gene *sec*. A presença do gene *tst* associado com gene para as enterotoxinas estafilocócicas indica a possibilidade do gene estar associado com o aumento da patogenicidade dos isolados, bem como com a patogênese da mastite (KARAHAN et al., 2009).

## TOXINAS ESFOLIATIVAS

As toxinas esfoliativas (ETs) são fatores de virulência secretados de *S. aureus*. São isoformas de enzimas de serina-proteases que possuem alta especificidade pelo substrato, e tem a função de clivar caderinas desmossomais nas camadas da pele, facilitando a invasão bacteriana neste órgão, tornando-se responsáveis pelas manifestações clínicas da doença em humanos denominada de Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada (SSSS - *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*) (BUKOWSKI et al., 2010; GRUMANN et al., 2013). As ETs, quando estão purificadas, possuem peso molecular de aproximadamente 30 kDa, e são divididas em três, ETA, ETB e ETD (BUKOWSKI et al., 2010).

Os mecanismos de ação das ETs são incertos, no entanto uma teoria sobre o modo de ação da toxina foi desenvolvida simultaneamente com os esforços de demonstrar sua atividade proteolítica. Baseado na informação de outras toxinas estafilocócicas, foi proposto que as ETs funcionassem como superantígenos, porém os resultados iniciais em relação a atividade superantigênica de ETs foram confusas e contraditórias (VAISHNANI, 2009; BUKOWSKI et al., 2010). Alguns estudos indicaram que ETs são superantígenos, e que as atividades mitogênicas são independentes da atividade proteolítica, no entanto as duas toxinas demonstraram ter efeitos menores que os SAgS clássicos (MONDAY et al., 1999; BUKOWSKI et al., 2010).

Pelo fato das lesões de SSSS não demonstrarem evidências de recrutamento de células, é presumido que a superantigenicidade das ETs não está envolvida na patogênese da doença, uma vez que é sugerido que a atividade proteolítica independe da atividade mitogênica. Com isso, a atividade proteolítica das ETs parece ser responsável pela exfoliação da pele na SSSS, no entanto a atividade mitogênica não está associada com as manifestações da doença, podendo ter atuação fisiológica ou ser observada em condições particulares de experimentos (BUKOWSKI et al., 2010).

As ETs são exotoxinas altamente espécie-específicas, assim como algumas cepas. A adaptação da atividade das ETs de acordo com as diferentes estruturas das desmogleínas, proteínas alvo das ETs, de cada espécie indica a transferência horizontal e troca de genes entre cepas, permitindo assim a troca de hospedeiros. Tal transferência é possível devido ao fato da localização dos genes de Ets ser em elementos genéticos móveis, já que o gene codificador de ETA é um fago, denominado  $\Phi$ ETA; o gene de ETB, *etb*, é codificado por plasmídeo, o pETB, codificador de outros genes de fatores de virulência, e o gene de ETD está localizado em ilhas genômicas (BUKOWSKI et al., 2010, GRUMANN et al., 2013).

## LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE

As leucotoxinas são uma família de proteínas “formadoras de poros”, são proteínas com peso molecular entre 32 e 35 kDa e constituídas de duas classes de proteínas, a classe S e a classe F, codificadas por genes do núcleo do genomas, o core-genoma, ou por fagos, podendo ser adquirido por transferência horizontal. A subunidade S tem como função se ligar à célula do hospedeiro, ativando assim a sua junção a cadeia F, permitindo que esta forme ligações hexaméricas ou octaméricas, motivando a ações biológicas, como a elaboração de uma estrutura em forma de poro (BARRIO et al., 2006; GRUMANN et al., 2013; YOONG & TORRES, 2013). A associação da leucocidina à célula alvo desencadeia a formação de canais de cálcio, formando poros transmembrana permeáveis à íons monovalentes,

levando a destruição celular (PRÉVOST et al., 2001; BARRIO et al., 2006). Foram descritas cinco classes das subunidades F (HlgB, LukF-PV, LukD, LukF'-PV e LukG) e seis classes de subunidades S (HlgA, HlgC, LukSPV, LukE, LukM e LukH) (GRUMANN et al., 2013).

Estão relacionadas em eventos de lise de células da linhagem mielóide (monócitos, macrófagos e neutrófilos), mas também possuem ação citotóxica em células como eritrócitos, trombócitos e linfócitos, sendo prováveis responsáveis por interferir na defesa imune. São consideradas toxinas importantes para a evasão de *S. aureus* ao sistema imune. Além disso, leucotoxinas são capazes de induzir fagócitos a liberarem grande quantidade de mediadores inflamatórios e levar a sua degranulação (SIQUEIRA et al., 1997; BARRIO et al., 2006; VENTURA et al., 2010; DUMONT et al., 2011; FIJAKOWSKI et al., 2012; GRUMANN et al., 2013; YOONG & TORRES, 2013).

Apresentam distribuição epidemiológica e associação com doença clínica em humanos ou em mastites em bovinos leiteiros. Isolados de *S. aureus* produtores de Leucocidina Pantón-Valentine (PVL) estão associadas com casos de piodermites e pneumonias necrosantes. A leucocidina LukE/D foi relatada em isolados de diarreia, após tratamento com antibióticos. Já os genes LukM/LukF'-PV foram encontrados em isolados de mastite de ruminantes (PRÉVOST et al., 2001; RAINARD et al., 2003; FUEYO et al., 2005; BARRIO et al., 2006).

Em um estudo realizado por HAVERI et al. (2007), no qual foram pesquisados genes de exotoxinas e suas combinações em isolados de *S. aureus* de mastite clínica e subclínica bovina foi observada alta frequência de genes lukED, o que indica que tais genes são essenciais para a patogênese de IIMs estafilocócicas bovina. Outros genes de leucocidinas importantes na patogenia de mastites bovinas são os genes das leucotoxinas LukM/LukF'-PV e da c-hemolisina (PETON & LELOIR, 2013).

Um profago variante de PVL, LukF'M, produtor da toxina lukM/lukF' – PV, foi identificado de isolados bovinos de *S. aureus*. Esta toxina é uma leucocidina altamente citotóxica para células polimorfonucleadas (PMNs), como neutrófilos, de bovinos, capaz de provocar a lise de tais células do organismo de bovinos, possuindo assim papel importante na indução de mastites clínicas e subclínicas. O gene *lukM* está presente em isolados de mastite de cabras, ovelhas e vacas, sendo considerado mais prevalente em isolados de *S. aureus* bovinos (RAINARD et al., 2003; BARRIO et al., 2006). Cepas de *S. aureus* que possuem *lukM* em seu genoma são capazes de predominar em infecções intramamárias persistentes, quando comparadas com cepas que não possuem tal gene (HAVERI et al., 2007; SCHLOTTER et al., 2012; GRUMANN et al., 2013; PETON & LELOIR, 2013).

Em estudos realizados com *S. aureus* isolados de mastites, o gene *lukM/lukF'-PV* foi associado a ocorrência de mastite gangrenosa em cabras leiteiras, devido à grande produção de  $\alpha$ - hemolisina e leucocidina LukM/LukF'-PV (RAINARD et al., 2003; LEMARECHAL et al., 2011). Entretanto, em experimentos os quais foram administrados a leucotoxina LukM/LukF'-PV purificada não foi observada a forma gangrenosa da mastite em bovinos (FROMAGEAU et al., 2011), sugerindo que para a ocorrência dos sintomas mais severos seja necessária a associação da leucocidina com outros fatores de virulência (PETON & LELOIR, 2013).

A Leucocidina Pantón-Valentine (PVL; *lukF-PV + lukS-PV*) está associada com infecções recorrentes e crônicas de pele e de tecidos moles ocasionadas por *S. aureus* (SSTIs – *skin and soft tissue infections*) - exemplificadas por furunculoses e

abscessos - doenças comuns causadas pelo microrganismo fora do ambiente hospitalar; além de estar implicado também em pneumonia necrosante (GRUMANN et al., 2013; SHALLCROSS et al., 2013). Esta exotoxina produzida por *S. aureus* é responsável pela destruição de leucócitos e necrose tecidual (ARGUDIN et al. 2010; UNAL et al., 2012).

Em casos de mastite bovina, a toxina PVL é capaz de formar poros nas membranas das células, provocar mudanças pró-inflamatórias em células mamárias, inativar o sistema imunológico, levar à degradação dos tecidos, prover a bactéria de nutrientes necessários à multiplicação e à disseminação para novos sítios (HAVERI et al., 2007). Outra função importante é a atividade leucocítica, ocasionando imunossupressão nos hospedeiros do microrganismo (HAVERI et al., 2007).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da importância das toxinas secretadas por *S. aureus* na patogênese da mastite ainda permanecer incerta, sugere-se que os superantígenos e as leucotoxinas possuam um papel importante no estabelecimento da infecção e no progresso da mastite bovina, devido à habilidade em regular o sistema imune. O fato de microrganismos isolados de mastites bovinas possuírem genes de fatores de virulência envolvidos em enfermidades humanas faz do leite de vacas com mastites um perigo em potencial para a saúde humana, ressaltando o perigo quanto ao consumo de leite cru e a necessidade de higiene em seu processamento.

### REFERÊNCIAS

AKINEDEN, O.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 959-964, 1991. ARGUDIN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.

BALABAN, N.; RASOOLY. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BARLOW, J. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. **Journal of Mammary Gland, Biology and Neoplasia**, v. 16, n.4, p. 383-407, 2011.

BARRIO, M.B.; RAINARD, P.; PREVOST, G. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. **Microbes and Infection**, v.8, n.8, p.2068-2074, 2006.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; DAVIS, J.P. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**, v. 9, n. 1, p. 1017-1021, 1981

BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil da contaminação por estafilococos e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**,

v.38, n.5, p.1434-1438, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 51** de 18 de setembro de 2002, Brasília: MAPA/SE, 2002.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Panorama do leite, ano 6, n. 65 – Juiz de Fora [online], 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília : Mapa/ACS, 2013. 96 p.

BYSTRON, J.; PODKOWIK, M.; PIASECKI, T.; WIELICZKO, A.; MOLEND, J.; BANIA, J. Genotypes and enterotoxin gene content of *S. aureus* isolates from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 3-4, p.498-501, 2010.

BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1148-1165, 2010.

CAPURRO, A.; ASPÁN, A.; ERICSSON UNNERSTAD, H.; PERSSON WALLER, K.; ARTURSSIN, K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 180-191, 2010.

Center for Disease Control. Toxic-Shock Syndrome: 2011 Case Definition.

DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**, v. 26, p. 896-904, 2009

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DUMONT, A.L.; NYGAARD, T.K.; WATKINS, R.L.; SMITH, A.; KOZHAYA, L.; KREISWIRTH, B.N.; SHOPSIN, B.; UNUTMAZ, D.; VOYICH, J.M.; TORRES, V.J. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 814-825, 2011.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causados por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Revista Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FEBLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n.4, p. 619-625, 2010.

FIJALKOWSKI, K.; CZERNOMYSY-FUROWICZ, D.; NAWROTEK, P.; POBUCEWICZ, A. Secretory virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates obtained from mastitic bovine milk – effect on bovine polymorphonuclear  
**ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 1699 2014



neutrophils. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p.82-87, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS – FAO, FAO Statistical Year Book – Roma, 2013.

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

FROMAGEAU, A., CUNHA, P., GILBERT, F.B., RAINARD, P. Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F0 does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 6, p. 396-401, 2011.

FUSCO, V.; QUERO, G. M.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiol**, Rome v. 144, n. 3, p. 528-537, 2011.

FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R.; MUNIZ, J.; ALVAREZ, M.A.; MARTIN, M.C. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1278-1284, 2005.

GRUMANN,D.; NUBEL, U.; BROKER, B.M. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v., n., p., 2013.

GUNAYDIN, B.; ASLANTAS, O.; DEMIR, C. Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 8, p. 1633-1637, 2011.

HAVERI, M.; ROSLO, A.; RANTALA, L.; PYORALA, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103 n. 4,p. 993-100, 2007.

HWANG, S. Y.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; PARK, Y. H. *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, p. 125-131, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, Indicadores IBGE, Produção da Pecuária Municipal [online] – Brasil, 2010.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001. Nota de correção em: **Journal of Immunology**, v.166, p.4260, 2001.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASTHON, F. E.; POLLARD, D. R.;

ROZEE, K. R. 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, n. 3, p. 426-430. 1991.

KAPPLER J, KOTZIN B, HERRON L, GELFAND EW, BIGLER RD, BOYLSTON A, CARREL S, POSNETT DN, CHOI Y, MARRACK P. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. **Science**, v. 244, n. 4906, p. 811-813, 1989.

KARAHAN, M.; AÇIK, M. N.; ÇETINKAYA, B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 8, p. 1029-1035, 2009.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n.2, p. 203-216, 2012.

KIM, H. K.; THAMMAVONGSA, V.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 1 p. 92-99, 2012.

KIMBER, I.; NOOKALA, S.; DAVIS, C.C.; GERBERICK,G.F.; TUCKER, H.; FOERTSCH, L.M.; DEARMAN, R.J.; PARSONNET,J.; GOERING, R.V.; MODERN, P.; DONELLEN, M.; MOREL, J.; KOTB, M. Toxic Shock Syndrome: Characterization of human immune response to TSST-1 and evidence for sensitivity thresholds. **Toxicological sciences**, v.134, n.1, p. 49-63, 2013.

KOSKINEN, M. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. p. 952-959, 2009.

KURODA, M.; OHTA, T.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; OGUCHI, A; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMTSU, K. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 357, n. 9264, p. 1225-1240, 2001.

LAPPIN, E; FERGUSON, A.J. Gram-positive toxic shock syndromes. **The Lancet of Infectious Disease**, v. 9, n. 5, p. 281-291. 2009.

LERICHE, T. BLACK, A.Y. FLEMING, N.A. Toxic shock syndrome of a probable gynecologic source in an adolescent: a case report and review of the literature. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 25, n. 6, p. 133-137, 2012.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R.; SUPERANTIGENS, I.C.N.F.S. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v. 189,

n. 12, p. 2334-2336, 2004.

L-SUNG, J. M.; LLOYD, D. H.; LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Journal of Microbiology**, v. 154, n.7, p. 1949-1959, 2008.

LYRA, D.G.; SOUSA, F.G.C.; BORGES, M.F.; GIVISIEZ, E.N.P.; QUEIROGA, R.C.E. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 126-130, 2013

MCCORMICK, J.K.; YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 77-104, 2001.

MICHEL, A.; SYRING, C.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Intramammary infections with the contagious *Staphylococcus aureus* genotype B in Swiss dairy cows are associated with low prevalence of coagulase-negative staphylococci and *Streptococcus* spp. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 313-317, 2011.

MONDAY, S.R.; VATH, G.M.; FERENS, W.A.; DEOBALD, C.; RAGO, J.V.; GAHR, P.J.; MONIE, D.D.; IANDOLO, J.J.; CHAPES, S.K.; DAVIS, W.C.; OHLENDORF, D.H.; SCHLIEVERT, P.M.; BOHACH, G.A. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 8, p. 4550-4559, 1999.

MULLARKY, I.K.; SU, C.; FRIEZE, N.; PARK, Y.H.; SORDILLO, L.M. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 45-51, 2001.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harbouring *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.; SHAINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, p.191-198, 2005.

PELISSER, M.R.; KLEIN, C.S.; ASCOLI, K.R.; ZOTTI, T.R.; ARISI, A.C.M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 145-148, 2009

PETON, V.; LELOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infections**,

**Genetics and Evolutions**, v. 21, p. 602-615, 2013.

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

PREVOST, G.; MOUREY, L.; COLIN, D.A; MENESTRINA, G. Staphylococcal poreforming toxins. **Current Topics of Microbiology and Immunology**, v. 257, p. 53-83, 2001.

RAINARD, P.; CORRALES, J.C.; BARRIO, M.B.; COCHARD, T.; POUTREL, B. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF0-PV leukotoxin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 272-277, 2003.

RIVAS, A. L.; SCHWAGER, S. J.; GONZÁLEZ, R. N.; QUIMBY, F. W.; ANDERSON, K. L. Multifactorial relationships between intramammary invasion by *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n.2, p. 135-144, 2007.

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

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

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

SCHLIEVERT, P. M.; SHANDS, K. N.; DAN, B. B.; SCHMID, G. P.; NISHIMURA, R. D. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. **Journal of Infectious Disease**, v. 143, n. 4, p. 509–516, 1981.

SCHLOTTER, K.; EHRLICH, R.; HOTZEL, H.; MONECKE, S.; PFEFFER, M.; DONAT, K. Leukocidin genes lukF-P83 and lukM are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. **Veterinary Research**, v. 15, n. 42-43, p. 1-8, 2012.

SCHUBERTH, H.J.; KRUEGER, C.; HENDRICKS, A.; BIMCZOK, D.; LEIBOLD, W. Superantigen-dependent accelerated death of bovine neutrophilic granulocytes in vitro is mediated by blood mononuclear cells. **Immunobiology**, v. 202, n. 5, p. 493–

507. 2000.

SHALLCROSS L.J.; FRAGASZY, E.; JOHNSON, A.M.; HAYWARD, A.C. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p. 43-54. 2013.

SILVA, E. C. B. F.; MACIEL, M. A. V.; MELO, F. L.; ANTAS, M. G. C.; NETO, A. M. B.; RABELO, M. A. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, v. 52, n. 2, p. 168-172, 2007.

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

SIQUEIRA, J.A.; SPEEG-SCHATZ, C.; FREITAS, F.I.; SAHEL, J.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. Channel-forming leukotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 486–494. 1997.

SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPL, M. E., HOLT, J. G. Gram positive cocos. In: **Bergey's Manual os Systematic Bacteriology**, volume 2. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. cap 12, p. 999-1103.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 53-57, 2012.

SRINIVASAN, V.; SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.J.; CEASARIS, L.; OLIVER, S.P. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 3, p. 274-28, 2006.

STEPHAN, R.; ANNEMUELLER, C.; HASSAN, A.A.; LAEMMLER, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 373-378.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 79-89, 1994.

TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 251-258, 1998.

THOMAS, L.C.; GIDDING, H.F.; GINN, A.N.; OLMA T.; IREDELL J. Development of a real-time *Staphylococcus aureus* and MRSA (SAM-) PCR for routine blood culture. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 2, p. 296-302, 2007.

TODD, J.; FISHAUT, M.; KAPRAL, F.; AND WELCH, T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. **Lancet**, v. 2, n. 8100, p. 1116–1118, 1978.

ÜNAL, N.; ASKAR, Ş.; MACUN, H.C.; SAKARYA, F.; ALTUN, B.; YILDIRIM, M. Panton–Valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profiles of staphylococci isolated from milks of small ruminants. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 3, p. 573-9, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Dairy: World, Markets and Trade – USA [online], 2012.

VAISHNANI, J. Superantigen. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, n. 5, p. 540-544. 2009.

VASCONCELOS, N.G.; PEREIRA, V.C.; ARAUJO JUNIOR, J.P.; CUNHA, L.R.S. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 749-762, 2011.

VENTURA, C.L.; MALACHOWA, N.; HAMMER, C.H.; NARDONE, G.A.; ROBINSON, M.A.; KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. **Plos One**, v. 5, n. 7, p. 1-11, 2010.

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

WONG, A.C.L.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal Food Poisoning. **Foodborne Diseases**, v.2, p. 231-248, 2002.

YOONG, P.; TORRES, V.J. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 63-69, 2013.

ZOCHE, F.; FRANÇA, R.C.; ALEIXO, J.A.G.; MOREIRA, A.N.; SILVA, W.P. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados em alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**, v.34, p.487-491, 2009.