

Identificação de estafilococos coagulase negativos isolados de mastite bovina por sequenciamento do rDNA 16S

Carla Christine Lange, Maria Aparecida V.P. Brito, Fabiana Santos da Silva, Mariana Caroline T. Alvim, Daniele Ribeiro L. Reis, Robert Domingues

Resumo

A mastite é uma doença multifatorial, frequentemente de origem bacteriana, e que afeta rebanhos no mundo inteiro. O gênero *Staphylococcus* contém pelo menos 40 espécies e 17 subespécies e, sob determinadas circunstâncias, vários desses microrganismos são capazes de causar mastite. Em rebanhos que alcançaram um controle dos agentes contagiosos, especialmente *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*, as outras espécies de *Staphylococcus* têm sido frequentemente associadas à mastite em bovinos. Neste estudo um total de 63 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos isolados de mastite bovina foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S para a identificação dos isolados em nível de espécie. Foram usados oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um produto de 536 pb. As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI. As espécies identificadas foram *S. chromogenes* (25), *S. sciuri* (10), *S. haemolyticus* (7), *S. epidermidis* (6), *S. simulans* (5) e *S. hyicus* (3). Todas as espécies identificadas neste estudo já foram identificadas anteriormente em outros estudos sobre a etiologia da mastite estafilocócica. A identidade de sete isolados não foi elucidada, pois o fragmento sequenciado alinhou em toda sua extensão (100%) com duas ou três espécies diferentes. O sequenciamento de um fragmento maior do mesmo gene ou de outro gene deverá ser feito para se obter a identificação definitiva destes sete isolados.

Palavras-chave: *Staphylococcus chromogenes*; *S. epidermidis*; *S. haemolyticus*; *S. hyicus*; *S. sciuri*; *S. simulans*.

Identification of coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis by 16S rDNA sequencing

Abstract

Mastitis is a multifactorial disease, often of bacterial origin, and that affects cattle worldwide. The genus *Staphylococcus* contains at least 40 species and 17 subspecies and, under certain circumstances, several of these microorganisms are capable of causing mastitis. In herds that have achieved control of infectious agents, especially *S. aureus* and *Streptococcus agalactiae*, other *Staphylococcus* species have often been associated with mastitis in cattle. In this study a total of 63 coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis were submitted to 16S rDNA sequencing to identify isolates to the species level. We used primers that amplify a 536 bp product. The resulting sequences were compared to bacterial sequences deposited in NCBI database. The species identified were *S. chromogenes* (25), *S. sciuri* (10), *S. haemolyticus* (7), *S. epidermidis* (6), *S. simulans* (5), and *S. hyicus* (3). All species identified in this study have been previously identified in other studies on the etiology of staphylococcal mastitis. The identity of seven isolates was not determined, because the sequenced fragments aligned along its entire length (100%) with two or three different species deposited in NCBI database. The sequencing of a larger fragment of the same gene or another gene should be done to obtain definitive identification of these seven isolates.

Keywords: *Staphylococcus chromogenes*; *S. epidermidis*; *S. haemolyticus*; *S. hyicus*; *S. sciuri*; *S. simulans*.

Introdução

A mastite é uma doença multifatorial, que frequentemente tem origem bacteriana, e afeta rebanhos no mundo inteiro. Os principais microrganismos causadores de mastite pertencem aos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (QUINN et al., 1999). O gênero *Staphylococcus* contém pelo menos 40 espécies e 17 subespécies (BANNERMAN, 2003) e, sob determinadas circunstâncias, vários desses microrganismos são capazes de causar mastite. *S. aureus* é a espécie mais frequentemente isolada e mais extensivamente estudada. No entanto, em rebanhos que alcançaram um controle dos agentes contagiosos, especialmente *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*, as outras espécies de *Staphylococcus* têm sido frequentemente associadas à mastite em bovinos (RUEGG, 2009).

Apesar de serem reportadas em casos de mastite, a identificação das outras espécies de *Staphylococcus*, que não *S. aureus*, na maioria das vezes não é realizada, por ser muito trabalhosa e pouco acurada, principalmente se realizada por meio de testes bioquímicos de identificação. Portanto, a frequência e a importância das outras espécies de *Staphylococcus* em casos de mastite bovina no Brasil ainda não está esclarecida.

O conhecimento da epidemiologia e do impacto da mastite causada pelas diferentes espécies de *Staphylococcus* é importante para avaliar se medidas de controle espécie-específicas são necessárias, factíveis e economicamente viáveis. Para que as fontes de infecção, os mecanismos de transmissão e o impacto das diferentes espécies de *Staphylococcus* sejam determinados, é necessária a identificação acurada, em nível de espécie, desse grupo de microrganismos. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Staphylococcus* coagulase negativas isoladas de mastite bovina pelo sequenciamento do rDNA 16S.

Material e Métodos

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. Foram analisados 63 *Staphylococcus* spp. isolados de quartos mamários individuais de fêmeas bovinas oriundas de fazendas leiteiras dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro entre os anos de 1998 e 2002. As bactérias foram identificadas presuntivamente como *Staphylococcus* spp. coagulase negativos de acordo com as características das colônias em ágar-sangue (ágar tripticaseína de soja - TSA - adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado), morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e ausência de coagulase, de acordo com NMC (2004). Os microrganismos foram preservados a -20 °C e a -80 °C em meio de estoque apropriado.

A extração de DNA das culturas foi realizada de acordo com Rosec e Gigaud (2002). O DNA foi quantificado em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) e as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100 ng/μl). 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. As reações foram realizadas 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).

Os produtos obtidos de três reações de PCR 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 μM 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. As cepas-padrão utilizadas como controles da técnica foram *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.

Os pares de sequências foram editados e reunidos utilizando-se o software DNA Baser v3 (Heracle Biosoft, Germany). As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Resultados e Discussão

O sequenciamento do rDNA 16S confirmou a identificação das quatorze cepas padrão incluídas neste estudo. 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).

Dos 63 isolados submetidos ao sequenciamento, foram identificados 56 isolados, pertencentes às espécies *S. chromogenes* (25), *S. sciuri* (10), *S. haemolyticus* (7), *S. epidermidis* (6), *S. simulans* (5) e *S. hyicus* (3), todas isoladas com frequência de mastite bovina (Figura 1). Os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos descritos por Zadoks e Watts (2009), que analisaram resultados obtidos de oito diferentes estudos, realizados em sete países distribuídos em três continentes, e concluíram que as espécies de SCN mais comuns isoladas de leite bovino foram *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. epidermidis* e *S. xylosus*.

A identidade de sete isolados deste estudo não foi elucidada, pois o fragmento de 536 pb do rDNA 16S sequenciado alinhou em toda sua extensão (100%) com duas ou três espécies diferentes, indicando não ser discriminatório para estas espécies. Para se obter a identificação definitiva desses isolados deverá ser realizado novo sequenciamento de um fragmento maior do mesmo gene ou de outro gene.

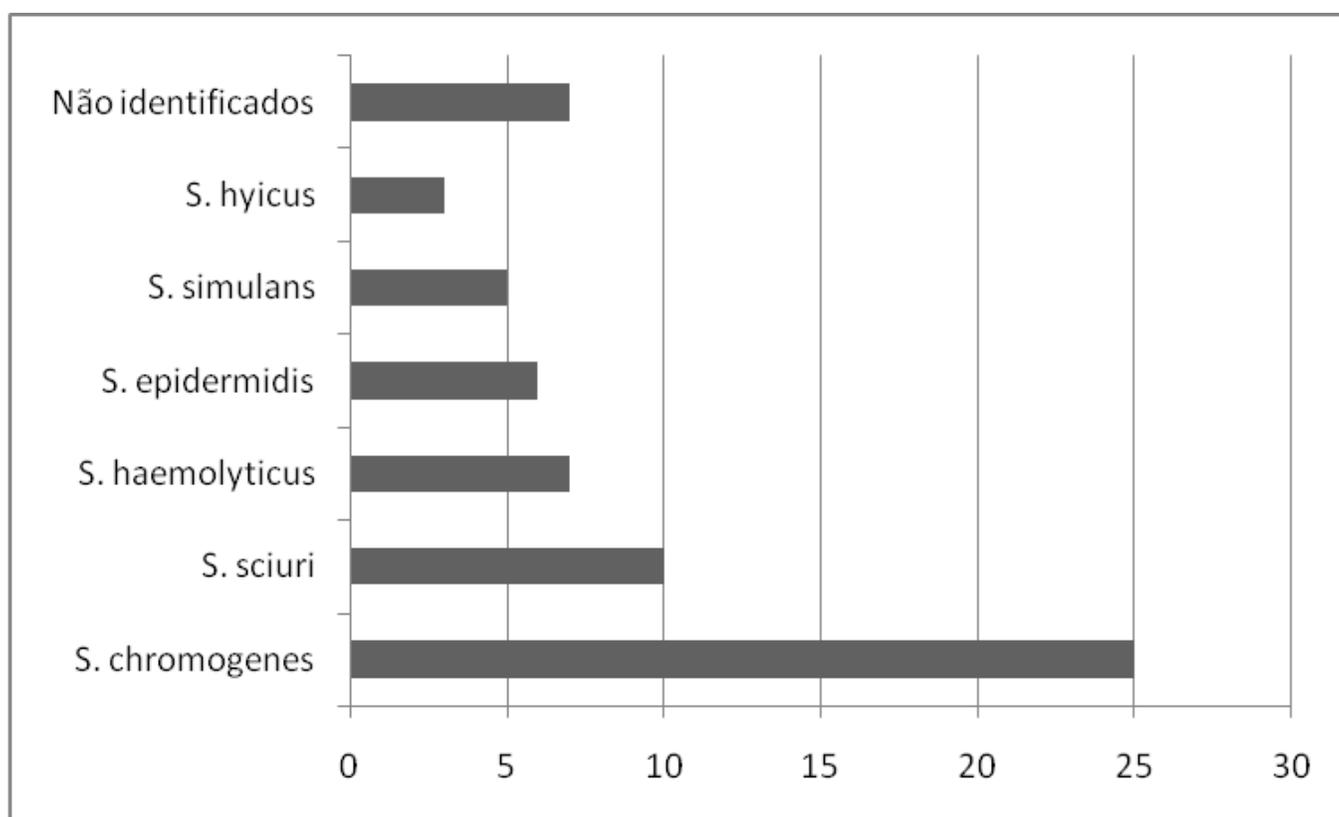


Figura 1. *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) isolados de mastite bovina em rebanhos dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro identificados neste estudo.

Conclusões

O sequenciamento parcial do gene rDNA 16S identificou 56 de 63 isolados (89%) de SCN analisados. Em sete casos (11%) não houve a identificação definitiva dos isolados, pois o fragmento de 536 pb do rDNA 16S sequenciado alinhou em toda sua extensão (100%) com duas ou três espécies diferentes, indicando não ser discriminatório para estas espécies. Para se obter a identificação definitiva desses isolados deverá ser realizado novo sequenciamento de um fragmento maior do mesmo gene ou de outro gene.

Agradecimentos

A Embrapa Gado de Leite, ao CNPq, e à Fapemig pelo apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

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.

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.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby, 1999. 648 p.

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, p.61-70, 2002.

RUEGG, P. L. The quest for the perfect test: Phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.15-19, 2009.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.20-28, 2009.