

T686.089 69

S 5869

2004



Elizabete Rodrigues da Silva

**GENOTIPAGEM E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO
DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE CAPRINA
E BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Nivaldo da Silva

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG
2004**

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

18/02/05

518305-87

363502

S586g Silva, Elizabete Rodrigues da, 1968-

Genotipagem e avaliação do potencial enterotoxigênico de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite caprina e bovina / Elizabete Rodrigues da Silva. – 2004.

57 p. : il.

Orientador: Nivaldo da Silva

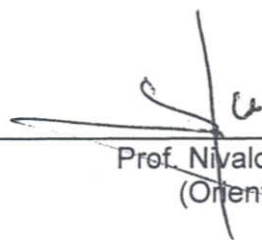
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Caprino – Doenças – Teses. 2. Bovino – Doenças – Teses. 3. Mastite – Teses. 4. Estafilococos áureos – Teses. 5. Enterotoxinas – Teses. I. Nivaldo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.390 89

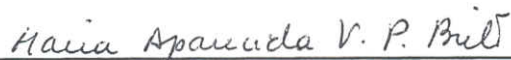
Tese defendida e aprovada em 15 de dezembro de 2004 pela Comissão Examinadora constituída por:



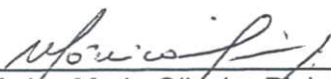
Prof. Nivaldo da Silva
(Orientador)



Dr. Luiz Simeão do Carmo



Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito



Profa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira



Profa. Zélia Inês Portela Lobato

**Á Deus, por não permitir que eu desista dos meus sonhos;
Aos meus pais, pela minha existência;
Aos meus avós, pelos constantes incentivos.**

“Para que o mal triunfe é necessário, apenas, que os homens bons não façam nada.”

Edmund Buke

AGRADECIMENTOS



À Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida;

À Embrapa *Caprinos*, pela oportunidade de realizar este curso;

Ao Professor Nivaldo da Silva, pela orientação, respeito e confiança no meu trabalho;

À Profª Maria Auxiliadora, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas desta Universidade, pelas primeiras boas impressões do caloroso povo mineiro;

Ao Dr. Luiz Simeão do Carmo, do Laboratório de Enterotoxinas estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias, pela amizade, dedicação e paciência demonstradas ao me iniciar no imenso universo do conhecimento bacteriológico;

À Deise Maria Aparecida e Jamaira Ferreira Veras, pesquisadoras da FUNED, pelo companheirismo, amizade, paciência, ajuda e ensinamentos durante todo o experimento;

À Amanda Pimenta Siqueira, Juliana Cristina e Wender Paulo Barbosa, pela ajuda em muitas das fases do meu experimento, ensinamentos e momentos de alegria;

Ao colega Jorge Ubirajara Dias Boechat pelos momentos agradáveis e por ter-me concedido as amostras bacterianas isoladas de caprinos dos rebanhos Fluminenses, sem as quais não seria possível a realização de parte deste trabalho;

Aos professores e colegas do Instituto de Ciências Biológicas, pela ajuda durante a execução deste trabalho;

Aos muitos amigos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível;

Aos funcionários desta casa, amigos queridos e sem os quais tudo teria sido bem mais difícil: Nelson Elder Martins, Doracy de Fátima Reis, Eduardo Nunes Nogueira, João Nepumuceno de Oliveira (Sr. Joãozinho), Sônia Rita do Nascimento, Creusa Atanásio C. Vicente, Nádia Maria da Silva, Júnia Pacheco Teixeira, Jorge Carlos Fernandes, Mirli Monteiro e Renata Martins Pelli;

Às queridas amigas Maria Luiza Bazzo e Maria do Rosário Conceição M. Nunes pelos conselhos e apoio durante todo o período que estive nesta cidade. Embora tão distantes geograficamente, sempre estiveram tão próximas;

À irmã muita querida, Adriana Ferreira Cruz, pela amizade e apoio em todos os momentos da minha vida;

À Eliane Harumi Yorinori, pela amizade sincera e ensinamentos de vida, responsáveis por mudanças tão agradáveis no meu caráter;

À Simone Magella, amiga querida e jamais esquecida, pelos muitos momentos de colo, alegria e companheirismo;

Ao amigo, irmão e colega de trabalho, Antônio César Rocha Cavalcanti, pela paciência e palavras de conforto nos muitos momentos difíceis desta fase da minha vida;

À irmã e amiga Dora Ferreira Cruz, pela presença e carinho que fez o meu último ano em Belo Horizonte o mais feliz;

Às amigas Patrícia Guimarães Pimentel e Janaína J. da Silva, pelos momentos de descontração e felicidade;

À Alcina Vieira de Carvalho, por ter entrado em minha vida no momento em que eu mais precisava;

Ao amigo Jonathan Morales Reyes, alguém que Deus enviou de tão longe para me ensinar a amar almas independente de sua origem, raça e credo;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação da Escola de Veterinária, nas pessoas das funcionárias Nilda Lucas Laurindo, Luciene Sudário Santos e Eliana Silva, presentes de Deus para todos os alunos da pós-graduação;

Finalmente, um agradecimento especial a todas as pessoas que tive o prazer de conhecer e conviver fora do ambiente escolar. Com estas pessoas aprendi lições valiosas; não lições acadêmicas, mas lições de vida as quais, para mim, são as mais importantes. Volto para casa diferente; não devido à titulação, mas sim por ter aprendido que o mais importante nesta vida é a amizade e o respeito pelo próximo. Fazer amigos verdadeiros é a única conquista que realmente importa.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	11
	LISTA DE FIGURAS.....	11
	RESUMO.....	12
	ABSTRACT.....	12
1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> : taxonomia, características morfológicas e principais fatores de virulência.....	13
2.1.1	Coagulase.....	14
2.1.2	Enterotoxinas estafilocócicas (SEs).....	15
2.2	Mastite x <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.3	Epidemiologia molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
	EXPERIMENTO I. Estudo do polimorfismo do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados do leite de cabras com mastite.....	19
	Resumo.....	19
1	Introdução.....	19
2	Material e Métodos.....	20
2.1	Amostras bacterianas.....	20
2.2	Coleta das amostras de leite.....	21
2.3	Exame bacteriológico.....	21
2.4	Identificação dos estafilococos coagulase positivos.....	21
2.5	Polimorfismo da extremidade 3' do gene <i>coa</i>	21
2.5.1	Extração e purificação do DNA bacteriano.....	21
2.5.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
2.5.3	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição baseado em PCR (PCR-RFLP).....	22
2.5.4	Separação e visualização dos produtos amplificados e de restrição enzimática.....	22
2.6	Teste de especificidade.....	23
2.7	Teste de reprodutibilidade.....	23
2.8	Análise dos dados.....	23
3	Resultados.....	24
3.1	Erro padrão da corrida de eletroforese.....	24
3.2	Amplificação do gene <i>coa</i>	24
3.3	Padrões RFLPs.....	25
3.4	Relação filogenética.....	29
4	Discussão.....	29
5	Conclusões.....	31
	EXPERIMENTO II. Tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite bovina através do polimorfismo do gene da coagulase.....	32
	Resumo.....	32
1	Introdução.....	32
2	Material e Métodos.....	33
2.1	Amostras bacterianas.....	33
2.2	Polimorfismo da extremidade 3' do gene <i>coa</i>	33
2.2.1	Extração e purificação do DNA bacteriano.....	33
2.2.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
2.2.3	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição baseado em PCR (PCR-RFLP).....	34
2.2.4	Separação e visualização dos produtos amplificados e de restrição enzimática.....	34
2.3	Teste de especificidade.....	34
2.4	Teste de reprodutibilidade.....	35

2.5	Análise dos dados.....	35
3	Resultados	35
3.1	Erro padrão da corrida de eletroforese.....	35
3.2	Amplificação da extremidade 3' do gene <i>coa</i>	35
3.3	Padrões RFLPs.....	36
4	Discussão	40
5	Conclusões	41
	EXPERIMENTO III. Detecção por PCR Multiplex dos genes das enterotoxinas A, B e C em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite caprina e bovina	42
	Resumo	42
1	Introdução	42
2	Material e Métodos	43
2.1	Amostras bacterianas.....	43
2.2	Indução e detecção da produção das enterotoxinas A, B e C.....	43
2.3	Detecção dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> e <i>sec</i>	44
2.3.1	Extração e purificação do DNA bacteriano.....	44
2.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR Multiplex).....	44
2.3.3	Separação e visualização dos produtos amplificados.....	46
2.4	Teste de especificidade.....	46
2.5	Teste de reprodutibilidade.....	46
3	Resultados	46
3.1	Especificidade.....	46
3.2	Reprodutibilidade.....	47
3.3	Distribuição dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> e <i>sec</i>	47
3.4	Produção <i>in vitro</i> da SEA, SEB e SEC.....	48
4	Discussão	48
5	Conclusões	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTO I

Tabela 1	Procedência das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite caprina.....	20
Tabela 2	Genótipos da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite caprina em rebanhos das regiões Norte do Ceará e Serrana do Rio de Janeiro.....	25
Tabela 3	Distribuição dos tipos do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes rebanhos das regiões Norte do Ceará e Serrana do Rio de Janeiro.....	27

EXPERIMENTO II

Tabela 1	Número de padrões RFLPs de acordo com o tamanho do produto de PCR do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados do leite de vacas com mastite.....	37
Tabela 2	Frequência dos tipos do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados do leite de vacas com mastite.	38

EXPERIMENTO III

Tabela 1	Seqüência de nucleotídeos, localização gênica e tamanho esperado do produto amplificado, utilizando iniciadores específicos para os genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> e <i>FemA</i>	45
Tabela 2	Distribuição dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> e <i>sec</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> de acordo com a origem da amostra.	48
Tabela 3	Deteção das enterotoxinas A, B e C em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite caprina e bovina.	48

LISTA DE FIGURAS

EXPERIMENTO I

Figura 1	Produtos de PCR do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite caprina.	24
Figura 2	Frequência dos tipos do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite caprina em rebanhos das regiões Norte do Ceará e Serrana do Rio de Janeiro.	26
Figura 3	Número de fragmentos gerados com <i>AluI</i> em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite caprina.	26
Figura 4	Frequência dos tipos do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de cabras com mastite em rebanhos do Estado do Ceará (A) e do Estado do Rio de Janeiro (B).	28
Figura 5	Relação filogenética entre 36 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> baseada em 11 diferentes genótipos.....	29

EXPERIMENTO II

Figura 1	Produtos amplificados por PCR do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina.	36
Figura 2	Número de fragmentos gerados pelos produtos de PCR do gene da coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina, utilizando <i>AluI</i>	39

EXPERIMENTO III

Figura 1	Modelo segundo Food Research Institute usado para perfuração dos orifícios em agar Noble, medidos em mm.....	44
Figura 2	PCR Multiplex para a deteção dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> e <i>sec</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite caprina e bovina.....	47

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de identificar subtipos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina e bovina, por meio da análise do polimorfismo do gene da proteína coagulase. Adicionalmente, pesquisou-se a presença de genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A, B e C. Utilizaram-se 36 amostras de *S. aureus* isoladas do leite de cabras pertencentes a rebanhos localizados nas regiões Norte do Ceará e Serrana do Rio de Janeiro e 64 amostras isoladas do leite de vacas pertencentes a rebanhos localizados em municípios de Minas Gerais. Dentre os isolados de origem caprina identificaram-se 11 diferentes genótipos, sendo que nos rebanhos da região Norte do Ceará o tipo predominante foi encontrado em 60% das amostras, enquanto, nos rebanhos da região Serrana, os dois tipos mais freqüentes foram encontrados em 62,5% das amostras. A análise filogenética dos tipos indicou uma relação entre os mesmos. Dentre as amostras de origem bovina foram identificados 49 genótipos com os 10 mais freqüentes agrupando 39% das amostras. A presença de algum dos genes que codificam para as enterotoxinas pesquisadas foi detectada em 37% das amostras. Dos isolados de origem bovina, 6,3% co-amplificaram os genes *sea* e *seb*, e 3,1% foram positivas para o gene *sec*. Das amostras de origem caprina, 86% foram positivas para a presença do gene *sec*. A produção *in vitro* da enterotoxina foi detectada em todas as amostras nas quais o gene correspondente estava presente.

Palavras-chave: Mastite caprina; mastite bovina; *Staphylococcus aureus*; genotipagem; enterotoxinas estafilocócicas.

ABSTRACT

A typing procedure based on coagulase gene polymorphism was used for discriminated *Staphylococcus aureus* isolated from goat and bovine mastitis. Additionally, the distribution of genes that encode enterotoxins A, B, and C was investigated. Thirty-six strains collected from goats belonging to herds from Northern Ceara state and Serrana region of Rio de Janeiro State, and 64 strains from bovine belonging to herds from Minas Gerais state were analyzed. Based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) of 3' end coagulase gene, the goat strains were grouped into 11 types. In Northern Ceara herds, the predominant type was found in 60% of the strains, while in the Serrana region herds the two most common accounting for 62.5% of the strains. The phylogenetic analysis demonstrated that the types are related. The bovine strains were grouping into 49 types with the 10 most common accounting for 39% of the isolates. The Multiplex PCR analysis showed that 37 (37%) of the strains studied harbored some of the SEs genes that were investigated. From the bovine mastitis strains, 4 (6.3%) co-amplified the *sea* and *seb* genes, and 2 (3.1%) were positive for the *sec* gene. Among the strains from goat mastitis, 31 (86%) tested positive to the Multiplex, and the *sec* gene was detected in all strains. The production of SE was detected in all strains harboring the corresponding gene.

Keywords: Goat mastitis; bovine mastitis; *Staphylococcus aureus*; genotyping; staphylococcal enterotoxins.

1. INTRODUÇÃO

A mastite é a doença endêmica de maior prevalência em rebanhos leiteiros e considerada a mais importante causa de perdas econômicas, tanto para o produtor, quanto para a indústria leiteira. A prevalência desta enfermidade é variável, dependendo do tipo de exploração e práticas de manejo adotadas, além de fatores predisponentes tais como traumas à glândula mamária, tipo de ordenha e produção leiteira (Blowey e Edmondson, 2000).

As perdas econômicas causadas pelas diversas formas de mastite são resultantes do descarte do leite, custos com drogas e serviços veterinários, aumento da mão-de-obra e descarte precoce de animais (DeGraves e Feltrow, 1993; Philpot, 2002). Além disso, deve-se destacar a importância da doença para a saúde pública, desde que o leite e derivados provenientes de animais com mastite poderão veicular bactérias altamente patogênicas e resíduos de antibióticos (Corrales et al., 1995; Cardoso et al., 2000).

Em caprinos e bovinos, *Staphylococcus aureus* é considerado o agente etiológico mais importante da mastite. Esta espécie bacteriana causa, predominantemente, infecções subclínicas de longa duração e lesões à glândula mamária maiores do que qualquer outro agente contagioso. A habilidade de invadir e de se estabelecer profundamente nos tecidos da glândula mamária, torna a mastite por este agente um desafio aos programas de controle e prevenção desta patologia (Brito e Brito, 1998; Contreras et al., 2000).

Semelhante ao que ocorre com outras espécies bacterianas, *S. aureus* apresenta diversos subtipos, os quais diferem quanto à presença e expressão de genes relacionados à virulência. Esta

variabilidade, leva ao surgimento de padrões epidemiológicos distintos que dependem dos subtipos prevalentes em cada rebanho, sugerindo a necessidade de sua identificação antes de aplicar medidas específicas de controle (Zecconi e Piccinini, 1999). Estudos epidemiológicos, utilizando técnicas baseadas em DNA, sugerem que poucos subtipos de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de mastite e que os mesmos têm uma ampla distribuição geográfica (Su et al., 1999).

Deste modo, este trabalho teve como objetivos:

- 1) Identificar, por meio do polimorfismo do gene que codifica para a proteína coagulase, tipos de *S. aureus* isolados de casos de mastite caprina nas regiões Norte do Estado do Ceará e Serrana do Estado do Rio de Janeiro;
- 2) Identificar, por meio do polimorfismo do gene que codifica para a proteína coagulase, tipos de *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina no Estado de Minas Gerais e
- 3) Identificar a presença de genes que codificam para potenciais fatores de virulência relacionados com a patogênese da mastite.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*: taxonomia, características morfológicas e principais fatores de virulência

Staphylococcus aureus pertence ao gênero *Staphylococcus* e é bactéria Gram positiva, anaeróbia facultativa e cresce por respiração aeróbia ou por fermentação com produção de ácido láctico; demonstra reação positiva para a presença da enzima catalase, crescendo a temperaturas que variam de 15 a 45°C e em concentrações de

NaCl tão altas quanto 20%. À microscopia, apresenta-se sob a forma de cocos cujo diâmetro varia de 0,8 a 1,0 μm , e arranjos semelhantes a cachos de uva, embora, as células possam estar isoladas. Em meio sólido, as colônias são circular-convexas e apresentam coloração que varia do branco ao alaranjado. Esta bactéria, que compõe a microbiota indígena da pele e mucosas de humanos e animais, taxonomicamente pertence à família *Staphylococcaceae* e filogeneticamente está próxima dos membros do gênero *Bacillus* (MacFaddin, 2000; Carmo, 2001; Todar, 2005).

Staphylococcus aureus expressa uma grande variedade de produtos, os quais contribuem com a colonização, invasão e persistência deste patógeno no hospedeiro. A maioria das amostras deste microrganismo produz exotoxinas, incluindo hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), enterotoxinas (SEs), toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e toxinas esfoliativas. Sintetizam, também, proteínas associadas à superfície celular, nucleases, proteases, lipases, coagulases, hialuronidase e collagenase (Dinges et al., 2000; Todar, 2005). A expressão destes produtos está relacionada à virulência daquele agente e a síntese combinada dos mesmos resulta em efeitos deletérios às células do hospedeiro, determinando o aparecimento de uma variedade de infecções em humanos e animais, bem como síndromes tóxicas no hospedeiro humano (Dinges et al., 2000).

2.1.1. Coagulase

A coagulase é uma proteína extracelular produzida pela maioria das cepas de *S. aureus* e utilizada como marcador fenotípico para diferenciar esta espécie de outras do gênero *Staphylococcus* (Kloos e Bannernam, 1995). Esta proteína, liga-se especificamente à protrombina, formando

um complexo chamado estafilotrombina o qual, por sua vez, estimula a reação de coagulação plasmática, por converter o fibrinogênio a fibrina (Kawabata et al., 1986).

A estrutura primária da molécula da coagulase foi demonstrada por Kawabata et al. (1986). De acordo com estes investigadores, a coagulase é constituída por três fragmentos principais de 43, 30 e 20-kDa, com o fragmento de 43-kDa localizado na porção N-terminal da molécula da proteína e os fragmentos de 30 e 20-kDa localizados internamente e na porção C-terminal, respectivamente. Kawabata et al. (1986) também observaram que a região biologicamente ativa da coagulase, ou seja, os sítios de ligação e ativação da protrombina, está localizada na porção N-terminal. Por meio da análise da seqüência de aminoácidos, Kaida et al. (1987) confirmaram os achados de Kawabata e colaboradores. Assim, atualmente, sabe-se que a proteína coagulase é composta por três regiões distintas: uma região N-terminal, compreendendo 150 a 270 resíduos de aminoácidos; uma região central, conservada e uma região C-terminal, com unidades repetidas de 27 resíduos de aminoácidos.

O papel da coagulase na patogênese de infecções por *S. aureus* não está completamente entendido. Especula-se, que esta proteína seria importante para a invasão deste microrganismo, desde que o mesmo poderia escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro ao causar coagulação localizada (Todar, 2005). Anderson et al. (1982) observaram mudanças patológicas ao inocularem a proteína purificada na glândula mamária de ratos, indicando que a coagulase é ativa *in vivo*. Haroldsson e Jonsson (1984) utilizando amostras mutantes, deficientes de coagulase, demonstraram que tais amostras foram menos virulentas em infecções

experimentais de ratos, sugerindo um papel daquela proteína na patogênese de infecções por *S. aureus*. No entanto, Phonimdaeng et al. (1990), utilizando amostras que sofreram uma mutação específica no gene que codifica para a coagulase, a qual aboliu a habilidade das amostras de coagular o plasma, não observaram diferenças entre infecções cutânea e intramamária de ratos, causadas por estas e outras amostras não alteradas. Para estes autores a importância da coagulase como fator de virulência permanece não esclarecida.

2.1.2. Enterotoxinas estafilocócicas (SEs)

As SEs são proteínas de cadeia simples, com quantidade relativamente grande de lisina, ácidos glutâmico e aspártico. Apresentam peso molecular entre 26 a 29.000 Daltons, e ponto isoelétrico de 7,0 a 8,6, sendo resistentes à ação de enzimas proteolíticas. Diferentes SEs têm sido descritas nas últimas décadas, incluindo os tipos clássicos - SEA, SEB, SEC, SED e SEE (Jones e Khan, 1986; Bohach e Schlievert, 1987; Betley e Mekalanos, 1988; Couch et al., 1988; Bayles e Iandolo, 1989) e os novos tipos descritos mais recentemente - SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO e SEU (Betley et al., 1992; Ren et al., 1994; Su e Wong, 1995; Munson et al., 1998; Zhang et al., 1998; Jarraud et al., 2001; Orwin et al., 2001; Letertre et al., 2003). Com base em diferenças antigênicas e diferentes pontos isoelétricos, a SEC é subdividida em três classes: SEC1, SEC2 e SEC3. Variantes moleculares para esta toxina também foram descritas, estando associadas à cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos - SEC-bovino e ovinos - SEC-ovino (Marr et al., 1993) e cães - SEC-canino (Schlievert et al., 2000).

Os genes que codificam para as SEs são carregados por plasmídeos - *sed* e *sej*,

bacteriófagos - *sea* e *see* ou estão localizados no cromossomo bacteriano - *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo* e *seu* (Letertre et al., 2003).

As SEs são agrupadas por apresentarem características biológicas em comum. Este grupo de exotoxinas é denominado de toxinas pirogênicas superantigênicas (PTSAGs) ou simplesmente superantígenos (SAGs), sendo que cada uma das toxinas apresenta, pelo menos, três características biológicas: pirogenicidade, antigenicidade e a capacidade de aumentar a sensibilidade celular à endotoxinas (Dinges et al., 2000; Fueyo et al., 2001; Llewelyn e Cohen, 2002).

A característica de superantigenicidade refere-se à habilidade dos SAGs em estimular a proliferação simultânea de diversas subpopulações de linfócitos T sem permitir, porém, a especificidade antigênica destas células (Dinges et al., 2000). A ativação das células T resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como recrutamento de células B e de mais células T para o local da infecção e co-ativação das células apresentadoras de antígenos, as quais respondem com a liberação de mais mediadores inflamatórios (Llewelyn e Cohen, 2002). A liberação excessiva e desordenada de citocinas inflamatórias, provavelmente, é responsável por vários dos sintomas observados nas síndromes tóxicas causadas pelos SAGs (Schlievert et al., 2000; Stuyt et al., 2001; Todar, 2005).

Os SAGs apresentam outras características não relacionadas à superantigenicidade que contribuem para a potencial patogenicidade destas toxinas. Dentre as características conhecidas, cita-se o sinergismo com endotoxinas, potencial efeito emético e a habilidade de estimular a migração de neutrófilos para o local da infecção. Os SAGs, ainda, se ligam às células endoteliais, causando aumento da capilaridade, morte e

formação de fendas (Dinges et al., 2000; Llewelyn e Cohen, 2002).

2.2 Mastite x *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o agente etiológico mais freqüente da mastite contagiosa em todos os rebanhos leiteiros, sendo praticamente impossível a sua erradicação. A glândula mamária infectada por este agente é a principal fonte de infecção para o rebanho, com as mãos do ordenhador, o equipamento de ordenha e toalhas/esponja utilizadas para a secagem dos tetos, representando as principais vias de transmissão. Esta bactéria, também coloniza lesões da pele e canal dos tetos podendo invadir e colonizar a glândula mamária (Brito e Brito, 1998; Fonseca e Santos, 2000).

A mastite por *S. aureus* está associada com alta contagem de células somáticas, redução significativa da produção de leite e reduzidas taxas de cura microbiológica (Nickerson, 1993). Em bovinos, estima-se que a produção de leite esteja reduzida em até 45% por quarto infectado e em até 15% por vaca infectada (Brito e Brito, 1998). Segundo Nickerson (1993), 19 a 40,7% das vacas em um rebanho poderão estar infectadas por este microrganismo. Em caprinos, as taxas de infecção por *S. aureus* podem alcançar 37% (Silva et al., 2004).

Uma vez no interior da glândula mamária, *S. aureus* fixa-se às células epiteliais e estabelece infecção por diversos mecanismos patogênicos. Inicialmente, causa destruição dos tecidos próximos às cisternas. Em seguida, alcança o sistema de dutos e se estabelece profundamente nos alvéolos podendo, este processo, ser seguido pela formação de abscesso e tecido cicatricial, o qual limita a célula bacteriana. As células alveolares e dutos podem, ainda, se degenerar e descamar, ocluindo,

juntamente com as células somáticas, o sistema de dutos, levando à involução dos alvéolos funcionais remanescentes e formação de mais tecido cicatricial. Ainda, os dutos ocluídos poderão reabrir, liberando células bacterianas para outras áreas da glândula mamária. Este processo é, então, repetido continuamente em diversas áreas do úbere. Durante os estágios iniciais da infecção, a destruição tecidual é mínima e reversível. No entanto, se o microrganismo permanece dentro das áreas ocluídas, os abscessos tornar-se-ão grandes o suficiente para serem percebidos à palpação (Nickerson, 1993).

A patogênese da mastite por *S. aureus* é complexa e, provavelmente, envolve a síntese de diversos produtos simultaneamente. A característica infecção persistente causada por este agente pode estar associada a danos causados ao sistema imunológico do hospedeiro. Embora, nenhum fator de virulência em particular tenha sido claramente implicado, existe a possibilidade de que as SEs e outros SAGs modulem a resposta imune e contribuam para a patogenicidade e persistência de *S. aureus* na glândula mamária. O aumento da atividade das citocinas, como provocado pelos SAGs, poderá resultar em supressão da resposta imunológica, facilitando a persistência desta bactéria nos sítios de infecção. Além disto, os SAGs podem afetar a patogênese da mastite pela habilidade em interferir com a atividade bactericida dos neutrófilos (Ferens et al., 1998; Fitzgerald et al., 2001; Mullarky et al., 2001; Takeuchi et al., 2001).

2.3 Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus*

Semelhante ao que ocorre com outras espécies bacterianas, *S. aureus* apresenta suficiente heterogeneidade genética ao nível de espécie que permite que amostras

deste agente, isoladas de diferentes fontes, em momentos e áreas geográficas diferentes, possam ser diferenciadas ou classificadas em subtipos ou cepas (Olive e Bean, 1999).

Características fenotípicas e genotípicas têm sido empregadas para discriminar amostras de *S. aureus*. As análises fenotípicas dependem da expressão de fatores biológicos da célula tais como, a produção de enzimas, utilização de nutrientes, produtos finais do metabolismo e susceptibilidade a agentes químicos. Destas abordagens fisiológicas, poucas são úteis para a caracterização de amostras bacterianas, desde que as mesmas dependem da expressão de genes regulados de acordo com as condições do meio ambiente, o que torna o uso destas técnicas limitado (Tenover et al., 1994; Hookey et al., 1998; Ortega, 2001).

As análises genotípicas, por outro lado, detectam variações nas seqüências de DNA que tendem a ser bastante estáveis por longos períodos e menos afetadas por condições ambientais. Estas metodologias, permitem a identificação acurada de subtipos bacterianos, fontes de infecção e transmissão, bem como o reconhecimento de tipos virulentos e monitoramento de programas de vacinação (Olive e Bean, 1999; Ortega, 2001). Dentre as técnicas moleculares mais empregadas, cita-se o polimorfismo do comprimento de fragmentos gerados por endonucleases de restrição (RFLP) e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Estas técnicas destacam-se pela rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados e podem ser utilizadas para fundamentar e complementar informações geradas em estudos epidemiológicos (Ortega, 2001).

A análise dos padrões RFLPs permite demonstrar a homogeneidade ou heterogeneidade entre diferentes amostras. A presença ou ausência de seqüências

específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes amostras, gerando polimorfismo. Diferenças na seqüência de DNA podem, também, ser o resultado de inserções, deleções ou outros rearranjos genéticos que alteram a distância entre pares de sítios de restrição. Ao ser submetido à clivagem com uma endonuclease, o DNA de amostras geneticamente diferentes é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Esta técnica pode detectar polimorfismo no DNA total ou em seqüências específicas, previamente amplificadas pela PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Na última década, a técnica PCR-RFLP vem sendo amplamente utilizada para discriminar isolados de *S. aureus*. Dentre as suas vantagens destacam-se a facilidade de execução e interpretação dos resultados, bem como os altos percentuais de tipabilidade e reprodutibilidade (Tenover et al., 1994). Entre os diversos genes cujos polimorfismos são utilizados para diferenciar este agente, destacam-se o gene que codifica para a proteína A, os genes ribossomais e o gene que codifica para a proteína coagulase (Tenover et al., 1994; Olive e Bean, 1999).

Desde a sua introdução por Goh et al. (1992) a tipagem através da análise do gene da coagulase tem sido uma importante ferramenta em estudos epidemiológicos. O método é baseado na variação de seqüência da extremidade 3' observada neste gene. Esta região compreende pequenas unidades repetidas de 81 pb cujo número e sítios de restrição para a enzima *AluI* varia entre diferentes isolados. Com esta técnica, diversos investigadores têm identificado subtipos de *S. aureus* isolados de mastite bovina. Aarestrup et al. (1995) identificaram 15 diferentes subtipos em isolados da Dinamarca, enquanto, Su et al. (1999) analisando amostras de *S. aureus*

isoladas em diferentes países, identificaram a presença de 40 subtipos, com alguns destes amplamente distribuídos. Na região Sul do Brasil, Lange et al. (1999) detectaram 14 subtipos de *S. aureus* isolados de mastite bovina. Para estes autores, a tipagem baseada em PCR, como a análise do gene da coagulase, pode ser utilizada em laboratórios de países em

desenvolvimento, uma vez que apresenta baixo custo e facilidades de execução e interpretação. De acordo com Aarestrup et al. (1995), a facilidade de analisar o polimorfismo do gene da coagulase em um grande número de amostras e o múltiplo padrão polimórfico gerado, torna esta técnica útil para ser utilizada em investigações epidemiológicas de mastite por *S. aureus*.

EXPERIMENTO I

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFR

Estudo do polimorfismo do gene da coagulase em *Staphylococcus aureus* isolados do leite de cabras com mastite.

Resumo

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar o polimorfismo do gene da coagulase em *S. aureus* isolados de cabras com mastite clínica e subclínica. Trinta e seis amostras foram isoladas do leite de cabras em duas diferentes regiões: Norte do Estado do Ceará e Serrana do Estado do Rio de Janeiro. Com base no polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) da extremidade 3' do gene da coagulase, foram identificados 11 tipos, com os três mais comuns agrupando 72% das amostras. Nos rebanhos da região Norte do Ceará, o tipo predominante foi encontrado em 60% das amostras, enquanto, nos rebanhos da região Serrana, os dois tipos mais frequentes foram encontrados em 62,5% das amostras. A análise filogenética agrupou os tipos RFLPs em três diferentes ramos e em dois diferentes grupos, com o Grupo 1 alocando 82% dos tipos (9/11) e 92% dos isolados. Os resultados mostraram que as cabras das regiões estudadas foram infectadas por *S. aureus* apresentando vários tipos do gene da coagulase e que tais tipos são geneticamente relacionados.

Palavras-chave: Mastite caprina; *Staphylococcus aureus*; polimorfismo do gene da coagulase.

1. Introdução

Staphylococcus aureus é o agente etiológico mais importante da mastite

caprina. A prevalência de infecções intramamária por esta espécie bacteriana varia de 5,6% a 17% (Lerondelle e Poutrel, 1984; Kalogridou-Vassiliadou, 1991; Deinhofer e Pernthaner, 1995; White e Hinckley, 1999), com investigadores relatando a identificação deste patógeno em até 37% dos isolados de mastite subclínica (Silva et al., 2004).

Semelhante ao que ocorre com outras espécies bacterianas, *S. aureus* apresenta diversos subtipos, os quais diferem quanto à presença e expressão de genes relacionados à virulência (Fitzgerald et al., 2000; Takeuchi et al., 2001; Vasudevan et al., 2003). Esta variabilidade leva ao surgimento de padrões epidemiológicos distintos que dependem dos tipos prevalentes em cada rebanho, sugerindo a necessidade de identificar os mesmos antes de aplicar medidas específicas de controle (Zecconi e Piccinini, 1999).

A amplificação do gene que codifica para a proteína coagulase (gene *coa*) tem sido relatada por diversos investigadores como um método simples e acurado para identificar e discriminar amostras de *S. aureus* (Goh et al., 1992; Schwarzkopf e Karch, 1994; Aarestrup et al., 1995; Hookey et al., 1998; Chiou et al., 2000; Schlegelová et al., 2003). Embora, o papel desta proteína como fator de virulência não seja completamente esclarecido, o gene que a codifica apresenta em sua extremidade 3' uma região polimórfica constituída por unidades repetidas de 81 pb, as quais diferem entre os isolados em número e localização de sítios para a enzima *AluI*, sendo esta característica utilizada para tipagem de *S. aureus* isolados de diversas

fontes (Kaida et al., 1987; Phonimdaeng et al., 1990).

Nos últimos anos, a análise do gene *coa* tem sido amplamente utilizada para discriminar e comparar *S. aureus* isolados de mastite bovina (Aarestrup et al., 1995; Lange et al., 1999; Raimundo et al., 1999; Su et al., 1999; Schlegelová et al., 2003). No entanto, são escassas as informações sobre a utilização desta técnica para analisar amostras de *S. aureus* isoladas de mastite caprina. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar, por meio do polimorfismo do gene que codifica para a coagulase, subtipos de *S. aureus* isolados de cabras com mastite em rebanhos das regiões Norte do Estado do Ceará e Serrana do Estado do Rio de Janeiro.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 36 amostras de *S. aureus* isoladas do leite de cabras com mastite clínica e subclínica, sendo 16 amostras provenientes de animais pertencentes a rebanhos leiteiros localizados na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro e 20 amostras de animais pertencentes a rebanhos localizados na região Norte do Estado do Ceará (Tabela 1).

Tabela 1. Procedência das amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite caprina.

Região	Município	Código do rebanho	Número de amostras
Norte Cearense	Sobral	A	11
	Sobral	C	8
	Massapé	D	1
Serrana Fluminense	Teresópolis	B	3
	Stª Mª Madalena	F	3
	Stª Mª Madalena	H	1
	Stª Mª Madalena	I	1
	Banquete-N. Friburgo	K	1
	Amparo-N. Friburgo	L	2
	Teresópolis	O	1
	Nova Friburgo	P	1
	Andradas-Teresópolis	R	1
	Nova Friburgo	S	2
Total			36

2.2 Coleta das amostras de leite

As amostras compostas de leite foram coletadas de acordo com as recomendações do National Mastitis Council (1990). Assim, antes da coleta, foi realizada a antisepsia dos tetos utilizando-se álcool a 70%, dando especial atenção à extremidade. Em seguida, e após desprezar os primeiros jatos de leite, foram coletados aproximadamente 10 mL de leite em tubos estéreis, os quais foram devidamente identificados, acondicionados em caixas de isopor com gelo e transportados para o Laboratório de doenças bacterianas da Embrapa Caprinos (amostras da região Norte do Ceará) e Laboratório de controle de mastite do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (amostras da região Serrana).

2.3. Exame bacteriológico

O cultivo bacteriológico das amostras de leite foi realizado de acordo com o método recomendado pelo National Mastitis Council (1990). Assim, 10 µL de leite foram transferidos para placas de ágar sangue desfibrinado de ovino a 5%. As placas foram incubadas a 37°C, fazendo-se leituras com 24 e 48 horas. A identificação dos gêneros bacterianos foi feita a partir da observação das características morfotintórias e produção da enzima catalase. As colônias identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram submetidas ao teste da coagulase em tubo, utilizando plasma de coelho (Quinn et al., 1994). As amostras coagulase positiva foram submetidas a provas bioquímicas para a identificação da espécie bacteriana.

2.4 Identificação dos estafilococos coagulase positivos

Para a identificação das amostras positivas ao teste da coagulase, utilizou-se a chave proposta por Kloos (1990), sendo as provas bioquímicas realizadas de acordo com as recomendações de Quinn et al. (1994) e MacFaddin (2000). Assim, os isolados foram submetidos aos testes da termonuclease, produção de acetoína, fermentação aeróbica da sacarose, D-manose, D-manitol, D-celobiose, D-xilose, D-trealose, maltose, L-arabinose e rafinose. Os isolados identificados como *Staphylococcus aureus* foram mantidos congelados a -20°C em leite desnatado, acrescido de 15% de glicerol, até a realização dos testes moleculares.

2.5 Polimorfismo da extremidade 3' do gene *coa*

2.5.1 Extração e purificação do DNA bacteriano

Para a extração e purificação dos ácidos nucléicos utilizou-se, com modificações, a metodologia descrita por Chen et al. (2001) e Rosec e Gigaud (2002). Os isolados bacterianos, bem como amostras das cepas de referência incluídas neste estudo – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus intermedius* 08/96PE-FUNED e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 - foram inoculados em caldo nutritivo (Tryptic Soy Broth, bioBrás-Brasil), sendo incubados overnight a 37°C para a completa saturação do meio. O DNA genômico foi obtido a partir de 0,5 mL do cultivo bacteriano, o qual foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos. O sedimento foi lavado com 500 µL de tampão TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) e recentrifugado por 10 minutos. As células bacterianas foram suspensas novamente com 200 µL de tampão TE pH 7,5 acrescido de lisostafina– 15 U/mL TE (Lysostaphin 2 mg, Sigma) e incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, 15 µL de

proteínase K– 20 mg/mL (Proteínase K 100 mg, Gibco) foram adicionados, reincubando-se as amostras por 1 hora a 56°C. Para inativar a proteínase K, as amostras foram incubadas por mais 15 minutos a 95°C. Após este período, adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio (25:24), centrifugando a 12000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente extraído com igual volume de fenol-clorofórmio, seguido de nova extração com clorofórmio. Após a centrifugação final, o sobrenadante foi misturado com etanol 95% (v/v), 2x o volume, e deixado para precipitação overnight a –20°C. O sedimento foi, então, lavado com 500 µL de etanol gelado a 70% (v/v), seco por inversão do tubo e diluído em 100 µL de tampão TE pH 7,5. O DNA da solução foi quantificado em espectrofotômetro (260 nm) e congelado a –20°C.

2.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação de segmento específico da extremidade 3' do gene *coa* foi realizada com iniciadores (Invitrogen-Brasil) sintetizados a partir da seqüência publicada do gene *coa* de *Staphylococcus aureus* cepa BB (Kaida et al., 1987), sendo os iniciadores Coag2 – 5'-ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G-3' (bases 1432 a 1453) e Coag3 – 5'-TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC-3' (bases 2399 a 2418) descritos por Aarestrup et al. (1995).

As condições para a amplificação foram descritas previamente por Aarestrup et al. (1995). A cada reação adicionou-se 1 a 2 µL do DNA molde (aproximadamente 350 ng/µl), 1 µL de cada iniciador (50 pmol), 0,8 µL do mix dNTPs (200 µM de cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (1 U) e 3 µL de tampão PCR 10x (500 mM KCl; 100

mM Tris-HCl pH 8,4; 1% de Triton X-100; 15 mM MgCl₂). O volume foi ajustado para 40 µL com água ultrapura estéril. Para evitar evaporação dos componentes, foram adicionados 50 µL de óleo mineral estéril sobre o volume de cada reação.

A amplificação foi realizada em termociclador (Mini Cycler™, MJ Research) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguindo-se 30 ciclos (desnaturação a 95°C-30 segundos; pareamento a 55°C-2 minutos; extensão a 72°C-4 minutos) e extensão final a 72°C durante 7 minutos.

2.5.3 Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição baseado em PCR (PCR-RFLP)

Para estudar o perfil polimórfico da extremidade 3' do gene *coa* e caracterizar os padrões RFLPs, os produtos amplificados foram submetidos à restrição enzimática (Aarestrup et al., 1995). Um volume de 10 µL do produto de PCR foi misturado a 10 U da enzima de restrição *AluI*, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen-Brasil) e incubado em termociclador por 1 hora a 37°C.

2.5.4 Separação e visualização dos produtos amplificados e de restrição enzimática

A separação dos produtos amplificados e de restrição foi realizada através de eletroforese em minigel de agarose a 2% e 5%, respectivamente, preparado com tampão Tris-acetato e EDTA (Sambrook e Russel, 2001) e corado com brometo de etídeo (10 mg/mL de solução aquosa, Pharmacia) a 0,5 µg/mL. Para a corrida de eletroforese foram utilizados 10 µL do DNA mais 2 µL de tampão de amostra 6x

(0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 15% de Ficoll 400). O minigel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 volts (aproximadamente 15 v/cm de gel) por 40 e 50 minutos para a separação dos produtos amplificados e de restrição, nesta ordem.

O DNA do bacteriófago ϕ 29 cortado com a enzima *Hind*III, de 19285 pares de base (pb) foi utilizado na concentração de 2,5 μ g/10 μ L como marcador de tamanho molecular (Silva et al., 2000). Este marcador apresenta 14 bandas com os seguintes tamanhos em pb: 4370 – 2899 – 2498 – 2201 – 1933 – 1331 – 1150 – 759 – 611 – 579 – 453 – 262 – 156 – 72.

Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (MacroVue, UV-25 Hoefer) e fotografados em câmera digital (Sony-Digital Mavica).

2.6 Teste de especificidade

Para testar a especificidade dos iniciadores, os DNAs de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus intermedius* 08/96PE-FUNED e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram analisados em cinco reações, realizadas no mesmo dia ou em dias consecutivos.

2.7 Teste de reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos produtos de PCR foi testada através da análise do DNA de cinco amostras selecionadas ao acaso do total das estudadas, mais o DNA de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizado como controle positivo. Foram realizadas reações de amplificação durante cinco dias consecutivos (reprodutibilidade entre testes). A reprodutibilidade do método PCR-RFLP foi testada submetendo, por

duas vezes, quatro diferentes produtos de PCR a *Alu*I.

2.8 Análise dos dados

O tamanho em pares de bases dos produtos amplificados e dos fragmentos de restrição foi estimado utilizando-se o programa LabImage (LabImage, 2003).

O erro padrão, dentro de uma corrida de eletroforese, foi calculado a partir da análise dos tamanhos estimados dos produtos de PCR de duas diferentes amostras submetidas a quatro corridas de eletroforese. A análise dos resultados e o cálculo do desvio médio foram realizados no programa Microsoft Excel2000.

Para verificar a capacidade discriminatória do teste de genotipagem, utilizou-se o método do índice numérico descrito por Hunter e Gaston (1988). Por meio deste índice, foi calculada a probabilidade de amostras de diferentes origens serem consideradas do mesmo tipo. O índice discriminatório foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1), \text{ onde}$$

D= índice discriminatório

s= n° total de tipos diferentes

n_j= n° de isolados representando cada tipo

N= n° de isolados da população teste.

A relação filogenética entre os tipos do gene *coa* foi realizada com base nos resultados obtidos por PCR-RFLP. Os diferentes genótipos foram identificados por algarismos arábicos e os fragmentos de restrição encontrados em cada tipo, transformados em matriz numérica, onde a presença ou ausência de determinado fragmento foi computada como 1 e 0, respectivamente. Para a construção da

árvore filogenética utilizou-se o programa TREECON for Windows (Van de Peer e De Wachter, 1994). A estabilidade dos agrupamentos foi determinada pela análise de "bootstrap".

3. Resultados

3.1 Erro padrão da corrida de eletroforese

O erro padrão dentro do gel foi calculado e um valor de ± 8 pb foi estimado. Assim, para o agrupamento dos tipos PCR e RFLPs, amplicons ou fragmentos de restrição com aquela diferença foram considerados iguais.

3.2 Amplificação do gene *coa*

A amplificação de segmento específico da extremidade 3' do gene da coagulase, utilizando-se o par de iniciadores Coag2 e Coag3, gerou amplicons únicos para cada uma das 36 amostras de *S. aureus* testadas. Pela análise em gel de agarose, distinguiram-se 10 diferentes tamanhos para os produtos amplificados, variando de 484 a 1080 pb. Os produtos de 950, 579 e 1080 pb foram os mais freqüentes, sendo amplificados por 47%, 14% e 11% das amostras, respectivamente.

A especificidade dos iniciadores foi demonstrada pela ausência de amplicons ao utilizar, como molde, os DNAs de *S. intermedius* e *S. epidermidis* (Figura 1). Por outro lado, observou-se a presença de amplicons em todas as 36 amostras de *S. aureus* testadas, sendo o percentual de tipabilidade do método PCR de 100%.

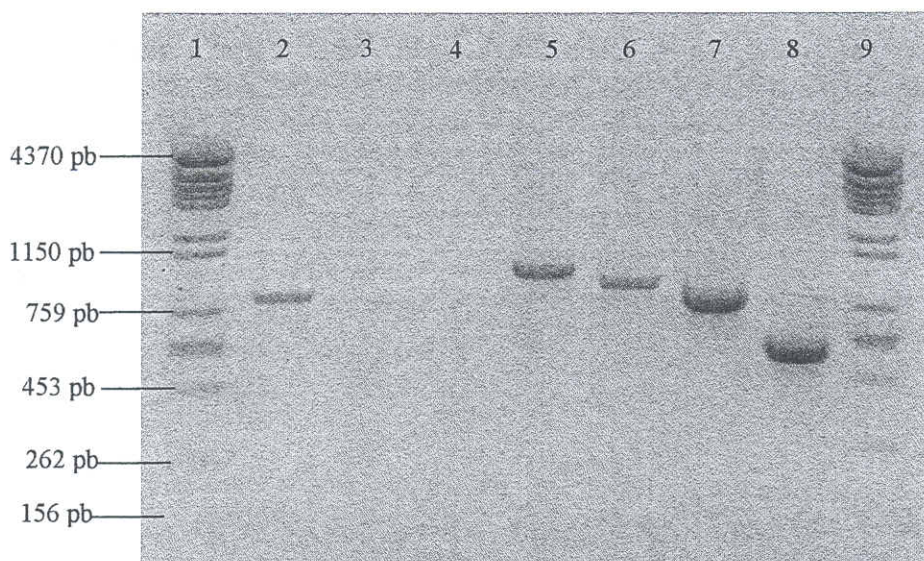


Figura 1. Produtos de PCR do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina – Gel de agarose 2%: canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: controle positivo *S. aureus* ATCC 25923; canaletas 3 e 4: controle negativo *S. epidermidis* e *S. intermedius*; canaletas 5 a 8: amplicons gerados das amostras investigadas; canaleta 9: marcador molecular.

A reprodutibilidade do método foi demonstrada em 100% das amostras testadas, seguidamente. Embora, a intensidade dos amplicons tenha sido variada, sua presença e tamanhos aproximados foram reproduzidos em todas as reações.

O cálculo do índice discriminatório do método de tipagem utilizando-se a PCR gerou um valor de 0,75.

3.3 Padrões RFLPs

O número de padrões RFLPs por produto de PCR e a frequência dos diferentes tipos encontrados, são demonstrados na Tabela 2 e Figura 2. Exceto o produto de 900 pb, amplicons do mesmo tamanho geraram um único padrão RFLP, com três a quatro fragmentos com tamanhos variando de 80 a 377 pb (Figura 3). Os padrões RFLPs gerados foram agrupados em 11 diferentes tipos, sendo os tipos I, III e X os mais frequentes, agrupando 72% das amostras estudadas. A maioria dos tipos compartilhou os fragmentos 301-262-162-80 pb e em todos estava presente o fragmento de aproximadamente 80 pb.

Uma análise da distribuição dos tipos, de acordo com a região e rebanhos amostrados, poderá ser observada na Tabela 3 e Figura 4. Nos rebanhos localizados na região Norte do Ceará, o tipo III foi o mais frequente, sendo encontrado em 60% das amostras desta região. Nos rebanhos da região Serrana Fluminense, os tipos mais frequentes foram o III e X, agrupando 62,5% das amostras. Os tipos I, II e III foram comuns aos rebanhos de ambas as regiões, enquanto, os tipos IV, VI, VIII e IX estavam presentes apenas nos rebanhos cearense e os tipos V, VII, X e XI nos rebanhos do Rio de Janeiro.

A reprodutibilidade do método PCR-RFLP foi demonstrada. Os produtos de PCR submetidos a *AluI*, geraram os mesmos fragmentos nos dois testes realizados. A tipabilidade observada foi de 100%, desde que *AluI* foi hábil em cortar os produtos amplificados de todas as amostras estudadas.

O cálculo do índice discriminatório do método de tipagem utilizando-se a PCR-RFLP gerou um valor de 0,76.

Tabela 2. Genótipos da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina em rebanhos das regiões Norte do Ceará e Serrana do Rio de Janeiro.

Tipo	Genótipo(pb)		Nº de Isolados	Frequência (%)
	PCR	RFLP		
I	1080	301-262-162-80	4	11.0
II	994	301-262-162-80	2	5.6
III	950	301-262-162-80	17	47.0
IV	900	301-262-162-80	1	2.8
V	900	377-215-162-80	1	2.8
VI	880	301-262-162-80	1	2.8
VII	864	301-262-162-80	1	2.8
VIII	800	377-215-162-80	2	5.6
IX	790	301-262-162-80	1	2.8
X	579	301-184-80	5	14.0
XI	484	301-184-80	1	2.8
Total			36	100

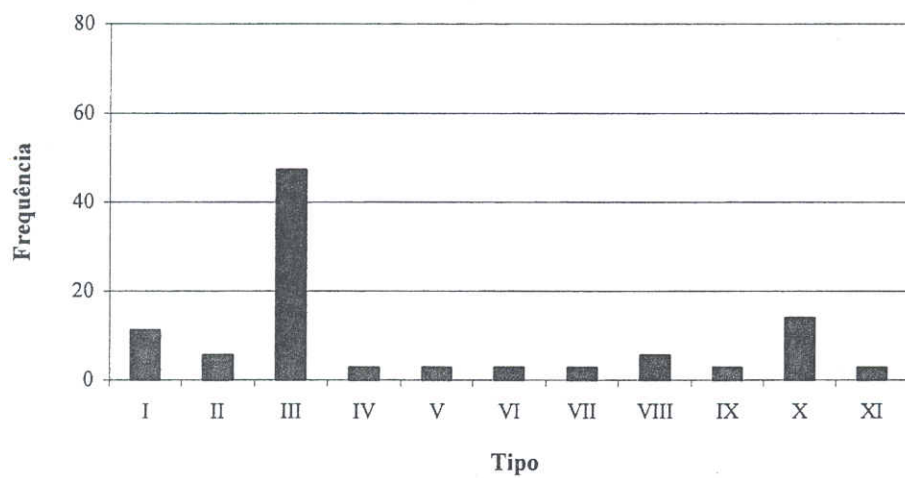


Figura 2. Frequência dos tipos do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina em rebanhos das regiões Norte do Ceará e Serrana do Rio de Janeiro.

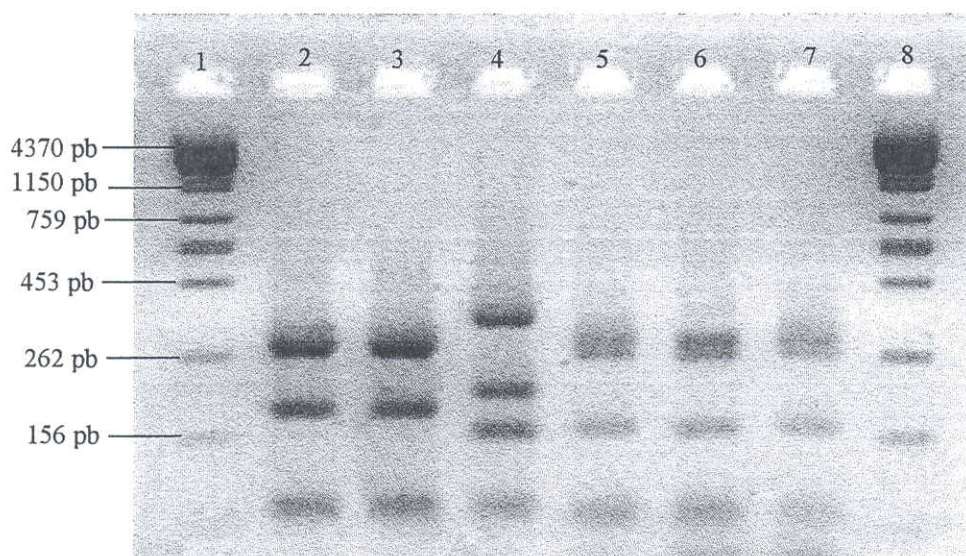


Figura 3. Número de fragmentos gerados com *AluI* em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite caprina. Gel de agarose 5% - canaleta 1: marcador molecular; canaletas 2 a 7: amostras com diferentes fragmentos; canaleta 8: marcador molecular.

Tabela 3. Distribuição dos tipos do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* em diferentes rebanhos das regiões Norte do Ceará e Serrana do Rio de Janeiro.

Região	código do rebanho	número de isolados	Tipo	Frequência (%)
Norte Cearense	A	11	I	5,0
			III	30,0
			VI	5,0
			VIII	10,0
			IX	5,0
	C	8	I	5,0
			II	5,0
			III	25,0
			IV	5,0
	D	1	III	5,0
Total		20		100
Serrana Fluminense	B	3	X	19,0
	F	3	I	12,5
			VII	6,2
	H	1	II	6,2
	I	1	III	6,2
	K	1	III	6,2
	L	2	III	12,5
	O	1	X	6,2
	P	1	III	6,2
	R	1	V	6,2
	S	2	X	6,2
			XI	6,2
Total		16		100



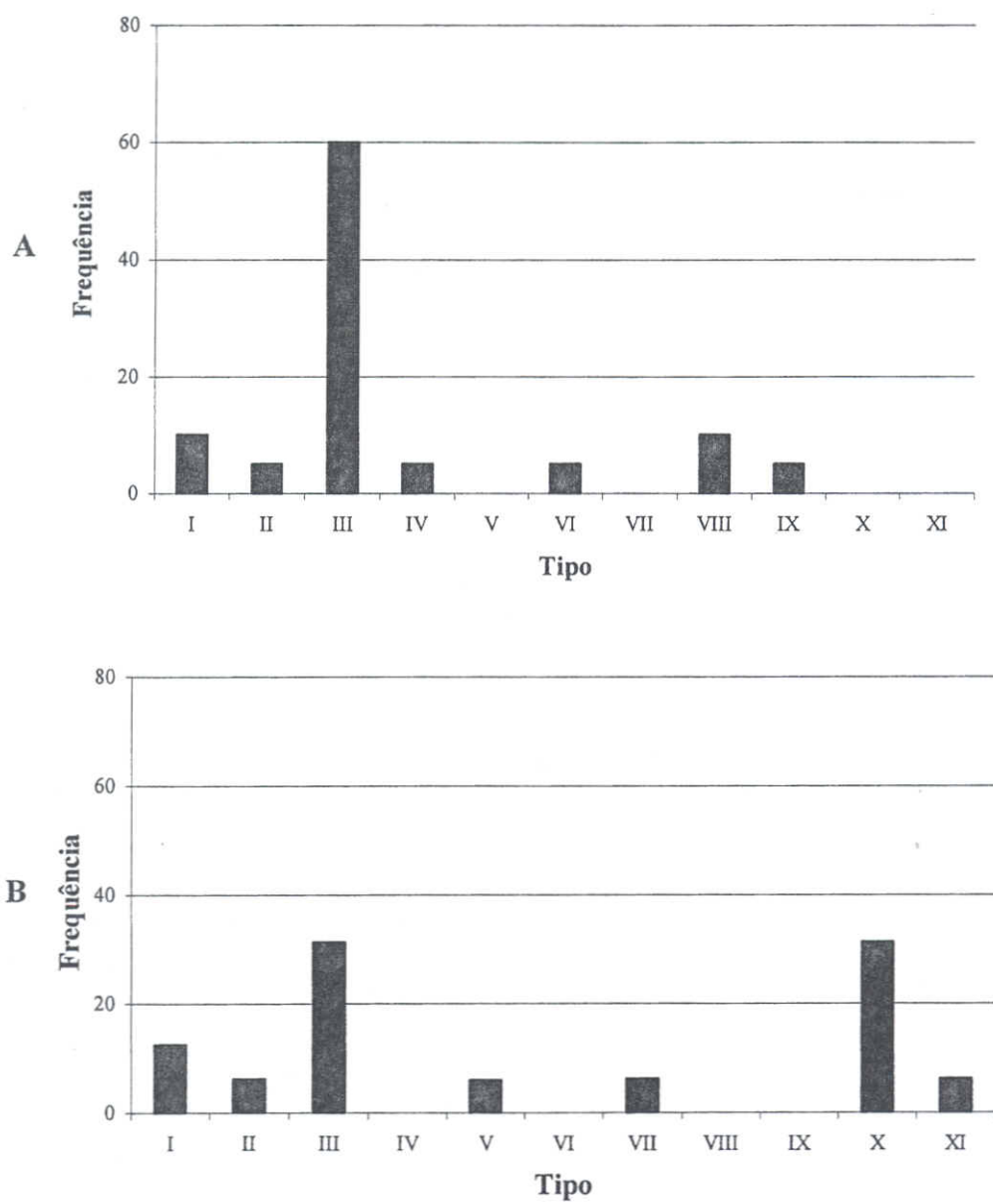


Figura 4. Frequência dos tipos do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras com mastite em rebanhos do Estado do Ceará (A) e do Estado do Rio de Janeiro (B).

3.4 Relação filogenética

A relação filogenética entre os 11 genótipos poderá ser observada na Figura 5. Os diferentes tipos foram agrupados em três distintos ramos. No ramo A, foram alocados os tipos VI, VII, III, IV, IX, I e II;

no ramo B os tipos X e XI e no C os tipos V e VIII. Próximo à distância genética de 0,4, os diferentes tipos foram reagrupados em dois grupos, sendo que o Grupo 1 alocou 82% dos tipos (9/11) e 92% das amostras, enquanto, o Grupo 2, alocou 18% dos tipos (2/11) e apenas 8% das amostras.

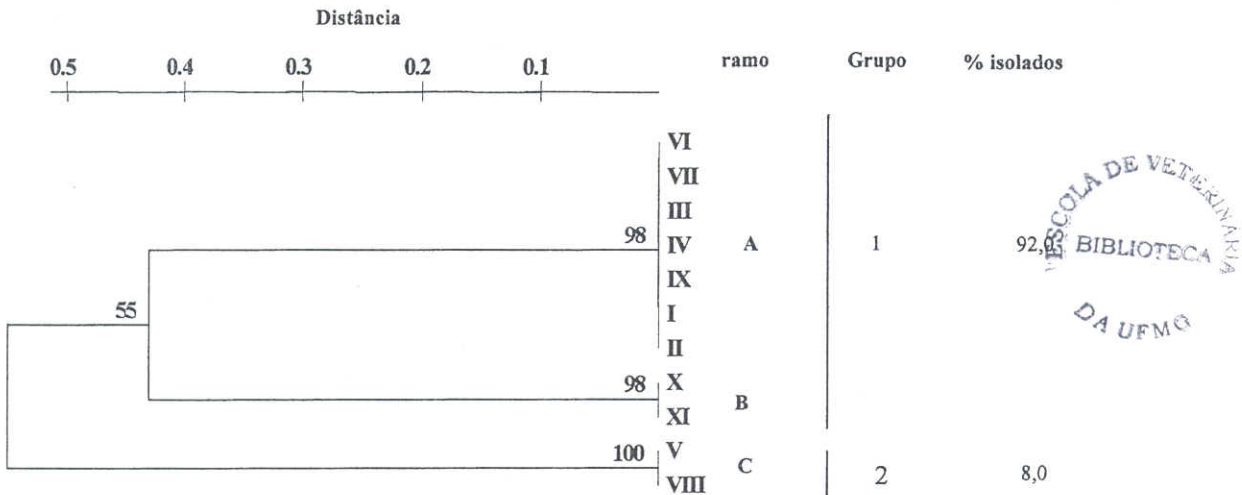


Figura 5. Relação filogenética entre 36 amostras de *Staphylococcus aureus* baseada em 11 diferentes genótipos. Os valores em cada ramo representam reamostragens realizadas por análise de "bootstrap".

4. Discussão

Desde a introdução por Goh et al. (1992), a tipagem de *S. aureus* realizada por meio da análise do gene da proteína coagulase tem sido amplamente utilizada, seja pela identificação de amplicons de diferentes tamanhos (Raimundo et al., 1999), seja pela identificação de padrões RFLPs gerados pela enzima *AluI* (Aarestrup et al., 1995; Lange et al., 1999; Schlegelová et al., 2003). Neste trabalho, a tipagem de *S. aureus* utilizando-se este método, demonstrou ser facilmente executável e interpretada. Os altos percentuais de tipabilidade e reprodutibilidade observados,

tanto para a tipagem baseada nos resultados da PCR, quanto para a baseada nos padrões RFLPs, indicam que o gene da coagulase pode ser utilizado para discriminar amostras de *S. aureus* isoladas de mastite caprina.

Neste estudo, o índice discriminatório gerado foi relativamente baixo ($D= 0,75$ para o método PCR e $D= 0,76$ para o PCR-RFLP). O pequeno número de amostras analisadas, bem como a relação epidemiológica entre as mesmas, provavelmente, contribuiu para este baixo índice, visto que Hunter e Gaston (1988) recomendam que grandes coleções de amostras distintas sejam trabalhadas independente do método de tipagem a ser utilizado.

A maioria dos produtos de PCR apresentou um único padrão RFLP. Este achado sugere que os sítios de reconhecimento para a *AluI* nos isolados estudados são limitados, o que poderá interferir com o poder discriminatório desta enzima. Schwarzkopf e Karch (1994) analisando fragmentos da extremidade 3' do gene *coa*, encontraram alto grau de heterogeneidade entre as seqüências de nucleotídeos de amostras com o mesmo padrão RFLP gerado pela *AluI*. Estes mesmos autores relataram que não foram detectados sítios de restrição para outras enzimas que permitiriam um maior poder discriminatório que a *AluI*. No entanto, os resultados deste estudo sugerem que uma outra enzima deveria ser associada a *AluI*, especialmente ao trabalhar com amostras epidemiologicamente relacionadas.

A partir dos resultados obtidos, foi observado um certo grau de heterogeneidade genética entre os isolados de *S. aureus* de mastite caprina. Os 11 diferentes genótipos detectados indicam que nas regiões estudadas as mastites são causadas por amostras com diferentes variantes do gene *coa*. Os resultados também mostraram que, embora, vários genótipos possam estar presentes em rebanhos individuais, apenas um ou dois predominam. Estes achados, corroboram estudos anteriores com *S. aureus* de mastite bovina (Aarestrup et al., 1995; Su et al., 1999; Schegelová et al., 2003) nos quais os investigadores relatam a presença de poucos tipos predominantes dentro de um rebanho e países. De acordo com Schlegelová et al. (2003), pequeno número de tipos predominando em uma macroregião ou um tipo predominando dentro de um rebanho, provavelmente, está relacionado a uma maior virulência de alguns tipos, determinada por seu maior potencial de transmissão, disseminação e persistência, bem como resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Aarestrup et al. (1994) e Su et al. (1999) observaram que os genótipos da coagulase mais freqüentes apresentaram uma maior resistência à ação dos neutrófilos do que os genótipos raros. Para estes autores, isto é indicativo de que os genótipos mais freqüentes devem ter características únicas que permitam que os mesmos superem os mecanismos de defesa do hospedeiro e estabeleçam infecções intramamária.

Comparando-se os tipos encontrados em cada uma das regiões estudadas observaram-se diferenças entre os mais freqüentes e exclusividade de alguns. Por exemplo, o tipo III foi o predominante na região Norte Cearense, enquanto, na região Serrana, a maioria dos isolados foi agrupada nos tipos III e X, sendo este último exclusivo dos rebanhos desta região. No Norte do Ceará, também foi observada a presença de tipos exclusivos. Segundo Su et al. (1999) estas diferenças podem ser explicadas pela coevolução dos patógenos e seus hospedeiros. A pressão seletiva exercida em ambientes diversos com reservatórios, práticas de manejo e de comercialização, próprias de cada área geográfica, levaria ao surgimento de cepas geneticamente distintas e adaptadas.

A presença do tipo III nos rebanhos de ambas as regiões sugere que este tipo, provavelmente, apresenta características especiais que permitem que o mesmo se mantenha em áreas geográficas tão distantes e diversas. A possibilidade de transmissão deste genótipo entre os rebanhos das duas regiões é quase que inexistente, desde que a distância geográfica que os separa supera os 2000 km. No entanto, dentro de cada região, este tipo poderá ter sido transmitido de um rebanho a outro. Na região Serrana, observa-se um grande fluxo de animais entre as diferentes fazendas, com algumas destas representando importantes pólos de comercialização (Boechat, 2002) e na região Norte do Ceará, os rebanhos C e D

foram constituídos a partir de animais provenientes do rebanho A.

A análise dos tipos presentes nos rebanhos cearense, indica que no rebanho A a maioria dos casos de mastite pode ser causada pelo tipo III. Ressalta-se, que este rebanho é fechado, não havendo introdução de fêmeas de outra região e/ou propriedade, sendo a reposição de matrizes feita com as crias do próprio rebanho. Assim, estes achados corroboram com os relatos de diversos investigadores (Brito e Brito, 1998; Cullor, 1993; Fonseca e Santos, 2000) de que a principal fonte de infecção da mastite por *S. aureus* são as próprias fêmeas infectadas e as principais vias de transmissão, o equipamento de ordenha e mãos do ordenhador. Os resultados também suportam a afirmação de Shopsis et al. (2000), de que o isolamento geográfico poderá contribuir para o aparecimento de populações geneticamente homogêneas, sendo difícil a sua discriminação.

A análise filogenética demonstrou que os diferentes tipos encontrados estão relacionados geneticamente. Os tipos predominantes foram alocados no Grupo 1, sugerindo que os mesmos podem ter uma mesma origem ancestral. A análise do Grupo 2 mostra um arranjo interessante de dois dos tipos exclusivos: o tipo V, exclusivo da região Serrana e o tipo VIII, exclusivo da região Norte do Ceará, foram

agrupados juntos, o que indica que estes tipos podem ter surgido a partir de um mesmo clone ancestral. O agrupamento dos 11 tipos RFLPs em dois grupos principais, corrobora o que foi discutido em parágrafos anteriores, ou seja, que os sítios de restrição para a *AluI* nas amostras estudadas são limitados.

5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- A análise do gene que codifica para a proteína coagulase é útil em identificar diferentes tipos de *Staphylococcus aureus* causando mastite em rebanhos caprinos;
- As glândulas mamárias de cabras nas áreas estudadas foram infectadas por *Staphylococcus aureus* portando mais de um tipo do gene da coagulase;
- Embora, vários tipos de *Staphylococcus aureus* tenham sido identificados, apenas um ou dois predominaram dentro de um rebanho;
- Os tipos encontrados neste estudo estão relacionados geneticamente e, provavelmente, foram originados de dois clones diferentes.



EXPERIMENTO II

Tipagem de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina por meio do polimorfismo do gene da coagulase.

Resumo

O polimorfismo do gene da coagulase foi estudado em 64 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina no Estado de Minas Gerais. A amplificação por PCR produziu 27 amplicons diferentes, sendo que em 60 amostras foi observada a presença de um único amplicon e em quatro, dois amplicons. A análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) identificou 49 tipos diferentes, com os 10 mais freqüentes agrupando 39% das amostras e os demais 39 tipos, 61% das amostras. Os resultados mostraram que na região estudada as mastites são causadas por *S. aureus* apresentando diversas variantes do gene da coagulase.

Palavras-chave: mastite bovina; *Staphylococcus aureus*; polimorfismo do gene da coagulase.

1. Introdução

A mastite continua sendo relatada como a doença endêmica mais importante em rebanhos leiteiros, sendo responsável por prejuízos econômicos, tanto para o produtor quanto para a indústria leiteira (DeGraves e Feltrow, 1993; Philpot, 2002). Embora, uma grande variedade de microrganismos possa causar esta patologia em bovinos, a mastite contagiosa por *Staphylococcus aureus* é considerada a mais freqüente (Brito e Brito, 1998).

Estudos de populações naturais de *S. aureus* têm revelado considerável variação no conteúdo do genoma deste patógeno (Phonimdaeng et al., 1990; Fitzgerald et al., 2003). Segundo Zecconi e Piccinini (1999) esta variação genética determina a existência de padrões epidemiológicos distintos, que dependem das cepas prevalentes em dado rebanho, o que sugere que tais cepas ou subtipos sejam identificados e suas características estudadas, antes de aplicar medidas de controle.

Na última década, diversas técnicas baseadas em DNA têm sido utilizadas para identificar e comparar subtipos de *S. aureus*. A tipagem a partir da amplificação do gene que codifica para a proteína coagulase (gene *coa*) tem sido relatada por diversos investigadores como um método simples e acurado (Goh et al., 1992; Schwarzkopf e Karch, 1994; Aarestrup et al., 1995; Hookey et al., 1998; Chiou et al., 2000; Schlegelová et al., 2003). Estudos epidemiológicos, baseados na análise deste gene, sugerem que poucos subtipos de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de mastite bovina e que os mesmos têm uma ampla distribuição geográfica (Aarestrup et al., 1995; Annemüller et al., 1999; Lange et al., 1999; Raimundo et al., 1999; Su et al., 1999; Schlegelová et al., 2003).

No Brasil, são poucas as informações com relação à diversidade genética de *S. aureus* isolados de mastite bovina. Deste modo, este trabalho teve como objetivo identificar, por meio do polimorfismo do gene que codifica para a proteína coagulase, subtipos

de *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina em rebanhos leiteiros no Estado de Minas Gerais.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 64 amostras de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite clínica e subclínica. Os isolados fazem parte do banco de amostras do Laboratório de controle de mastite da Escola de Veterinária da UFMG, tendo sido coletados, isolados e identificados em estudo anterior (Cardoso, 1999). As amostras de leite foram obtidas de animais pertencentes a rebanhos localizados em 23 municípios do estado de Minas Gerais: Alvinópolis, Bambuí, Belo Horizonte, Bom Despacho, Campos Altos, Codisburgo, Conselheiro Lafaiete, Contagem, Curvelo, Divinópolis, Esmeraldas, Inhaúma, Itabirito, Jordânia, Lagoa Santa, Martinho Campos, Matozinhos, Pará de Minas, Passos, Pedro Leopoldo, Ribeirão das Neves, São José da Varginha e Sete Lagoas. As coletas foram realizadas no período de outubro de 1994 a outubro de 1997, sendo as amostras mantidas congeladas em freezer a -20°C em caldo cérebro-coração, acrescido de 15% de glicerol.

2.2 Polimorfismo da extremidade 3' do gene *coa*

2.2.1 Extração e purificação do DNA bacteriano

Para a extração e purificação dos ácidos nucléicos utilizou-se, com modificações, a metodologia descrita por Chen et al. (2001) e Rosec e Gigaud (2002). Os isolados bacterianos, bem como amostras das cepas

de referência incluídas neste estudo – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus intermedius* 08/96PE-FUNED e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 - foram inoculados em caldo nutritivo (Tryptic Soy Broth, bioBrás-Brasil), sendo incubados overnight a 37°C para a completa saturação do meio. O DNA genômico foi obtido a partir de 0,5 mL do cultivo bacteriano, o qual foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos. O sedimento foi lavado com 500 μL de tampão TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) e recentrifugado por 10 minutos. As células bacterianas foram suspensas novamente com 200 μL de tampão TE pH 7,5 acrescido de lisostafina– 15 U/mL TE (Lysostaphin 2 mg, Sigma) e incubadas por 1 hora a 37°C . Em seguida, 15 μL de proteinase K– 20 mg/mL (Proteinase K 100 mg, Gibco) foram adicionados, reincubando-se as amostras por 1 hora a 56°C . Para inativar a proteinase K, as amostras foram incubadas por mais 15 minutos a 95°C . Após este período, adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio (25:24), centrifugando a 12000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente extraído com igual volume de fenol-clorofórmio, seguido de nova extração com clorofórmio. Após a centrifugação final, o sobrenadante foi misturado com etanol 95% (v/v), 2x o volume, e deixado para precipitação overnight a -20°C . O sedimento foi, então, lavado com 500 μL de etanol gelado a 70% (v/v), seco por inversão do tubo e diluído em 100 μL de tampão TE pH 7,5. O DNA da solução foi quantificado em espectrofotômetro (260 nm) e congelado a -20°C .

2.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação de segmento específico da extremidade 3' do gene *coa* foi realizada com iniciadores (Invitrogen-Brasil) sintetizados a partir da sequência publicada do gene *coa* de *Staphylococcus aureus* cepa BB (Kaida et al., 1987), sendo os iniciadores Coag2 – 5'-ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G-3' (bases 1432 a 1453) e Coag3 – 5'-TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC-3' (bases 2399 a 2418) descritos por Aarestrup et al. (1995).

As condições para a amplificação foram descritas previamente por Aarestrup et al. (1995). A cada reação adicionou-se 1 a 2 µL do DNA molde (aproximadamente 350 ng/µL), 1 µL de cada iniciador (50 pmol), 0,8 µL do mix dNTPs (200 µM de cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (1 U) e 3 µL de tampão PCR 10x (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% de Triton X-100 e 15 mM MgCl₂). O volume foi ajustado para 40 µL com água ultrapura estéril. Para evitar evaporação dos componentes, foram adicionados 50 µL de óleo mineral estéril sobre o volume de cada reação.

A amplificação foi realizada em termociclador (Mini Cycler™, MJ Research) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguindo-se 30 ciclos (desnaturação a 95°C-30 segundos; pareamento a 55°C-2 minutos; extensão a 72°C-4 minutos) e extensão final a 72°C durante 7 minutos.

2.2.3 Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição baseado em PCR (PCR-RFLP)

Para estudar o perfil polimórfico da extremidade 3' do gene *coa* e caracterizar os padrões RFLPs, os produtos amplificados foram submetidos à restrição enzimática (Aarestrup et al., 1995). Um volume de 10 µL do produto de PCR foi

misturado a 10 U da enzima de restrição *AluI*, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen-Brasil) e incubado em termociclador por 1 hora a 37°C.

2.2.4 Separação e visualização dos produtos amplificados e de restrição enzimática

A separação dos produtos amplificados e de restrição foi realizada por eletroforese em minigel de agarose a 2% e 5%, respectivamente, preparado com tampão Tris-acetato e EDTA (Sambrook e Russel, 2001) e corado com brometo de etídeo (10 mg/mL de solução aquosa, Pharmacia) a 0,5 µg/mL. Para a corrida eletrofóretica foram utilizados 10 µL do DNA mais 2 µL de tampão de amostra 6x (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 15% de Ficoll 400). O minigel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 volts (aproximadamente 15 v/cm de gel) por 40 e 50 minutos para a separação dos produtos amplificados e de restrição, nesta ordem.

O DNA do bacteriófago ϕ 29 cortado com a enzima *HindIII*, de 19285 pb, foi utilizado na concentração de 2,5 µg/10µL como marcador de tamanho molecular (Silva et al., 2000). Este marcador apresenta 14 bandas com os seguintes tamanhos em pb: 4370 – 2899 – 2498 – 2201 – 1933 – 1331 – 1150 – 759 – 611 – 579 – 453 – 262 – 156 – 72.

Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (MacroVue, UV-25 Hoefer) e fotografados em câmera digital (Sony-Digital Mavica).

2.3 Teste de especificidade

Para testar a especificidade dos iniciadores, os DNAs de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus intermedius*

08/96PE-FUNED e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram analisados em cinco reações, realizadas no mesmo dia ou em dias consecutivos.

2.4 Teste de reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos produtos de PCR foi testada analisando-se os DNAs de cinco amostras selecionadas ao acaso do total das estudadas, mais o DNA de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizado como controle positivo. Foram realizadas reações de amplificação durante cinco dias consecutivos (reprodutibilidade entre testes). A reprodutibilidade do método PCR-RFLP foi testada submetendo, por duas vezes, quatro diferentes produtos de PCR a *AluI*.

2.5 Análise dos dados

O tamanho em pares de bases dos produtos amplificados e dos fragmentos de restrição foi estimado utilizando-se o programa LabImage (LabImage, 2003).

O erro padrão dentro de uma corrida de eletroforese foi calculado a partir da análise dos tamanhos estimados dos produtos de PCR de duas diferentes amostras submetidas a quatro corridas de eletroforese. A análise dos resultados e o cálculo do desvio médio foram realizados no programa Microsoft Excel2000.

Para verificar o poder discriminatório do teste de genotipagem, utilizou-se o método do índice numérico descrito por Hunter e Gaston (1988). Por meio deste índice, foi calculada a probabilidade de amostras de diferentes origens serem consideradas do mesmo tipo. O índice discriminatório foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1), \text{ onde}$$

D = índice discriminatório

s = n° total de tipos diferentes

n_j = n° de isolados representando cada tipo

N = n° de isolados da população teste

3. Resultados

3.1 Erro padrão da corrida de eletroforese

O erro padrão dentro do gel foi calculado e um valor de ± 8pb foi estimado. Assim, para o agrupamento dos tipos PCR e RFLPs, amplicons e fragmentos de restrição com aquela diferença foram considerados iguais.

3.2 Amplificação da extremidade 3' do gene *coa*

A amplificação de segmento específico da região 3' do gene da coagulase, utilizando-se o par de iniciadores Coag2 e Coag3, gerou 27 amplicons diferentes com tamanhos variando de 579 a 1442 pb. Em 60 amostras, os iniciadores amplificaram produtos únicos e, em quatro amostras, observou-se a presença de dois amplicons de tamanhos 972-579, 972-739 e 950-800 pb (Figura 1). Os produtos de 790, 759, 725 e 579 pb foram os mais frequentes, agrupando 52% dos isolados.

A especificidade dos iniciadores foi demonstrada pela ausência de amplicons ao utilizar, como molde, os DNAs de *S. intermedius* e de *S. epidermidis* (Figura 1). Por outro lado, amplicons foram observados em todas as 64 amostras de *S. aureus* testadas, sendo o percentual de

ESCOLA DE VETERINARIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

tipabilidade do método PCR do gene *coa* de 100%.

A reprodutibilidade do método foi demonstrada em 100% das amostras testadas seguidamente. Embora, a intensidade dos amplicons tenha sido

variada, sua presença e tamanhos foram reproduzidos em todas as reações.

O cálculo do índice discriminatório da tipagem utilizando-se a PCR gerou um valor de 0,92.



Figura 1. Produtos amplificados por PCR do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina – Gel de agarose 2%: canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: controle positivo *S. aureus* ATCC 25923; canaletas 3-4: controle negativo *S. epidermidis* e *S. intermedius*; canaletas 5-6: amostras com um amplicon; canaletas 7-10: amostras com dois amplicons.

3.3 Padrões RFLPs

O número de padrões RFLPs por produto de PCR e a frequência dos diferentes tipos encontrados, são demonstrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. A maioria dos produtos de PCR gerou um único padrão RFLP, enquanto, nove produtos (1006, 950, 880, 838, 790, 759, 725, 602 e 579 pb) geraram dois ou mais padrões. As amostras com um único amplicon geraram dois a

quatro fragmentos de restrição e as com dois amplicons cinco a seis (Figura 2).

Os padrões RFLPs determinados com *AluI* foram agrupados em 49 tipos diferentes, sendo os tipos 9, 13, 23, 27, 28, 29, 31, 33, 42 e 48 os mais frequentes, agrupando 39% do total de isolados estudados. Os demais isolados foram distribuídos entre os 39 tipos restantes, sendo uma amostra por tipo (1,6%/tipo).

A reprodutibilidade do método PCR-RFLP foi demonstrada em todas as repetições realizadas. A tipabilidade foi de 97%, uma vez que os amplicons de duas amostras não geraram fragmentos ao serem submetidos a *AluI*.

O cálculo do índice discriminatório da tipagem utilizando-se o método PCR-RFLP gerou um valor de 0,99.

Tabela 1. Número de padrões RFLPs de acordo com o tamanho do produto de PCR do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite.

Tamanho do produto PCR (pb)	Nº de isolados	Nº de distintos padrões RFLPs em cada grupo
1442	1	1
1262	1	1
1181	1	1
1165	1	1
1129	1	1
1113	1	1
1080	1	1
1042	1	1
1026	2	1
1006	2	2
994	1	1
972-579	2	1
972-739	1	1
950-800	1	1
950	2	2
900	1	1
880	2	2
850	1	1
838	3	2
824	1	1
800	1	1
790	10	4
759	13	11
725	5	4
684	1	1
602	2	2
579	5	2
Total	64	49



Tabela 2. Frequência dos tipos do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite.

Código do tipo	Genótipo(pb)		Frequência (%)
	PCR	RFLP	
1	1442	453-301-162-80	1.6
2	1262	453-301-162	1.6
3	1181	453-301-162-80	1.6
4	1165	453-301-162-80	1.6
5	1129	453-301-162-80	1.6
6	1113	552-229-80	1.6
7	1080	453-301-162-80	1.6
8	1042	453-301-162-80	1.6
9	1026	453-301-162	3.1
10	1006	453-301-162-80	1.6
11	1006	453-301-162	1.6
12	994	453-301-162-80	1.6
13	972-579	453-377-301-215-162-80	3.1
14	972-739	453-301-215-162-80	1.6
15	950-800	453-301-184-162-80	1.6
16	950	453-301-162-80	1.6
17	950	453-229-80	1.6
18	900	453-301-162-80	1.6
19	880	453-301-162-80	1.6
20	880	715-80	1.6
21	850	301-184-162-80	1.6
22	838	667-80	1.6
23	838	602-80	3.1
24	824	552-244	1.6
25	800	301-244-184-80	1.6
26	790	508-229-80	1.6
27	790	715-80	3.1
28	790	636-80	6.3
29	790	602-80	4.7
30	759	301-184-162-80	1.6
31	759	229-184-162-80	3.1
32	759	453-215-80	1.6
33	759	453-229-80	3.1
34	759	453-184-80	1.6
35	759	730-80	1.6

Tabela 2 (cont)

código do tipo	Genótipo(pb)		Frequência (%)
	PCR	RFLP	
36	759	667-80	1.6
37	759	636-100	1.6
38	759	579-229	1.6
39	759	579-100	1.6
40	759	579-80	1.6
41	725	301-244-184-80	1.6
42	725	636-80	3.1
43	725	602-80	1.6
44	725	552-244	1.6
45	684	334-229	1.6
46	602	334-229	1.6
47	602		1.6
48	579	334-229	6.3
49	579		1.6
Total			100

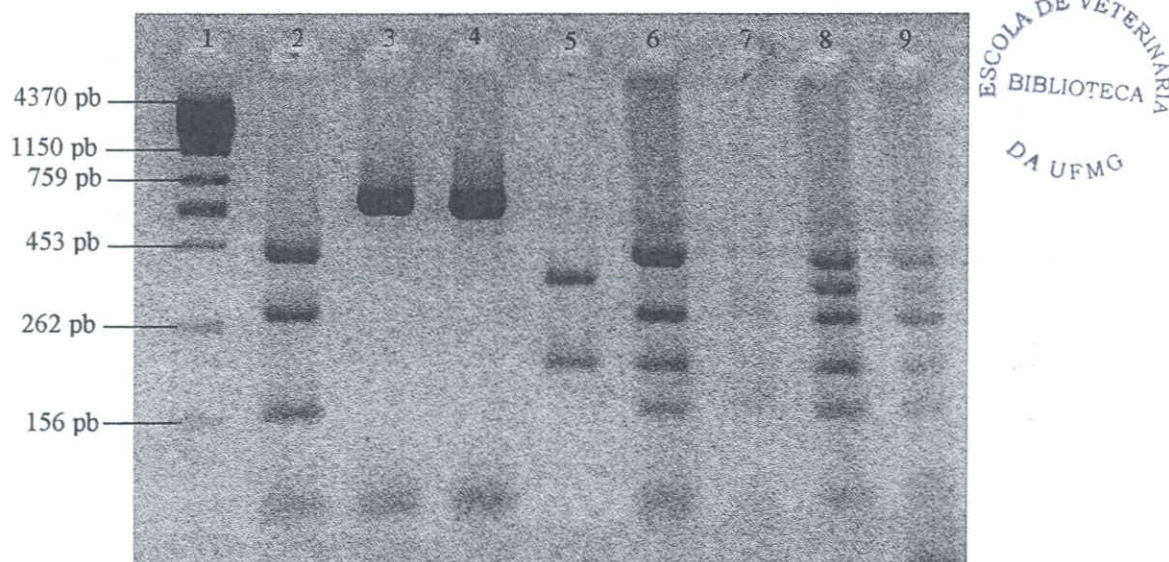


Figura 2. Número de fragmentos gerados pelos produtos de PCR do gene da coagulase de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, utilizando *AluI* – Gel de agarose 5%: canaleta 1: marcador molecular; canaletas 2-5: fragmentos gerados por amostras com amplicon único; canaletas 6-9: fragmentos gerados por amostras com dois amplicons.

4. Discussão

A produção da coagulase é uma importante característica fenotípica utilizada mundialmente para identificar *S. aureus*. Embora, o papel desta proteína na patogênese de infecções por *S. aureus* não seja completamente entendido (Phonimdaeng et al., 1990), a variabilidade demonstrada pela extremidade 3' do gene que a codifica é a base para um dos métodos de tipagem daquele microrganismo, seja isolado de infecções em humanos (Goh et al., 1992; Schwarzkopf e Karch, 1994; Montesinos et al., 2002), seja de infecções animal (Aarestrup et al., 1995; Lange et al., 1999; Schlegelová et al., 2003). A utilização deste método possibilitou a detecção de um alto grau de polimorfismo nas amostras de *S. aureus* estudadas. O método mostrou, também, que embora diversos genótipos tenham sido detectados apenas poucos predominaram na região amostrada. Estes resultados assemelham-se aos previamente relatados por diversos investigadores, os quais observaram a presença de um número limitado de tipos dentro de cada rebanho e em cada país (Aarestrup et al., 1995; Su et al., 1999; Schlegelová et al., 2003).

De acordo com Su et al. (1999) a presença de um número limitado de tipos poderá ser bastante útil, uma vez que os fatores de virulência relevantes para a patogênese da mastite estafilocócica poderão ser identificados e utilizados de forma eficiente para o controle desta patologia. Estudos realizados por Aarestrup et al. (1994) indicaram que os tipos mais frequentes apresentaram uma maior resistência à ação bactericida de neutrófilos bovinos do que os tipos raros, indicando que os genótipos mais frequentes poderão ter características únicas que permitam que os mesmos escapem dos mecanismos de defesa do hospedeiro e estabeleçam infecções intramamária.

Neste trabalho, a tipagem por meio da análise do gene da coagulase gerou um alto índice discriminatório ($D= 0,92$ para o método baseado em PCR e $D= 0,99$ para o baseado no PCR-RFLP). De acordo com Hunter e Gaston (1988), índice superior a $0,90$ é o desejável para que os resultados de um método de tipagem sejam interpretados com segurança. Embora, o número de amostras analisadas tenha sido relativamente baixo, a grande quantidade de padrões RFLPs detectados e a ausência de relação epidemiológica entre os isolados, provavelmente, contribuiu para este índice.

Os iniciadores utilizados neste estudo amplificaram mais de um produto em quatro isolados sugerindo a presença de mais de uma forma alélica para o gene da coagulase entre as amostras de *S. aureus* investigadas. De acordo com Goh et al. (1992), a amplificação de mais de um produto é indicativo da presença de diferentes alelos, desde que uma mesma amostra de *S. aureus* poderá expressar mais de uma forma molecular da proteína coagulase. Esta característica parece ser bastante incomum, visto que apenas Goh et al (1992) e Schwarzkopf e Karch (1994) relataram achado semelhante.

Nas reações de PCR, onde o DNA de outra espécie de *Staphylococcus* coagulase positivo foi utilizado, nenhum produto amplificado foi observado. Segundo Aarestrup et al. (1995) isto indica que o gene da coagulase de *S. aureus* difere daquele de outras espécies do gênero *Staphylococcus* que apresentam a habilidade de coagular o plasma de mamíferos e sugere que iniciadores específicos podem ser utilizados, tanto para a identificação acurada de *S. aureus*, quanto para discriminar entre este e outros *Staphylococcus* coagulase positivo.

5. Conclusões

A análise do gene da coagulase de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de rebanhos do Estado de Minas Gerais mostrou que:

- As mastites são causadas por *Staphylococcus aureus* apresentando diversas variantes do gene que codifica para a proteína coagulase;

- Vários tipos de *Staphylococcus aureus* foram detectados, no entanto, poucos predominaram na região estudada;

- *Staphylococcus aureus* da região estudada apresentou mais de um alelo do gene da coagulase.



EXPERIMENTO III

Detecção por PCR Multiplex dos genes das enterotoxinas A, B e C em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina e bovina.

Resumo

Com o objetivo de analisar a distribuição dos genes que codificam para as enterotoxinas (SEs) A, B e C, 36 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite caprina e 64 isoladas de mastite bovina foram analisadas por PCR Multiplex. Do total de amostras estudadas, em 37 (37%) foi detectado gene para alguma das SEs investigadas. Das amostras de origem bovina, 4 (6,3%) co-amplificaram os genes *sea* e *seb*, e 2 (3,1%) foram positivas para o gene *sec*. Dentre as amostras de mastite caprina, 31 (86%) foram positivas ao Multiplex, sendo detectado em todas o gene *sec*. A produção *in vitro* da SE foi detectada em todas as amostras nas quais o gene correspondente foi amplificado. Os resultados mostraram que *S. aureus* isolados de mastite caprina têm maior potencial enterotoxigênico do que aqueles isolados de mastite bovina. Além disso, a presença do gene *sec* na maioria das amostras de mastite caprina, sugere um possível envolvimento da SEC na patogênese da mastite nesta espécie animal.

Palavras-chave: Cabra; vaca; mastite; enterotoxinas estafilocócicas; PCR multiplex.

1. Introdução

Staphylococcus aureus é um dos mais frequentes agentes etiológicos da mastite, sendo reconhecido mundialmente como importante causa de perdas econômicas e

riscos à saúde pública (Magalhães Lopes et al., 1990). Esta espécie bacteriana causa, predominantemente, infecções subclínicas de longa duração e determina lesões à glândula mamária maiores do que qualquer

outro agente contagioso (Brito e Brito, 1998).

Embora, *S. aureus* tenha a habilidade de produzir uma ampla variedade de fatores de virulência, as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) destacam-se por seu significado na patogênese de doenças humana e animal (Lee et al., 1998). Estas toxinas pertencem à família dos superantígenos (SAGs) cujas principais características são a pirogenicidade, a antigenicidade e a capacidade de aumentar a sensibilidade celular à endotoxinas (Llewelyn e Cohen, 2002), sendo responsáveis por surtos de toxinfecção alimentar e síndrome toxigênica em humanos (Mehrotra et al., 2000). Além disto, existe a possibilidade de que contribuam para a persistência de *S. aureus* na glândula mamária bovina (Ferens et al., 1998).

Nos últimos anos, diversos investigadores têm relatado a produção de SEs por *S. aureus* isolados de mastite bovina, existindo considerável variação geográfica na proporção de amostras enterotoxigênicas (Magalhães Lopes et al., 1990; Kenny et al., 1993; Matsunaga et al., 1993; Cardoso et al., 1999; Larsen et al., 2000; Stephan et al., 2001). Por outro lado, são relatadas diferenças entre *S. aureus* isolados de mastite bovina e mastite caprina, quanto à habilidade de produzir enterotoxinas (Orden et al., 1992).

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a distribuição dos genes que codificam para as SEs A, B e C em *S. aureus* isolados de mastite caprina e bovina. Além disso, a produção *in vitro* das SEs pelos isolados portando os respectivos genes também foi analisada.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 100 amostras de *S. aureus* isoladas do leite de cabras (n=36) e vacas (n=64) com mastite clínica e subclínica. Os isolados caprinos foram provenientes do leite de animais pertencentes a rebanhos localizados na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro e região Norte do Estado do Ceará, sendo previamente coletados e identificados (Boechat, 2002; Silva et al., 2004), sendo parte do banco de amostras do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – Embrapa Caprinos. Os isolados bovinos foram provenientes de animais pertencentes a rebanhos localizados em 23 municípios do Estado de Minas Gerais tendo sido coletados, isolados e identificados por Cardoso (1999), fazendo parte do banco de amostras do Laboratório de controle de mastite da Escola de Veterinária da UFMG.

2.2 Indução e detecção da produção das enterotoxinas A, B e C

Para induzir a produção *in vitro* das SEs pesquisadas, utilizou-se o método do celofane sobre ágar (Robbins et al., 1974). Placas de Petri foram preparadas com 15 a 20 mL de ágar cérebro-coração (ágar BHI), acrescido de 1% de extrato de levedura e 0,1% de fosfato de potássio. Cada amostra a

ser testada foi inoculada em caldo cérebro-coração e incubada por 18 a 20 horas a 37°C. As placas de ágar BHI foram, então, recobertas com disco de celofane estéril, inoculadas com 0,5 mL do cultivo bacteriano e incubadas por 24 horas a 37°C. Após este período, o crescimento bacteriano foi lavado com 2,5 mL de PBS 0,02 M pH 7,4 (1,5 mL em uma primeira etapa e 1 mL em seguida). O líquido da lavagem foi centrifugado a 10000xg por 15 minutos e o sobrenadante transferido para frascos de vidro, adicionando-se 20 µL de timerosal (1:1000) como conservante. O sobrenadante foi mantido congelado em freezer a -20°C até a realização dos testes imunológicos.

Para a detecção das SEs foi utilizado o método da sensibilidade ótima em placa (OSP), seguindo a metodologia descrita por Robbins et al. (1974). Placas de Petri 50x12 mm foram preparadas com 3 mL de ágar nobre fundido e, após a solidificação, perfuradas, utilizando-se molde específico (Figura 1), confeccionado pelo Food Research Institute (Madison, Wisconsin, EUA). O orifício central da placa foi preenchido com o anticorpo específico, na diluição de 1:16, os dois orifícios menores com a toxina padrão na concentração de 4 µg e os orifícios externos com as amostras a serem testadas. As placas foram incubadas em câmara úmida por 24 horas a 37°C. As reações positivas foram determinadas pela formação de linha de precipitação entre a amostra teste e o anticorpo correspondente. Amostras com resultado negativo ou duvidoso (linhas de precipitação inespecíficas) foram testadas pelo método da aglutinação passiva reversa em látex – RPLA (SET-RPLA, Oxoid) seguindo as recomendações do fabricante. As toxinas padrão e os antisoros específicos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de enterotoxinas estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias – FUNED.

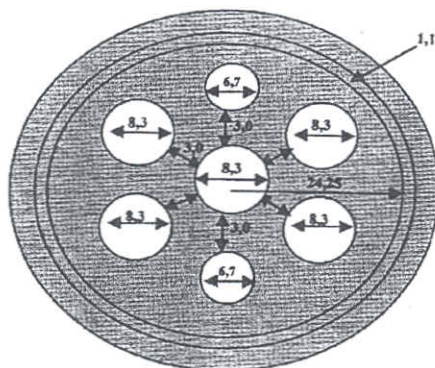


Figura 1. Modelo segundo Food Research Institute usado para perfuração dos orifícios em ágar Noble, medidos em mm.

2.3 Detecção dos genes *sea*, *seb* e *sec*

2.3.1 Extração e purificação do DNA bacteriano

Para a extração e purificação dos ácidos nucléicos utilizou-se, com modificações, a metodologia descrita por Chen et al. (2001) e Rosec e Gigaud (2002). Os isolados bacterianos, bem como amostras das cepas de referência incluídas neste estudo – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 89cTP₂FUNED (SEAB) e *Staphylococcus aureus* FRI 361 (SEC) - foram inoculados em caldo nutritivo (Tryptic Soy Broth, bioBrás-Brasil), sendo incubadas overnight a 37°C para a completa saturação do meio. O DNA genômico foi obtido a partir de 0,5 mL do cultivo bacteriano, o qual foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos. O sedimento foi lavado com 500 µL de tampão TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) e recentrifugado por 10 minutos. As células bacterianas foram suspensas novamente com 200 µL de tampão TE pH 7,5 acrescido de lysostafina – 15 U/mL TE (Lysostaphin 2 mg, Sigma) e incubadas por

1 hora a 37°C. Em seguida, 15 µL de proteinase K – 20 mg/mL (Proteinase K 100 mg, Gibco) foram adicionados, reincubando-se as amostras por 1 hora a 56°C. Para inativar a proteinase K, as amostras foram incubadas por mais 15 minutos a 95°C. Após este período, adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio (25:24), centrifugado a 12000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente extraído com igual volume de fenol-clorofórmio, seguido por nova

extração com clorofórmio. Após a centrifugação final, o sobrenadante foi misturado com etanol 95% (v/v), 2x o volume e deixado para precipitação overnight a –20°C. O sedimento foi, então, lavado com 500 µL de etanol gelado a 70% (v/v), seco por inversão do tubo e diluído em 100 µL de tampão TE pH 7,5. O DNA da solução foi quantificado em espectrofotômetro (260 nm) e congelado a –20°C.

2.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR Multiplex)

A amplificação de seqüências específicas dos genes *sea*, *seb* e *sec* foi realizada com iniciadores (Invitrogen-Brasil) sintetizados a partir das seqüências publicadas dos genes que codificam para a SEA, SEB e SEC₁ (Betley e Mekalanos, 1988; Jones e Khan, 1986; Bohach e Schlievert, 1987). Como controle interno da reação de Multiplex, iniciadores com seqüências específicas do gene *FemA* de *Staphylococcus aureus* foram utilizados. As seqüências dos diferentes pares de iniciadores foram previamente descritas por Mehrotra et al. (2000) e estão sumarizadas na Tabela 1.

As condições da PCR Multiplex foram as mesmas citadas por Mehrotra et al. (2000), com algumas modificações. Para o Multiplex, duas reações diferentes foram preparadas: a reação A, para amplificar seqüências dos genes *sea*, *seb* e *FemA*, e a reação B para amplificar as seqüências dos genes *sec* e *FemA*. A mistura da reação A foi constituída por 2 µL do DNA molde (aproximadamente 700 ng), 0,2 µL de cada um dos iniciadores SEA, SEB e FemA (10

pmol), 0,4 µL do mix dNTPs (100 µM de cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (1 U) e 2 µL de tampão PCR 10x (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% de Triton X-100; 15 mM MgCl₂). O volume foi ajustado para 20 µL com água ultrapura estéril.

A reação B foi constituída pelos mesmos componentes da reação A, excetuando-se os iniciadores, os quais foram SEC e FemA a um volume de 0,4 µL (20 pmol) e 0,2 µL (10 pmol), respectivamente. Para evitar a evaporação dos componentes, em ambas as reações foram adicionados 50 µL de óleo mineral estéril.

A amplificação foi realizada em termociclador (Mini Cycler™, MJ Research) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguindo-se 25 ciclos (desnaturação a 94°C-2 minutos; pareamento a 57°C-1 minuto; extensão a 72°C-1 minuto) e extensão final a 72°C durante 4 minutos.

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos, localização gênica e tamanho esperado do produto amplificado, utilizando iniciadores específicos para os genes *sea*, *seb*, *sec* e *FemA*.

gene	iniciador	seqüência ^a de nucleotídeos (5'-3')	localização dentro do gene	tamanho do produto amplificado (pb)
<i>sea</i>	SEA1	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	349 a 368	102
	SEA2	CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG	431 a 450	
<i>seb</i>	SEB1	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	666 a 685	164
	SEB2	CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG	810 a 829	
<i>sec</i>	SEC1	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG	432 a 455	451
	SEC2	CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG	863 a 882	
<i>FemA</i>	Fem1	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	1444 a 1463	132
	Fem2	GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	1556 a 1575	

^aSeqüência de nucleotídeo e localização gênica derivada de seqüências publicadas dos genes *sea* (Betley e Mekalanos, 1988), *seb* (Jones e Khan, 1986), *sec*₁ (Bohach e Schlievert, 1987) e *FemA* (Berger-Bachi et al., 1989).

2.3.3 Separação e visualização dos produtos amplificados

A separação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em minigel de agarose a 3,5%. O minigel foi preparado com tampão Tris-acetato e EDTA (Sambrook e Russel, 2001) e corado com brometo de etídeo (10 mg/mL de solução aquosa, Pharmacia) a 0,5 µg/mL. Para a corrida de eletroforese foram utilizados 10 µL do DNA mais 2 µL de tampão de amostra 6x (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 15% de Ficoll 400). O minigel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 volts (aproximadamente 15 v/cm de gel) por 50 minutos.

O DNA do bacteriófago ϕ 29 cortado com a enzima *Hind*III de 19285 pb (pares de bases) foi utilizado na concentração de 2,5 µg/10µL como marcador de tamanho molecular (Silva et al., 2000). Os tamanhos em pb são os seguintes: 4370 – 2899 - 2498 – 2201 – 1933 – 1331 – 1150 – 759 – 611 – 579 - 453 – 262 – 156 – 72.

Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (MacroVue, UV-25 Hoefer) e fotografados em câmera digital (Sony-Digital Mavica).

2.4 Teste de especificidade

A especificidade dos iniciadores foi testada pela realização de PCR com cada par isoladamente, antes da realização do Multiplex. As amostras dos DNAs das cepas de referência foram utilizadas isoladamente (PCR) ou em pool (PCR Multiplex).

2.5 Teste de reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos produtos da PCR Multiplex foi testada por meio da análise dos DNAs de 20 amostras (10 de origem caprina e 10 de origem bovina), testadas durante cinco dias consecutivos. As amostras dos DNAs das cepas de referência também foram incluídas.

3. Resultados

3.1 Especificidade

A especificidade de cada par de iniciador dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *FemA* foi demonstrada pela presença de amplicon único e de tamanho esperado ao utilizar, como molde, os DNAs das cepas de referência. Na PCR Multiplex, a amplificação de três fragmentos na reação A - *sea*, *seb* e *FemA* e dois fragmentos na reação B - *sec* e *FemA*, foi obtida com sucesso (Figura 2).

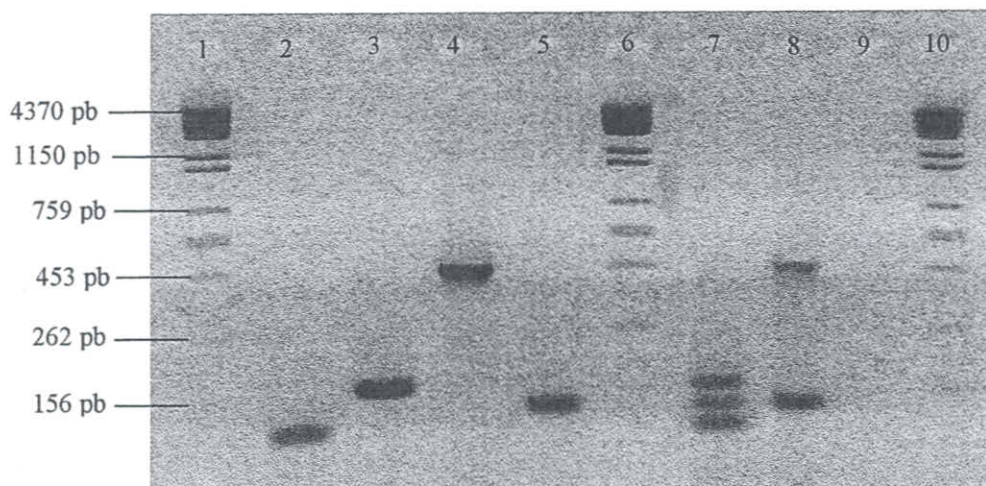


Figura 2: PCR Multiplex para a detecção dos genes *sea*, *seb* e *sec* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina e bovina. gel de agarose a 3,5%: canaleta 1: marcador molecular; canaletas 2-5: *sea*, *seb*, *sec* e *FemA*, respectivamente; canaleta 6: marcador molecular; canaleta 7: Multiplex reação A (*sea*, *seb* e *FemA*); canaleta 8: Multiplex reação B (*sec* e *FemA*); canaleta 9: controle negativo; canaleta 10: marcador molecular.

3.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos resultados da técnica PCR Multiplex foi demonstrada em todas as amostras testadas seguidamente. Embora, a intensidade dos amplicons tenha variado, sua presença foi reproduzida em todas as reações.

3.3 Distribuição dos genes *sea*, *seb* e *sec*

A análise dos 100 isolados de *S. aureus* por PCR Multiplex demonstrou que em 37

(37%), um ou mais dos genes pesquisados estava presente. Destas amostras, 33 (89%) foram positivas para o gene *sec* e em 4 (11%) foram co-amplificados os genes *sea* e *seb*.

A distribuição dos genes, de acordo com a origem dos isolados, pode ser observada na Tabela 2. Das 64 amostras isoladas de mastite bovina, 4 (6,3%) co-amplificaram os genes *sea* e *seb* e 2 (3,1%) foram positivas para o gene *sec*. Dentre as 36 amostras isoladas de mastite caprina, 31 (86%) foram positivas à PCR, sendo detectado em todas o gene *sec*.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

Tabela 2. Distribuição dos genes *sea*, *seb* e *sec* em *Staphylococcus aureus* de acordo com a origem do isolado.

Gene	Origem dos isolados		Total (%)
	Vaca (%)	Cabra (%)	
<i>sea</i>	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)
<i>seb</i>	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)
<i>sec</i>	2 (3,1)	31 (86,0)	33 (33,0)
<i>sea+seb</i>	4 (6,3)	- (0,0)	4 (4,0)
nenhum	58 (90,6)	5 (14,0)	63 (63,0)
Total	64 (100)	36 (100)	100 (100)

3.4 Produção *in vitro* da SEA, SEB e SEC

A produção *in vitro* de SE foi detectada em todas as amostras nas quais o respectivo gene estava presente (Tabela 3). A maioria dos isolados positivos à PCR produziu SE em quantidade suficiente para ser detectada pela OSP (27/37). Por outro lado, em 10 isolados a detecção foi possível apenas pelo RPLA, sendo todos estes de origem

caprina. A produção de outra SE, além da codificada pelo gene detectado, também foi pesquisada nas 6 amostras de origem bovina, positivas à PCR e em todas as amostras de origem caprina. Em apenas uma amostra, a produção de SEA foi detectada, sendo tal amostra, negativa para a presença do gene *sea*.

Tabela 3. Detecção das enterotoxinas A, B e C em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina e bovina.

Toxina	Nº de isolados		
	PCR	OSP	RPLA
SEA	-	-	1
SEB	-	-	-
SEC	33	23	10
SEA+SEB	4	4	NR*
Total	37	27	11

*NR= não realizado para estas amostras

4. Discussão

Algumas cepas de *S. aureus* produzem uma ou mais toxinas enterotoxigênicas, incluindo as SEs A, B e C. Estas SEs, representam a principal causa de

toxinfecção alimentar por aquele microrganismo e são apontadas, também, como potenciais fatores de virulência que contribuem para a patogênese da mastite (Ferens et al., 1998; Kuroishi et al., 2003). Além disso, as SEs poderão indicar a origem da amostra de *S. aureus* desde que

se tem observado uma maior proporção de isolados animais produzindo SEC e isolados de origem humana produzindo, principalmente, SEA (Bergdoll, 1990; Orden et al., 1992). Este trabalho, confirma estes relatos, uma vez que a SEC foi a mais freqüente nos isolados testados.

Os resultados deste estudo mostraram que *S. aureus* isolados de mastite caprina apresentaram um maior potencial enterotoxigênico do que os isolados de mastite bovina. Resultados semelhantes foram descritos por Orden et al. (1992), os quais observaram que 67% dos isolados de mastite caprina e apenas 19% dos de mastite bovina produziram SEs. Valle et al. (1990), estudando a presença de SEs em *Staphylococcus* spp. isolados de diversos sítios de cabras sadias, concluíram que esta espécie animal é um importante reservatório de *Staphylococcus* enterotoxigênicos. Estes relatos, juntamente com os deste trabalho, sugerem que as SEs possam ser mais importantes para *S. aureus* se estabelecer e/ou persistir na glândula mamária caprina do que na bovina. A presença de um maior número de células polimorfonucleares na glândula mamária de cabras, particularmente neutrófilos, poderá ser um dos fatores que contribuam para a seleção de cepas geneticamente hábeis em produzir SAGs, uma vez que estudos têm demonstrado efeitos deletérios destas toxinas sobre aquele tipo celular (Shuberth et al., 2001).

Os resultados também mostraram o potencial risco para a saúde pública representado pela mastite caprina. A maior habilidade enterotoxigênica de *S. aureus* causadores de mastite nesta espécie animal e o fato de que o leite de cabra ainda é utilizado sem prévio tratamento térmico para a fabricação de determinados tipos de queijos, faz com que os riscos sejam bem maiores com o leite caprino.

Neste estudo, apenas 9,4% dos isolados de mastite bovina portavam o gene e produziram SEs. Trabalhos anteriores têm revelado intensa variação geográfica na ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos isolados de mastite bovina. Magalhães Lopes et al. (1990), estudando isolados de mastite no Sudeste do Brasil e Larsen et al. (2000), estudando isolados da Dinamarca, observaram a produção de SEs por 4,7% e 0,2% dos isolados, respectivamente. Em contraste, Kenny et al. (1993) nos EUA, Matsunaga et al. (1993) no Japão e Stephan et al. (2001) na Suíça, relataram que 28,6%, 34,5% e 100% dos isolados, respectivamente, produziram SEs. Estes resultados, indicam que a presença de SAGs em *S. aureus* de mastite bovina pode ser determinada por fatores ambientais e de manejo, específicos de cada área geográfica. Além disto, os resultados levantam dúvidas sobre o papel destas toxinas na patogênese da mastite bovina, uma vez que, de acordo com Larsen et al. (2000), para que um fator de virulência seja considerado importante, o gene que o codifica, bem como a sua expressão, devem estar presentes no isolado infectante.

A presença exclusiva do gene *sec* em *S. aureus* isolados de mastite caprina, assim como a sua expressão em todos os isolados portando este gene, sugere que esta toxina possa desempenhar um papel na patogênese da mastite nesta espécie animal. Outros trabalhos também têm relatado um alto percentual de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina produzindo SEC (Buyser et al., 1987; Harvey e Gilmour, 1988; Valle et al., 1990; Orden et al., 1992). Ferens et al. (1998) demonstraram que SEC afeta a resposta imune de bovinos, o que poderá contribuir para a persistência de *S. aureus* na glândula mamária. Até o momento, não se sabe se esta toxina afeta de forma semelhante o sistema imune de cabras. No entanto, a presença do gene *sec* na maioria dos isolados analisados, sugere que este SAG possa ser importante para a

patogenicidade de *S. aureus* adaptado à glândula mamária de cabras.

Foram demonstrados 100% de concordância entre a detecção do gene por PCR Multiplex e a detecção da toxina correspondente pelos testes fenotípicos. Estes resultados demonstram que a PCR pode ser utilizada para caracterizar e identificar tipos enterotoxigênicos de *S. aureus* isolados de mastite. A possibilidade da detecção simultânea de vários genes, aliada à sensibilidade, reprodutibilidade e facilidade de execução, faz desta técnica uma importante ferramenta a ser utilizada na pesquisa veterinária.

O alto percentual de isolados caprinos nos quais a detecção da produção da SEC foi possível apenas pelo RPLA indica que a expressão do gene *sec* foi abaixo do nível de detecção da OSP (limite de 500 ng/mL). Assim, ao utilizar métodos fenotípicos para identificar e caracterizar cepas enterotoxigênicas, testes mais sensíveis devem ser selecionados para minimizar a ocorrência de resultados falso negativos. Por outro lado, a detecção da SEA pelo RPLA, em uma amostra na qual não foi possível a amplificação do gene *sea*, demonstra que a utilização isolada dos testes fenotípicos poderá superestimar a presença de cepas enterotoxigênicas, desde que os mesmos são passíveis de sofrer interferência de antígenos inespecíficos, presentes nos extratos das culturas bacterianas. Ressalta-se, no entanto, que a ausência de amplicon na amostra citada, pode ser devida a mutações nas áreas de reconhecimento dos iniciadores utilizados para a detecção do gene *sea*.

5. Conclusões

A partir dos resultados deste estudo pode-se concluir que:

- *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina têm maior potencial enterotoxigênico do que os isolados de mastite bovina;

- Amostras de *Staphylococcus aureus* causadoras de infecções intramamária em rebanhos caprinos das regiões Norte do Estado do Ceará e Serrana do Estado do Rio de Janeiro, possuem o gene *sec* e expressam esta toxina em condições *in vitro* sugerindo um papel desta exoproteína na patogênese da mastite caprina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; DANGLER, C.A.; SORDILLO, L.M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n.2, p. 124-128, 1995.

AARESTRUP, F.M.; SCOTT, N.L.; SORDILLO, L.M. Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5679-5682, 1994.

ANDERSON, J.C.; ADLAM, C.; KNIGHTS, J.M. The effect of staphylocoagulase in the mammary gland of the mouse. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 63, n. 3, p. 336-340, 1982.

ANNEMÜLLER, C.; LÄMMLER, CH.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 217-224, 1999.

BAYLES, K.W.; IANDALO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene

encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 9, 4799-4806, 1989.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D.O. **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. Cap. 5, p. 85-106.

BERGER-BACHI, B.; BARBERIS-MAINO, L.; STRASSLE, A.; KAYSER, F.H. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. **Molecular and General Genetics**, v. 219, n. 1-2, p. 263-269, 1989.

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

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 34-41, 1988.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds: an illustrated and practical guide**. 2. ed. Tonbridge: Farming Press, 2000. 196 p.

BOECHAT, J.U.D. **Epidemiologia de doenças infecciosas de caprinos segundo o perfil do produtor**. 2002. 76 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular and**

General Genetics, v. 209, n. 1, p. 15-20, 1987.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Programas de controle das mastitis causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1998. 25p (EMBRAPA-CNPGL. **Documentos**, 71).

BUYSER, M.L.; DILASSER, F.; HUMMEL, R.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, n.4, p. 301-309, 1987

CARDOSO, H.F.T. **Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais**. 1999. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Production of enterotoxins and toxic shock toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 347-349, 1999.

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

CARMO, L.S. **Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e toxina TSST-1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos**. 2001. 254 f. Tese

(Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CHEN, T-R.; HSIAO, M-H.; CHIOU, C-S.; TSEN, H-Y. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n.1, p. 63-70, 2001.

CHIOU, C-S.; WEI, H-L.; YANG, L-C. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2186-2190, 2000.

CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C.; LUENGO, C.; SANCHEZ, A. Significance of pathogens in goat mastitis. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS**, 7., 2000, Tours, France. p. 753-754.

CORRALES, J.C.; CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; MARCO, J.C. Sensibilidad antibiótica in vitro de estafilococos y corinebacterias aisladas de mamitis subclínicas caprinas. **Medicina Veterinaria**, v.12, n. 1, p. 16-24, 1995.

COUCH, J.L.; SOLTIS, M.T.; BETLEY, M.J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 7, p. 2954-2960, 1988.

CULLOR, J.S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine**, v. 88, n. 6, p. 571-579, 1993.

DeGRAVES, F.J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. **The Veterinary Clinics of North**

America. Food Animal Practice: update on bovine mastitis, v. 9, n. 3, p. 421-433, 1993.

DEINHOFER, M.; PERNTHANER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 161-166, 1995.

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

FERENS, W.A.; DAVIS, W.C.; HAMILTON, M.J.; et al. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 573-580, 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.

FITZGERALD, J.R.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; SMYTH, C.J. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 6, p. 1028-1037, 2000.

FITZGERALD, J.R.; MONDAY, S.R.; FOSTER, T.J.; et al. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 63-70, 2001.

FITZGERALD, J.R.; REID, S.D.; RUOTSALAINEN, E.; et al. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a high variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of

- proteins. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2827-2838, 2003.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
- FUEYO, J.M.; MARTIN, M.C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDONZA, M.C. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 139-145, 2001.
- GOH, S-H.; BYRNE, S.K.; ZHANG, J.L.; CHOW, A.W. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1642-1645, 1992.
- HARALDSSON, I.; JONSSON, P. Histopathology and pathogenesis of mouse mastitis induced with *Staphylococcus aureus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 94, n. 2, p. 183-196, 1984.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology**, v. 7, p. 79-82, 1988.
- HOOKEY, J.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1083-1089, 1998.
- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.
- JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; et al. Egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 669-677, 2001.
- JONES, C.L.; KHAN, S.A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 1, p. 29-33, 1986.
- KAIDA, S.; MIYATA, T.; YOSHIZAWA, Y.; et al. Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. **Journal of Biochemistry**, v. 102, n. 5, p. 1177-1186, 1987.
- KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D. Mastitis-related pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 4, n. 2, p. 203-212, 1991.
- KAWABATA, S-I.; MORITA, T.; MIYATA, T.; et al. Isolation and characterization of Staphylocoagulase chymotryptic fragment. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 3, p. 1427-1438, 1986.
- KENNY, K.; REISER, R.F.; BASTIDA-CORCUERA, F.D.; NORCROSS, N.L. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 706-707, 1993.
- KLOOS, W.E. Systematics and the natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 19, p. 25-37, 1990. Supplement
- KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*. In: MURRAY, P.R.

Manual of clinical microbiology. 6 ed. Washington: ASM, 1995. Cap. 22, p. 282-295.

KUROISHI, T.; KOMINE, K-I.; KAI, K.; et al. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 8, p. 899-906, 2003.

LABIMAGE. versão 2.7.0. c2003. Disponível em: <www.labimage.com> Acessado em 23 jul de 2003.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 127-141, 1999.

LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R.; JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 153-162, 2000.

LEE, S.U.; QUESNELL, M.; FOX, L.K.; et al. Characterization of staphylococcal bovine mastitis isolates using the polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1384-1386, 1998.

LERONDELLE, C.; POUTREL, B. Characteristics of non-clinical mammary infections. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 5, p. 105-112, 1984.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*.

Journal of Applied Microbiology, v. 95, n. 1, p. 38-43, 2003.

LLEWELYN, M.; COHEN, J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. **Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 156-162, 2002.

MacFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3. ed. Washington: Williams & Wilkins, 2000. 912 p.

MAGALHÃES LOPES, C.A.; MORENO G.; CURI, P.R.; et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. **The British Veterinary Journal**, v. 146, n. 5, p. 443-448, 1990.

MATSUNAGA, T.; KAMATA, S-I.; KAKIICHI, N.; UCHIDA, K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **The Journal Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 2, p. 297-300, 1993.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; et al. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4254-4262, 1993.

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

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; et al. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and

- comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2119-2125, 2002.
- MULLARKY, I.K.; SU, C.; FRIEZE, N.; et al. *Staphylococcus aureus* agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 45-51, 2001.
- MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J.; WELCH, R.A. Identification and characterization of staphylococcal types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3337-3348, 1998.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. 3. ed. Arlington: NMC, 1990. 34 p
- NICKERSON, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. **Veterinary Medicine**, p. 368-386, 1993.
- OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- ORDEN, J.A.; GOYACHE, J.; HERNÁNDEZ, J.; et al. Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 486-489, 1992.
- ORTEGA, L.S. **Heterogeneidade genética em amostras brasileiras de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isoladas de humanos e de sagüis**. 2001. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.; DONAHUE, H.I.; et al. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 360-366, 2001.
- PHILPOT, W.N. Milk quality and mastitis control: past, present and future. In: **CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE**, 2., 2002, Ribeirão Preto. Anais... São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. p. 39-53.
- PHONIMDAENG, P.; O'REILLY, M.; NOWLAN, P.; et al. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 393-404, 1990.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Mosby, 1994. 648 p
- RAIMUNDO, O.; DEIGHTON, M.; CAPSTICK, J.; GERRATY, N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 275-284, 1999.
- REN, K.; BANNAN, J.D.; PANCHOLI, V.; et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 5, p. 1675-1683, 1994.
- ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 947-950, 1974.

- ROSEC, J.P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 61-70, 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.
- SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; et al. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 327-334, 2003.
- SCHLIEVERT, P.M.; JABLONSKI, L.M.; ROGGIANI, M.; et al. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3630-3634, 2000.
- SCHUBERTH, H-J.; KRUEGER, C.; ZERBE, H.; et al. Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 187-199, 2001.
- SCHWARZKOPF, A.; KARCH, H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2407-2412, 1994.
- SHOPSIN, B.; GOMEZ, M.; WADDINGTON, M.; et al. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3453-3456, 2000.
- SILVA, E.R.; SIQUEIRA, A.P.; MARTINS, J.C.D.; et al. Identification and *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 55, n. 1-3, p. 45-49, 2004.
- SILVA, N.; ESCARMIS, C.; SOLANA, A.; CASTRO, J.M. Variabilidad genómica entre cepas Del herpes virus bovino tipo I aisladas de casos clínicos de IBR. **Investigación Agrária. Producción y sanidad animales**, v. 15, n. 1-2, p. 59-67, 2000.
- STEPHAN, R.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C.H. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 373-382, 2001.
- STUYT, R.J.L.; NETEA, M.G.; KIM, S-H.; et al. Differential roles of interleukin-18 (IL-18) and IL-12 for induction of gamma interferon by staphylococcal cell wall components and superantigens. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5025-5030, 2001.
- SU, C.; HERBELIN, C.; FRIEZE, N.; et al. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. **Epidemiology and Infection**, v. 122, n. 2, p. 329-336, 1999.
- SU, Y-C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, 1995.
- TAKEUCHI, S.; MAEDA, T.; NOZOMU, H.; et al. Variation of the agr locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 267-274, 2001.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; et al. Comparison of traditional and

molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 407-415, 1994.

TODAR, K. *Staphylococcus*. Todar's online textbook of bacteriology. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net>> Acessado em 07 Jan de 2005.

VALLE, J.; GÓMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1323-1326, 1990.

VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. **Computer Applications in the Biosciences**, v.10, n. 5, p. 569-570, 1994.

VASUDEVAN, P; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 1-2, p. 179-185, 2003.

ZECCONI, A.; PICCININI, R. Teoria e prática de controle de mastite por *Staphylococcus aureus*. **NAPGAMA**, ano 2, n. 5, p. 4-11, 1999.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWARD, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 2, p. 227-233, 1998.

WHITE, E.C.; HINCKLEY, L.S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 33, n. 2, p. 117-121, 1999.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA