

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ENVOLVIDAS EM CASOS DE MASTITE BOVINA

Viviane de Souza¹; Luciano Menezes Ferreira²; Luiz Francisco Zafalon³; Poliana de Castro Melo¹; Suzy Sviech¹; Maria Izabel Merino de Medeiros¹; Antonio Nader Filho⁴

¹Pós-graduanda em Medicina Veterinária Preventiva, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP; ²Consultor Técnico do Instituto Aequitas, Araraquara – SP; ³Pesquisador EMBRAPA–Pecuária Sudeste, São Carlos-SP; ⁴Prof. do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, FCAV/Unesp, Jaboticabal–SP. e-mail: vivianesouzavet@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A mastite é uma enfermidade muito dinâmica, a qual afeta não somente a saúde do animal, mas também a economia do produtor rural e até mesmo do país. Adicionalmente, o movimento de animais no rebanho, com a entrada e a saída indiscriminadas, pode favorecer a introdução de novos patógenos na propriedade. Com isso, deve-se tomar cuidado principalmente com a reposição dos animais, devido ao risco de se inserir um animal doente na linha de ordenha, introduzindo, assim, um novo patógeno causador de mastite no rebanho (OSTERAS, 2006).

Estima-se que no rebanho brasileiro ocorra a prevalência de 20 a 38% de mastite, o que representaria perdas da produção entre 12 a 15%. Sendo assim, considerada a causa de perda econômica mais significativa na indústria leiteira. Devem ser, também, computados gastos com medicamentos, serviços veterinários, leite descartado, descarte prematuro dos animais e, até mesmo, a diminuição do valor comercial dos animais (FONSECA & SANTOS, 2000; REIS et al., 2005).

Para se conhecer a complexidade etiológica das mastites causadas por *S. aureus*, faz-se necessária a caracterização fenotípica e genotípica das estirpes envolvidas nos casos desta enfermidade, assim como do equipamento de ordenha. O conhecimento do perfil molecular dos clones de *S. aureus* possibilita estudos epidemiológicos de dispersão deste patógeno em propriedades rurais. Com isso, estratégias e protocolos de profilaxia e controle da mastite podem ser melhor elaborados (SANTOS et al., 2003).

Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de identificar e confirmar genotipicamente as estirpes de *S. aureus* envolvidas nos casos de mastite, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir da amplificação de fragmento de DNA cromossomal específico do *S. aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de agosto de 2005 a dezembro de 2006 todas as vacas lactantes, aparentemente saudáveis, de uma propriedade rural produtora de leite tipo B pertencente ao Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, Estado de São Paulo, foram mensalmente submetidas à prova do *California Mastitis Test* (CMT). Foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990), em tubos de ensaio esterilizados, amostras de leite dos quartos reagentes ao CMT e, também, daqueles que apresentaram mastite clínica. Paralelamente, foram colhidas amostras dos óstios papilares (INGAWA et al., 1992) e dos insufladores da ordenhadeira mecânica (McDONALD et al., 1993).

Para a identificação bioquímica as colônias que revelassem a presença de cocos G⁺ em esfregaços corados pelo método de Gram foram submetidas às provas de

catalase e coagulase lenta com plasma de coelho (HOLMBERG, 1973). Em seguida, as estirpes foram, então, submetidas à prova para verificação da produção de acetoina e utilização ou não da maltose e da trealose. As amostras que se mostravam positivas a estas provas foram classificadas como sendo de *S. aureus* (HOLT et al., 1994).

Em seguida, a extração do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos de Origem Animal e Água, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP. Foi utilizado o Kit GFX Genomic Blood®, que contém o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram positivas. Posteriormente, a confirmação molecular dos isolados de *S. aureus*, para a identificação da espécie, foi feita a partir da amplificação de fragmentos de DNA cromossômico específico do *S. aureus* de acordo com o protocolo descrito por MARTINEAU et al. (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 420 estirpes caracterizadas bioquimicamente como pertencentes à espécie *S. aureus*, segundo observado na Tabela 1. No entanto, a amplificação de fragmento de DNA cromossômico específico da espécie *S. aureus* não foi obtida em 175 (41,7%) amostras.

Tabela 1 – Distribuição das 420 estirpes de *S. aureus* caracterizadas bioquimicamente e confirmadas genotipicamente pela amplificação de fragmento de DNA cromossômico de acordo com sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Origem	Identificação de <i>S. aureus</i>		%*
	Bioquímica Nº	Genotípica Nº	
Leite	176	150	85,2
Óstio	150	65	43,3
Insufladores	94	30	31,9
Total	420	245*	58,3**

* Em relação ao estudo individual, de acordo com a origem, das estirpes analisadas.

** Em relação ao número total de estirpes caracterizadas genotipicamente.

Segundo VANDENESCH et al. (1994), duas subespécies de *Staphylococcus schleiferi* (*schleiferi* e *coagulans*) têm a capacidade de produzir um fator de afinidade pelo fibrinogênio e, conseqüentemente, coagular o plasma de coelho. Com isso, resultados falso-positivos do teste de coagulase em tubos podem ser um dos fatores que tenham influenciado na classificação bioquímica das estirpes estudadas como pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus*.

Para MARTINEAU et al. (1998), a identificação molecular do fragmento de DNA cromossomal, com 108bp, é altamente específica para *S. aureus* e que, em relação às amplificações, o número de ciclos não interferem quando respeitam o limite de 30 a 40 ciclos. Durante estudo realizado por esses pesquisadores, estafilococos coagulase negativa não apresentaram amplificação nesse intervalo de ciclos.

A primeira estirpe catalase-negativa de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (*MRSA*) descrita na literatura, segundo CARVALHO et al. (2003), foi isolada, no Brasil, de sangue e de cateter venoso coletado de um homem HIV-positivo com pneumonia e septicemia depois de dez dias hospitalizado. Com isso, ressalta-se mais uma importância de se utilizar métodos genotípicos para a identificação de *S. aureus*, o que evita a subjetividade e, também, a dificuldade de interpretação de alguns

testes bioquímicos, assim como o tempo despendido até se caracterizar estirpes de *S. aureus* bioquimicamente.

CONCLUSÃO

Assim sendo, depreende-se que os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram a importância da identificação molecular de estirpes de *S. aureus* envolvidas em casos de mastite bovina para o início precoce da antibioticoterapia. E, ainda, no auxílio a estudos epidemiológicos das doenças veiculadas pelo leite, principalmente no que se refere ao risco à Saúde Pública devido à produção de enterotoxinas.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, et al. Catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of septicemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39(1):45-48, jan.-mar., 2003.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- HARMON, R. J. et al. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. National Mastitis Council, Arlington. 34p., 1990.
- HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 45, p.1-144, 1973 (Supplement).
- HOLT, J. G. et al. Gram-positive cocci. In: BERBEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 544-551, 1994.
- INGAWA, K.; ADKINSON, R.; GOUGH, R. Evaluation of gel teat cleaning and sanitizing compound status of the goat udder. *Journal Dairy Research*, Cambridge, v. 59, p. 21-28, 1992.
- MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 36, p. 618-623, 1998.
- McDONALD, J. et al. Studying the effects of backflushing milking units. *Veterinary Medicine*, p. 382-386, 1993.
- OSTERAS, O. Mastitis epidemiology practical approaches and applications. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24, 2006, Nice. Proceedings. Nice, France: 2006.
- REIS, G. L. et al. Efeito do tipo de ordenha sobre a saúde do úbere e a qualidade do leite. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*. Editora FEP MVZ, v. 48, p. 6-13, setembro, 2005.
- SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Revista Napgama*, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.
- VANDENESCH, F. et al. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* Subspecies from Human Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 388-392, 1994.