

IDENTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS ISOLADOS DE LEITE DE BÚFALAS COM MASTITE POR PCR E PELO SEQUENCIAMENTO DO 16S rDNA

Identification of staphylococci isolated from buffalo's mastitis milk by PCR and 16S rDNA sequencing

Carla Christine Lange¹
Maria Aparecida V. P. Brito¹
José Renaldi F. Brito²
Edna Froeder Arcuri¹
Guilherme Nunes de Souza¹
Monalisa Azevedo da Silva³
Selda Loase Salustiano Marques³
Robert Domingues⁴

RESUMO

Oitenta *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva e coagulase-negativa isolados de mastite bubalina foram submetidos a reações de PCR para a identificação de *S. aureus* (amplificação do gene *femA*), *S. intermedius* (fragmento do 16S rDNA) e *S. hyicus* (região intergênica 16S-23S rDNA) e ao sequenciamento do 16S rDNA. Trinta e três isolados foram identificados como *S. aureus* pela reação de PCR (amplificação do gene *femA*) e a identidade de três desses isolados foi confirmada pelo sequenciamento do 16S rDNA. As reações de PCR para identificar *S. intermedius* e *S. hyicus* não foram eficientes para identificar estas espécies. Quarenta e seis isolados foram identificados como *S. chromogenes* e um isolado como *S. hyicus* pelo sequenciamento do 16S rDNA. A identificação dessas duas últimas espécies somente foi possível pelo sequenciamento do 16S rDNA.

Termos para indexação: *Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, identificação, búfalos.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina. Entre as espécies mais frequentemente isoladas, *S. aureus* é um patógeno primário, responsável por infecções clínicas e subclínicas e altas contagens de células somáticas (CCS) no leite (National Mastitis Council, NMC, 2004). Duas outras espécies coagulase-positivas, *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido relatadas como causas de mastite, mas são encontradas menos frequentemente nos rebanhos leiteiros (HODGES et al., 1984; ROBERSON et al., 1996; CAPURRO et al., 1999). As demais espécies de *Staphylococcus*, classificadas como coagulase-negativas, são consideradas patógenos secundários. O grupo dos coagulase-negativos compreende cerca de 40 espécies e subespécies (BANNERMAN, 2003), cuja identificação completa depende de muitos testes fenotípicos ou de testes moleculares, nem sempre disponíveis na rotina do diagnóstico microbiológico. A presença de estafilococos coagulase-negativos na glândula mamária está, geralmente,

1 Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG.

2 Assistente de Pesquisa, Embrapa Gado de Leite.

3 Estudante do Curso de Biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF).

4 Estudante do Curso de Farmácia Bioquímica da UFJF.

5 Assessor do Pólo de Excelência do Leite/SECTES (Secretaria Estadual de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior).
Órgão financiador: Fapemig (CVZ 1816/06) e Embrapa.

associada a quadros moderados de inflamação. Entretanto, em rebanhos com baixa CCS essas bactérias contribuem para o aumento da CCS do leite total do rebanho (SCHUKKEN et al., 2009).

A taxonomia do gênero *Staphylococcus* evoluiu nos últimos anos graças à disponibilidade de uso de técnicas que estimam as relações fenotípicas e genotípicas. Novas espécies foram descritas (FOSTER et al., 1997; DEVRIESE et al., 2005) e reclassificações ocorreram (SASAKI et al., 2007). Esses avanços permitem identificar corretamente as espécies de *Staphylococcus* envolvidas em mastite e o melhor conhecimento do papel das diferentes espécies na patogenia e epidemiologia da doença (BES et al., 2000).

O desenvolvimento de diferentes técnicas de biologia molecular viabilizou a busca de métodos mais eficazes de identificação e caracterização de microrganismos. Entre esses métodos, a análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas tem sido empregada para a classificação de microrganismos. Um exemplo dessas macromoléculas é o RNA ribossomal, essencial para a sobrevivência dos organismos, e altamente conservado entre as bactérias. O sequenciamento do gene do 16S RNA ribossomal tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética. As sequências encontradas são comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados, como o NCBI (National Center for Biotechnology Information) e RIDOM (Ribosomal Differentiation of Microorganisms) (BECKER et al., 2004).

Neste trabalho, espécies de *Staphylococcus* isoladas de mastite bubalina foram identificadas por PCR, empregando oligonucleotídeos iniciadores descritos previamente, e pelo sequenciamento do 16S rDNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados bacterianos

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. Foram analisados 80 *Staphylococcus* spp. isolados de amostras compostas de leite de búfalas, oriundas de oito rebanhos bubalinos localizados na Região do Alto São Francisco/MG (CARVALHO et al., 2007). As bactérias foram identificadas como *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (SCP) e coagulase-negativos (SCN) de acordo com NMC (2004) e estocadas a -20 e -80°C para posterior caracterização.

2.2 Reações de PCR

Todos os SCP foram submetidos a três reações de PCR, para identificação de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. Para identificação de *S. aureus* foram utilizados oligonucleotídeos descritos por MEHROTRA et al. (2000), que amplificam um fragmento do gene *femA*, de 132 pares de bases (pb). Para a identificação de *S. intermedius* foram utilizados oligonucleotídeos descritos por WAKITA et al. (2002), que amplificam um fragmento do 16S rDNA, de 901 pb. E para a identificação de *S. hyicus* foram utilizados oligonucleotídeos descritos por FORSMAN et al. (1997), que amplificam um fragmento do 16S-23S rDNA, de 250 pb.

A extração de DNA das culturas foi realizada de acordo com HESSELBARTH e SCHWARZ (1995). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuantpro, Amersham Biosciences) e as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100 ng/μl).

Para a amplificação do gene *femA*, as reações foram incubadas a 94°C por 4 min., submetidas a 5 ciclos de 94°C por 45 seg., 56°C por 45 seg. e 72°C por 45 seg.; 20 ciclos de 72°C por 45 seg., 94°C por 45 seg. e 72°C por 45 seg.; e uma extensão final de 72°C por 5 min. Para amplificação dos genes 16S rDNA e 16S-23S rDNA, as reações foram incubadas a 94°C por 5 min., submetidas a 25 ciclos de 94°C por 1 min., 53°C por 1 min. e 72°C por 1 min. e 30 seg., com uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A reação foi realizada em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v). O registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).

2.3 Sequenciamento do 16S rDNA

Foram submetidos ao sequenciamento do 16S rDNA todos os isolados não identificados como *S. aureus* (n=47), três isolados identificados como *S. aureus*, além das cepas-padrão *S. aureus* ATCC 51651, *S. hyicus* ATCC 11249, *S. intermedius* ATCC 29663, *S. capitis* ATCC 35661, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. gallinarum* 700401, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. lentus* ATCC 700403, *S. lugdunensis* ATCC 49576,

S. saprophyticus ATCC 15305, *S. sciuri* ATCC 29061, *S. simulans* ATCC 27851, *S. warneri* ATCC 49454 e *S. xylosus* ATCC 29971.

O DNA bacteriano foi extraído como citado acima. O DNA foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCG-3' e 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3', que amplificam um produto de 536 pb. O programa de PCR iniciou com uma etapa de desnaturação de 5 min., seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. e 74°C por 2 min., com uma extensão final de 74°C por 5 min. Os produtos obtidos foram purificados com um kit de purificação (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota de 200 ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais foi utilizado o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, NYSE, Germany) e 0,5 iM do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare, NYSE, Germany) e submetidas a 6 kV por 160 min. As reações foram preparadas separadamente com os dois oligonucleotídeos iniciadores de modo a se obter duas sequências para cada amostra analisada.

Os pares de sequências foram editados e reunidos utilizando-se o software SeqMan (LaserGene package, DNASTAR). As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e três isolados foram identificados como *S. aureus* pela reação de PCR que amplifica o gene *femA*. Estes isolados já haviam sido identificados fenotipicamente como *S. aureus*: apresentaram resultado positivo na prova da coagulase em tubo e no teste de Voges-Proskauer (produção de acetoina). A identificação dos três isolados testados dessa espécie foi confirmada pelo sequenciamento do 16S rDNA.

A reação de PCR empregada para identificar *S. intermedius* (WAKITA et al. 2002) identificou corretamente a cepa padrão *S. intermedius* ATCC 29663, entretanto produtos de amplificação de igual tamanho foram obtidos de todos os isolados identificados como *S. chromogenes* pelo sequenciamento. A reação de PCR para *S. hyicus* (FORSMAN et al. 1997) amplificou somente o isolado identificado como *S. hyicus* pelo sequenciamento e a cepa padrão ATCC 11249. Entretanto, falhou em identificar alguns isolados de *S. hyicus* provenientes de outro rebanho.

O sequenciamento do 16S rDNA confirmou a identificação de três isolados de *S. aureus* e identificou 46 isolados como *S. chromogenes* e um isolado como *S. hyicus*. A identidade das quatorze cepas padrão incluídas neste estudo também foi confirmada pelo sequenciamento. Cada isolado foi relacionado a uma espécie de acordo com o menor valor E (E-value) e a maior similaridade. Todos os isolados apresentaram similaridade maior ou igual a 99%. Apenas um isolado apresentou o valor E diferente de zero (a cepa padrão *S. intermedius* ATCC 29663).

No fragmento de 536 pb sequenciado, o número de pares de bases diferentes entre as espécies avaliadas variou de 6 a 28. Entre *S. aureus* e *S. hyicus* houve diferença em 22 pares de bases, entre *S. aureus* e *S. intermedius* foram encontradas diferenças em 28 pares de bases e entre *S. aureus* e *S. chromogenes*, em 23 pares de bases. Entre *S. hyicus* e *S. intermedius* foram encontradas diferenças em seis pares de bases, entre *S. hyicus* e *S. chromogenes*, em nove pares de bases e entre *S. intermedius* e *S. chromogenes*, também uma diferença em nove pares de bases.

O grande número de *S. chromogenes* isolado neste estudo está de acordo com resultados encontrados por BIRGERSSON et al. (1992), AARESTRUP e JENSEN (1997) e TAPONEN et al. (2006 e 2008), que mostraram a disseminação deste agente em rebanhos bovinos. O isolamento de uma única estirpe de *S. hyicus* é um resultado semelhante aos descritos por AARESTRUP e JENSEN (1997), CAPURRO et al. (2002), GIANNECHINI et al. (2002) e TAPONEN et al. (2006), todos em rebanhos bovinos.

KOTHE et al. (1993) isolaram também somente uma estirpe de *S. hyicus* de mastite bubalina, entretanto não isolaram *S. chromogenes*. Comparações com dados de outros estudos conduzidos em rebanhos bubalinos não puderam ser feitas, em virtude da ausência de informações disponíveis a respeito de infecções intramamárias causadas por espécies do gênero *Staphylococcus* nesta espécie animal.

4 CONCLUSÕES

A espécie *S. aureus* se diferencia bastante das demais espécies do gênero e pode ser facilmente identificada por testes fenotípicos e por PCR. A diferenciação das outras espécies do gênero *Staphylococcus*

é mais difícil em virtude da grande similaridade entre elas. Neste estudo, *S. aureus* foi identificado por testes fenotípicos e por PCR do gene *femA*, e a identificação foi confirmada pelo sequenciamento do 16S rDNA. As reações de PCR para identificar *S. intermedius* e *S. hyicus* não foram eficientes para identificar estas espécies. Os isolados que não foram identificados como *S. aureus*, foram identificados como *S. chromogenes* e *S. hyicus* pelo sequenciamento do 16S rDNA. A identificação dessas duas últimas espécies somente foi possível pelo sequenciamento do 16S rDNA.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e Embrapa pelo apoio financeiro. À Embrapa, pela bolsa concedida à Selda Loase Salustiano Marques. José Renaldi Feitosa Brito e Robert Domingues são bolsistas da FAPEMIG (Convênio 10132/07 e Pronex 4695/EDT 470/07).

SUMMARY

The identification of 80 isolates of coagulase-positive and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. recovered from buffalo's mastitis was carried out by PCR using specific primers for *S. aureus* (*femA* gene), *S. intermedius* (16S rDNA) and *S. hyicus* (16S-23S rDNA spacer region). In addition, products of amplification of variable regions of the 16S rDNA gene of the strains were sequenced. Thirty three strains were identified as *S. aureus* by PCR (*femA* gene), and the identification confirmed by sequencing of 16 rDNA of three isolates. According to the 16S rDNA sequencing, 46 isolates were identified as *S. chromogenes* and one was identified as *S. hyicus*. The identification of *S. hyicus* and *S. chromogenes* was accomplished only by 16S rDNA sequencing.

Index terms: *Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, identification, buffaloes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 307-312, 1997.
- BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8.ed. Washington: ASM, 2003. p. 384-404.
- BECKER, K.; HARMSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; von EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.
- BES, M.; GUÉRIN-FAUBLÉE, V.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Veterinary Microbiology*, v. 71, p. 287-294, 2000.
- BIRGERSSON, A.; JONSSON, P.; HOLMBERG, O. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. *Veterinary Microbiology*, v. 31, p. 181-189, 1992.
- BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural*, v. 32, n. 1, p. 79-82, 2002.
- CAPURRO, A.; CONCHA, C.; NILSSON, L.; OSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 40, n. 4, p. 315-321, 1999.
- CARVALHO, L. B.; AMARAL, F. R.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; LEITE, R. C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.
- DEVRIESE, L.; VANCANNEY, M.; BAELE, M.; VANECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

- FORSMAN, P.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, v. 143, p. 3491-3500, 1997.
- FOSTER, G.; ROSS, H. M.; HUTSON, R. A.; COLLINS, M. D. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 489-502, 1999.
- GIANNEECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; MORENO LOPES, J. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 43, n. 4, p. 221-230, 2002.
- HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agricultural Practice**, v. 10, p. 29-34, 1989.
- HESELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 11-17, 1995.
- HODGES, R. T.; JONES, Y. S.; HOLLAND, J. T. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 32, n. 9, p. 141-145, 1984.
- KOTHE, R. V.; SHERIKAR, A. A.; MUKHERJEE, S. R. Isolation and identification of pathogenic bacteria and fungi associated with mastitis in buffaloes. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 34, p. 47-49, 1993.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for the detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1032-1041, 2000.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4.ed. Verona: National Mastitis Council. 2004. 47p.
- ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 54-57, 1996.
- SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2770-2778, 2007.
- SCHUKKEN, Y. H.; GONZÁLEZ, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOME, F. L.; BENNETT, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J.; ZADOKS, R. N. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, n. 134, p. 9-14, 2009.
- TAPONEN, S.; SIMOJORI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H. D.; PYÖRÄLÄ, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 199-207, 2006.
- TAPONEN, S.; BJÖRKROTH, J.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 422-429, 2008.
- WAKITA, Y.; KAWANO, J.; SHIMIZU, A.; HAJEK, V.; TOMISAKA, E.; YASUDA, R.; MATSUO, E. Development of a PCR test for the identification of *Staphylococcus intermedius* based on the 16 rDNA sequence. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 7, p. 603-605, 2002.

Anais do
26º Congresso Nacional de Laticínios
Instituto de Laticínios Cândido Tostes

13 a 16 de julho de 2009 - Expominas - Juiz de Fora - MG

ISBN 978-85-99764-11-4

Todos os direitos são reservados à EPAMIG.

