

## PRODUÇÃO DE HEMOLISINAS POR *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE CASOS DE MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA

[Production of hemolysins by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis]

Elizabeth R. da Silva<sup>1\*</sup>, Tatiene R. M. Silva<sup>2</sup>, Angélica M. G. Pereira<sup>2</sup>, Acidália C. Machado<sup>3</sup>, Kleber R. Santoro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE-UAG), Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP.: 55292-270, Garanhuns, PE, Brasil

<sup>2</sup>Discente do curso de Medicina Veterinária, UFRPE-UAG

<sup>3</sup>Programa de Residência, Laboratório de Bacterioses, UFRPE- Campus Recife

**RESUMO** - Com o objetivo de avaliar a produção das hemolisinas alfa, beta e delta, foram analisadas 78 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina subclínica. Em ágar sangue de ovino e/ou equino, 100% das amostras apresentaram atividade hemolítica, com 58 amostras produzindo a toxina alfa; 73 a delta e 76 a beta, correspondendo a 74,4, 93,6 e 97,4% das amostras, respectivamente. A análise da produção combinada mostrou que em 70,5% das amostras houve co-produção de alfa+beta+delta; em 20,5% beta+delta; em 2,6% alfa+beta; e em 1,3% alfa+delta. A produção de um único tipo de toxina foi observada em apenas quatro amostras, sendo três (3,8%) produtoras da toxina beta e uma (1,3%) amostra da toxina delta. A mensuração do diâmetro dos halos hemolíticos indicou produção de uma grande quantidade de toxina. Além disso, a maioria das amostras (70,5%) demonstrou atividade hemolítica às 24 horas de incubação. Estes resultados demonstraram que vacas com mastite subclínica são um importante reservatório de *Staphylococcus aureus* com habilidade de produzir hemolisinas.

**Palavras-Chave:** glândula mamária; fator de virulência; citotoxina.

**ABSTRACT** - Alpha, beta and delta hemolysins were evaluated in 78 samples of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. On sheep and/or horse blood agar, 100% of the isolates produced hemolytic activity and 58 were positive for alfa-toxin; 73 for delta-toxin and 76 for beta-toxin, which accounted for 74.4, 93.6 and 97.4% of the isolates, respectively. The production of alpha+beta+delta toxins was observed in 70.5% of the isolates; beta+delta in 20.5%; alpha+beta in 2.6%; and alpha+delta in 1.3%. Four isolates produced one toxin type alone with three (3.8%) of them producing beta-toxin and one (1.3%) delta-toxin. The measurement of the hemolytic area showed a high amount of toxin production. Also, the majority of isolates (70.5%) produced hemolysis at 24 hours after incubation. These results demonstrated that cows with a subclinical mastitis are an important reservoir of hemolytic *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** mammary gland; virulence factor; cytotoxin.

### INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é a bactéria Gram-positiva mais importante e frequente em enfermidades de hospedeiros mamíferos e o agente etiológico mais frequente da mastite bovina contagiosa, sendo praticamente impossível a sua erradicação (Lahouassa et al., 2007). Em vacas infectadas por essa bactéria, estima-se que a produção de leite esteja reduzida em até 15%; um único quarto mamário infectado poderá ter a

produção reduzida em até 45% (Brito & Brito, 1998).

O curso clínico da mastite por *S. aureus* é caracterizado por uma fase aguda que geralmente evolui para a forma subclínica ou uma forma crônica, podendo persistir por toda a vida do animal (Lahouassa et al., 2007). A persistência na glândula mamária está relacionada à produção de mais de 30 fatores de virulência que podem ser expressos por esse micro-organismo, destacando-se as toxinas citolíticas, tais como as hemolisinas alfa, beta e

\* Autor para correspondência: elizabeth@uag.ufrpe.br

delta, que estão associadas às alterações patológicas observadas durante o curso de infecções estafilocócicas, tais como a formação de abscessos, lesões hemorrágicas e necróticas (Dinges et al., 2000; Burnside et al., 2010).

A hemolisina ou toxina alfa é a mais estudada e mais bem caracterizada das citotoxinas produzidas por *S. aureus* e considerada um dos principais fatores de patogenicidade desta bactéria, em função dos seus efeitos hemolíticos, dermonecroticos e neurotóxicos (Dinges et al., 2000). É secretada por *S. aureus* como monômeros solúveis em água que são integrados dentro das membranas de diversos tipos de células de mamíferos, onde formam heptâmeros cilíndricos capazes de formar poros de tamanhos variados com conseqüente alteração da permeabilidade seletiva, determinando lise osmótica, formação de vacúolos e defeitos em enzimas mitocondriais, interferindo com a produção de ATP (Menestrina et al., 2001; Suriyaphol et al., 2009).

A hemolisina beta tem atividade de fosforilase e apresentando alta afinidade pelas membranas plasmáticas de vários tipos celulares, degradando especificamente a esfingomielina presente no folheto fosfolípido externo (Coelho et al., 2009). Embora não cause lise celular, esta toxina causa instabilidade na membrana plasmática, tornando-a susceptível aos efeitos de vários fatores, tais como mudanças de pH, carga iônica e variação de temperatura (Sabini et al., 2001). A atividade hemolítica desta toxina é aumentada após incubação a temperaturas inferiores a 15 °C, sendo assim referida como "hot cold" hemolisina (Quinn et al., 1994; Dinges et al., 2000).

A hemolisina delta é um pequeno peptídeo capaz de causar lise em uma variedade de células de mamíferos, além de eritrócitos, e estruturas intracelulares, tais como organelas com envoltório celular (Dinges et al., 2000). Um papel específico desta hemolisina na patogênese das infecções estafilocócicas ainda não está claramente estabelecido (Burnside et al., 2010).

De acordo com Chih-Wei et al. (2011), a produção de hemolisinas determina a patogenicidade de diversos agentes bacterianos, uma vez que ao degradar os tecidos do hospedeiro permitem a invasão e disseminação, além da evasão à resposta imune. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi detectar a produção das hemolisinas alfa, beta e delta em *S. aureus* isolados de mastite bovina subclínica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras bacterianas

Foram utilizadas 78 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite subclínica de vacas pertencentes a três rebanhos leiteiros comerciais localizados no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco. As amostras de *S. aureus* foram isoladas a partir do cultivo de leite coletado após rigorosa antissepsia da extremidade final dos tetos com álcool 70%. Um total de 10 mL de leite foi coletado em tubos estéreis e acondicionado em caixas isotérmicas (4-5°C), sendo encaminhado ao laboratório de Microbiologia do CENLAG, UFRPE-UAG, e inoculado em ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de ovino, de acordo com as recomendações do *National Mastitis Council - NMC* (2004). As colônias bacterianas foram identificadas com base nas características morfológicas, tintoriais e teste de catalase. Cocos Gram-positivos, catalase positivos e com crescimento em ágar sal-manitol (Himedia) foram submetidos ao teste da coagulase em tubo, utilizando plasma de coelho (Laborclin), produção de acetoina e fermentação de maltose, trealose e manitol, este em ambiente anaeróbico. Bactérias positivas em todas as provas foram caracterizadas como *S. aureus*. Todos os testes foram realizados de acordo com Quinn et al. (1994). A chave de identificação de *Staphylococci* foi a sugerida por Kloos (1990). Como controle positivo utilizou-se a cepa *S. aureus* ATCC 29213 em todos os testes. Todas as amostras foram mantidas congeladas em caldo enriquecedor (BHI, Himedia) contendo 15% de glicerol (v/v), até a realização dos testes hemolíticos.

### Indução da produção de hemolisinas

A atividade hemolítica foi avaliada em ágar bacteriológico (Himedia) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovino, para a detecção das hemolisinas alfa e beta, e 5% de sangue desfibrinado de equino para a detecção da hemolisina delta (Quinn et al., 1994). Para a remoção de possíveis compostos anti-hemolisina o sangue desfibrinado foi submetido a três lavagens seriadas com salina estéril e ressuspenso com salina ao volume de sangue original. Cada uma das amostras de *S. aureus* foi previamente inoculada em caldo enriquecedor (BHI, Himedia) e incubada a 37 °C por 18 a 24 horas. A transferência para as placas de ágar sangue ovino ou equino foi feita com auxílio de alça bacteriológica com o inóculo em forma de estrias. As placas foram incubadas a 37 °C, realizando leitura as 24 e 48 horas. Para a identificação das diferentes hemolisinas foram utilizados os critérios sugeridos por Quinn et al. (1994): hemolisina alfa - zona hemolítica completa ou transparente e com bordas

indefinidas ou borradas; hemolisina beta - zona hemolítica incompleta ou não transparente, tornando-se transparente e com bordas definidas após incubação overnight a 5 °C; e hemolisina delta – zona hemolítica completa. A intensidade dos halos hemolíticos foi avaliada a cada leitura, medindo-se o diâmetro em milímetros, posicionando a régua de uma borda a outra do halo, incluindo o crescimento bacteriano. Aos valores observados foram atribuídos os seguintes escores: 1= <2 mm; 2= ≥2-7 mm; 3= ≥8-12 mm; e 4= ≥13 mm, de acordo com procedimentos de rotina realizados no próprio laboratório.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As citolisinas, incluindo as hemolisinas alfa, beta e delta, são alguns dos fatores relacionados a patogênese das doenças causadas por *S. aureus* e, de acordo com Aarestrup et al. (1999), Dinges et al. (2000) e Burnside et al. (2010), são produzidas pela maioria dos isolados desse patógeno. Os resultados deste trabalho corroboram com as conclusões daqueles investigadores: 100% das amostras de *S. aureus* avaliadas demonstraram atividade hemolítica. Independente da produção isolada ou combinada observou-se que, das 78 amostras avaliadas, 58

produziram a toxina alfa, 73 a toxina delta e 76 a toxina beta, correspondendo a 74,4, 93,6 e 97,4% das amostras, respectivamente. Fazendo-se uma análise da produção combinada das toxinas, em 55 (70,5%) amostras houve co-produção de alfa+beta+delta; em 16 (20,5%) beta+delta; em duas (2,6%) alfa+beta; e em uma (1,3%) alfa+delta. A produção de um único tipo de toxina foi observada em apenas quatro amostras, sendo três (3,8%) produtoras de beta e uma (1,3%) amostra da toxina delta (Tabela 1).

Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo têm sido relatados por outros investigadores: Ebrahimi & Akhavan (2009) observaram que 100% dos isolados de *S. aureus* avaliados apresentaram atividade hemolítica, com 62,5% co-produzindo as toxinas alfa+beta+delta e 37,5% alfa+beta. Frequências de 90 e 68% foram encontradas por Han & Park (2000) e Nagase et al. (2002), nessa ordem, sendo as toxinas alfa e beta produzidas isoladamente ou em combinação. No Brasil, frequências de 43 e 86,6% de amostras com atividade hemolítica para os três tipos de toxinas foram observadas por Coelho et al. (2009) e Silva & Cardoso (2000), respectivamente.

Tabela 1: Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina subclínica

Hemolisina	n	%
alfa+beta+delta	55	70,5
beta+delta	16	20,5
beta	3	3,8
alfa+beta	2	2,6
delta	1	1,3
alfa +delta	1	1,3
alfa	0	0
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>100</b>

Neste estudo, a hemolisina beta foi observada em 97,4% dos isolados, sendo a toxina mais frequentemente produzida. Uma alta frequência desta toxina também é relatada em diversos trabalhos (Silva & Cardoso, 2000; Nagase et al., 2002; Coelho et al., 2009). De acordo com Aarestrup et al. (1999) a toxina beta é uma característica de isolados da glândula mamária bovina e a sua alta expressão poderá estar relacionada a presença de

fatores reguladores, tanto no leite quanto no sangue bovino.

A produção de delta toxina por 93,6% das amostras de *S. aureus* sugere que essa toxina desempenha um papel na patogênese da mastite crônica por aquele agente, facilitando a permanência da bactéria no tecido mamário. Essa toxina causa efeitos citotóxicos em diversos tipos celulares, porém o seu papel na patogênese das doenças estafilocócicas

ainda não foi estabelecido. Matsunaga et al. (1993) observaram que isolados de mastite aguda e crônica, mas não de mastite hiperaguda, produziram toxina delta. Para esses autores tal resultado sugere um papel dessa hemolisina na patogênese daquelas formas da doença.

Não foi observada a produção isolada da toxina alfa em nenhuma das amostras estudadas. Além disso, 25,6% das amostras de *S. aureus* não demonstraram atividade hemolítica compatível com essa toxina. De acordo com Aarestrup et al. (1999) a produção dessa citolisina por isolados bovino é extremamente variável, seja pela não expressão do gene que a codifica (gene *hla*), seja pela baixa produção, dificultando a sua detecção.

Embora vários trabalhos demonstrem um claro papel da toxina alfa, a ação combinada de vários fatores de virulência parece ser a causa das lesões patológicas que acompanham as mastites estafilocócicas. Os resultados deste estudo indicam que uma ação sinérgica entre as hemolisinas poderá ocorrer *in vivo*, uma vez que a quase totalidade das amostras de *S. aureus* produziu atividade hemolítica para, no mínimo, duas toxinas simultaneamente. Efeito sinérgico entre as toxinas alfa e beta é reconhecido como determinante da severidade de doenças por *S. aureus* e, em particular, das mastites. De acordo com as observações de Kenny et al. (1992), *S. aureus* co-produzindo essas toxinas causa mastite clínica com quadro sintomático mais severo, além de ter maior habilidade de persistir na glândula mamária. As observações de Cifrian et al. (1996) os levaram a concluir que, nas células epiteliais da glândula mamária bovina, tanto a toxina alfa quanto a beta exercem atividade citotóxica, sendo o efeito potencializado na presença das duas toxinas. Além disso, observaram que a taxa de aderência e proliferação às células epiteliais foi maior em *S. aureus* co-produzindo alfa e beta do que em cepa produzindo essas hemolisinas isoladamente. Para esses autores, o mecanismo de ação da toxina beta facilita a adesão de *S. aureus* à superfície das células do hospedeiro uma vez que, ao destruir a esfingomielina, ocorre aumento da permeabilidade da membrana plasmática com perda progressiva da carga elétrica negativa da superfície celular, permitindo facilmente a aderência da célula bacteriana.

Além do efeito sinérgico entre as hemolisinas de *S. aureus*, outros micro-organismos, tais como espécies da microbiota endógena, podem potencializar a atividade daquelas toxinas. Chih-Wei et al. (2011) relataram um aumento da atividade da hemolisina beta, bem como aumento da atividade citolítica e

severidade de lesões, quando *S. aureus*, produzindo essa hemolisina, cresceu juntamente com a espécie *Propionibacterium acnes*. Interação semelhante poderá acontecer entre *S. aureus* e outras espécies bacterianas que compõem a microbiota interna e externa da glândula mamária, aumentando a virulência daquele agente e facilitando a sua persistência.

Nos últimos anos, diversos trabalhos tem enfatizado a necessidade do desenvolvimento de estratégias de prevenção da mastite estafilocócica baseada em imunoterápicos que teriam por alvo fatores de virulência secretados, particularmente a toxina alfa. Wardenburg & Schneewind (2008), demonstraram que a imunização de ratos com cepa de *S. aureus* produtora de hemolisina alfa induziu a uma resposta imunológica específica suficiente para reduzir a gravidade das lesões pulmonares associadas à pneumonia estafilocócica experimentalmente induzida naquele modelo experimental. Além disso, esses autores também demonstraram redução das lesões em células epiteliais de pulmão humano, quando na presença de anticorpos anti-toxina alfa. Na glândula mamária de bovinos imunizados com a toxina alfa, Riollot et al. (2000) observaram aumento de células somáticas, mudanças na população de neutrófilos e transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$ / $\alpha$ , sugerindo um papel imunomodulador daquela toxina e o seu uso potencial em esquemas imunoterápicos.

Neste estudo, a mensuração do diâmetro dos halos hemolíticos indicou produção de uma grande quantidade de toxina. Para as toxinas alfa e delta, a intensidade dos halos variou de 3 a 4, com o menor diâmetro medindo 8mm e o maior 31 e 23mm, respectivamente. A toxina beta produziu os maiores halos cuja intensidade foi 4 em todas as amostras, com o menor medindo 14 e o maior 40mm. Do total de amostras avaliadas, 55 (70,5%) mostraram hemólise detectável às 24 horas de incubação, enquanto 23 (29,5%) às 48 horas. Embora na maioria das amostras de *S. aureus* atividade hemolítica para os três tipos de toxinas tenha sido detectada às 24 horas de incubação, a toxina delta apresentou o maior percentual de amostras cuja hemólise foi observada apenas às 48 horas (Figura 1). Silva & Cardoso (2000) também observaram que a maioria dos isolados produziu atividade hemolítica detectável às 24 horas de incubação. Entretanto, no trabalho daqueles autores a toxina delta foi detectada exclusivamente às 48 horas de incubação.

A produção dos diferentes tipos de toxinas não foi quantificada neste trabalho, no entanto, o tamanho

dos halos sugere uma alta produção nas condições avaliadas. Além disso, a presença de halo hemolítico nas primeiras 24 horas de incubação também sugere uma alta produção uma vez que, de acordo com Silva & Cardoso (2000), halos detectáveis apenas após as primeiras 24 horas de incubação seriam sugestivos de baixa produção da toxina. Um fator

que pode ter favorecido a alta produção das toxinas em nosso trabalho, foi a incubação prévia das amostras no meio enriquecedor BHI visto que, segundo Dinges et al. (2000), tal meio favorece a produção de hemolisinas, particularmente da beta.

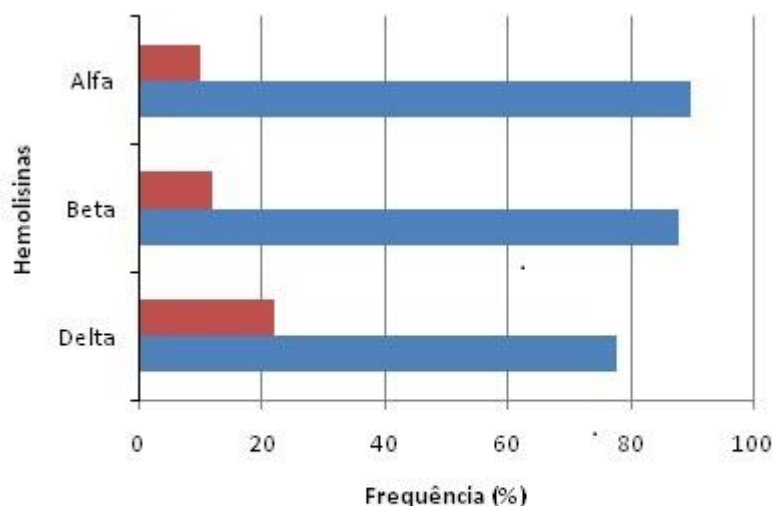


Figura 1. Frequência de amostras positivas para as toxinas alfa, beta e delta, de acordo com o período de incubação

## CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que vacas com mastite subclínica são um importante reservatório de *S. aureus* com potencial de produzir diferentes toxinas citolíticas. Os resultados também apontam para a necessidade de se investigar o efeito sinérgico destas citolisinas na glândula mamária, em particular da toxina delta.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, pelo suporte financeiro (Processo n° 505912/2008-2), a UFRPE-UAG e Clínica de Bovinos de Garanhuns.

## REFERÊNCIAS

Aarestrup F.M., Larsen H.D. & Eriksen N.H.R. et al. 1999. Frequency of  $\alpha$ - and  $\beta$ -haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 107: 425-430.

Brito J.R.F. & Brito M.A.V.P. 1998. Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente. EMBRAPA-CNPGL, Juiz de Fora. 25p.

Burnside K., Lmebo A. & Reyes M. et al. 2010. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *Public Library of Science*, 5:1-16.

Chih-Wei L., Yiu-Kay L. & Yu-Tsueng L. et al. 2011. *Staphylococcus aureus* Hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting  $\beta$ -hemolysin and camp factor. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131:401-409.

Cifrian E., Guidry A.J. & Bramley A.J. et al. 1996. Effect of staphylococcal  $\beta$  toxin on the cytotoxicity proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 48:98-187.

Coelho S.M.O., Reinoso E. & Pereira I.A. et al. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29:369-374.

Dinges M.M., Orwin P.M. & Schlievert P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Review*, 13:16-34.

Ebrahimi A. & Akhavan T.M. 2009. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10:273-277.

Han H-R. & Park H-M. 2000. Effects of adjuvants on the immune response of *staphylococcal* alpha toxin and capsular

- polysaccharide (CPS) in Rabbit. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62:237-241.
- Kloos W.E. 1990. Systematics and the natural history of *Staphylococci*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 19:25-37.
- Lahouassa H., Moussay E. & Rainard P. 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, 38:12-21.
- Matsunaga T., Kamata S. & Kakiichi N. 1993. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 55:297-300.
- Menestrina G., Serra M.D. & Prévost G. 2001. Mode of action of  $\beta$ -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin family. *Toxicon*, 39:1661-1672.
- Nagase N., Shimizu A. & Kawano J. 2002. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64:1169-1172.
- National Mastitis Council. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. National Mastitis Council, Arlington. 46p.
- Pang Y.Y., Schwartz J. & Thoendel M. et al. 2010. agr-dependent interactions of *Staphylococcus aureus* USA300 with human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Innate Immunity*, 2:546-559.
- Quinn P.J., Carter M.E. & Markey B. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, London. 648p.
- Riollet C., Rainard P. & Poutrel B. 2000. Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin. *Inflammation Research*, 49:486-496.
- Sabini L., Torres C. & Demo M. et al. 2001. Effect of *Staphylococcus* toxins isolated from dairy cow milk on vero cell monolayers. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 43:13-18.
- Silva N. & Cardoso H.F.T. 2000. Produção de toxinas hemolíticas por amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Veterinária Notícias*, 6:63-67.
- Suriyaphol G., Sarikaputi M. & Suriyaphol P. 2009. Differential responses of cells from human skin keratinocyte and bovine mammary epithelium to attack by pore-forming *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32:491-502.
- Wardenburg J. B. & Schneewind O. 2008. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *The Journal of Experimental Medicine*, 205:287-294.