

Comunicado 153

Técnico

ISSN 1676-7675
Dezembro, 2015
Sobral, CE

Metodologia Científica
On-line

Diagnóstico de mastite subclínica caprina por meio da detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de RT-PCR

Jomar Patrício Monteiro¹
Viviane de Souza²

A mastite caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária, sendo na maioria das vezes de origem infecciosa (bactérias, fungos, leveduras). A mastite pode ainda ser classificada quanto à magnitude do processo inflamatório em clínica e subclínica.

Utiliza-se o teste da caneca telada ou de fundo escuro para observar a saúde do úbere dos animais e diagnosticar a mastite clínica, que se caracteriza por modificações visíveis no leite, como a presença de grumos de fibrina ou pus. Sendo assim, deverá ser feito diariamente o exame clínico da glândula mamária e a ordenha dos três primeiros jatos na caneca telada ou de fundo escuro e em seguida observar as características do leite. O exame clínico da glândula mamária deverá ser realizado por meio da inspeção e palpação das metades mamárias no momento da antisepsia dos tetos, na pré-ordenha, observando-se alterações como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor. As cabras com mastite clínica devem ser separadas do rebanho e tratadas, de acordo com as orientações de um médico veterinário.

A mastite subclínica, por sua vez, não apresenta sinais clínicos evidentes. O leite apresenta aspecto macroscópico normal, sem sinais visíveis de inflamação do úbere, podendo ser detectada

somente por provas indiretas no leite, como o diagnóstico microbiológico ou a comprovação do aumento do número de células somáticas.

O diagnóstico microbiológico, que é a pesquisa para o isolamento da bactéria (micro-organismo) que está causando a infecção, é muito importante para que o tratamento e o controle da doença obtenham sucesso. Isso porque a magnitude da enfermidade varia em função da severidade do quadro, da duração da infecção e do micro-organismo envolvido no processo (BRAMLEY et al., 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Espécies de estafilococos coagulase-negativos (ECN) estão sendo identificadas com maior frequência nos casos de mastite subclínica em caprinos (BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007). Entre essas espécies, as mais comumente isoladas em leite de cabra são: *S. epidermididis*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. caprae*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* (CONTRERAS et al., 1997), as quais podem causar infecções persistentes, que resultam em elevadas CCS, apresentando como principal consequência a redução da qualidade do leite (TAPONEM; PYÖRÄLÄ, 2009). Porém, estafilococos coagulase-positivos, como o *S. aureus* são de maior importância quando relacionadas à saúde pública, uma vez que as suas enterotoxinas

¹Biólogo, PhD em Biologia Avançada e Sanidade Animal, pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE

²Médica-veterinária, doutora em Medicina Veterinária Preventiva, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE

podem estar presentes no leite e/ou derivados, permanecendo estáveis e causando intoxicação alimentar (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Sendo assim, a caracterização molecular é ferramenta importante no diagnóstico desses micro-organismos, por apresentar elevada sensibilidade e especificidade, fornecendo subsídios a estudos epidemiológicos que permitirão a rastreabilidade de tais patógenos ao longo da cadeia produtiva do leite (PRATA et al., 2006; TANG; PERSING, 1999).

A presente publicação descreve os procedimentos necessários para a identificação e confirmação molecular de estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite subclínica, provenientes de amostras de leite de cabra, por meio da técnica de RT-PCR.

Coleta das amostras

As amostras individuais de leite das metades mamárias a serem analisadas deverão ser colhidas em tubos Falcon esterilizados de acordo com os procedimentos recomendados National Mastitis Council (OLIVER et al., 2004). Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) e o descarte dos primeiros jatos de leite, deverão ser colhidas cerca de 2 a 5 mL de leite, antes do início da ordenha. Iniciar a coleta do teto mais próximo (que foi higienizado por último), para evitar que ele se recontamine durante a coleta. As amostras deverão ser acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo gelo (temperatura 4-5°C) e mantidas nessas condições até serem entregues no laboratório.

Isolamento e identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp.

As amostras obtidas do leite provenientes das metades mamárias deverão ser semeadas diretamente em placas de petri, contendo ágar Baird-Parker com auxílio de alça de semeadura e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Em seguida, 3 a 5 colônias deverão ser semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas. Logo após, deverão ser preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram-positivos e agrupados sob a forma de cachos de uva deverão ser submetidas às provas de catalase, da coagulase livre e de produção de acetoína (VP).

Teste da catalase

Com uma alça bacteriológica flambada, deverá ser retirado do ágar nutriente uma quantidade de cultivo de *Staphylococcus* spp. a ser testado, e em seguida deverá ser realizado um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa, adicionando-se uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3% sobre os micro-organismos na lâmina. As estirpes que apresentarem imediato borbulhamento (liberação de gás) serão consideradas positivas (MAC FADDIN, 1976).

Teste da coagulase livre em tubo

Para a execução da prova de coagulase, com uma alça bacteriológica flambada, deverá ser retirado do ágar nutriente uma quantidade de cultivo de *Staphylococcus* spp. Esse cultivo deverá ser adicionado em um tubo contendo 3 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI) esterilizado, e incubado a 35°C por 24 horas. Em sequência deverá ser acrescentado, em tubos de ensaio (10 x 70 mm) autoclavados, 0,3 mL dessa cultura e 0,5 mL de plasma de coelho diluído a 1:5 em solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizada. Após agitação, os tubos deverão ser incubados em banho-maria a 37°C e as leituras deverão ser realizadas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas. As amostras que apresentarem coagulação do plasma serão consideradas positivas (GARCIA et al., 1980).

Teste de Voges-Proskauer

Para verificar a produção da acetoína a partir da glicose, com uma alça bacteriológica flambada, deverá ser retirada do ágar nutriente uma quantidade de cultivo de *Staphylococcus* spp. Esse cultivo deverá ser adicionado em um tubo contendo 5 mL de caldo de cultivo MRVP (Methyl-red Voges-Proskauer Broth) esterilizado e incubado à 37 °C por 48 horas. Em seguida, deverão ser adicionados 0,6 mL de uma solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barrit) em cada tubo. Após agitação, a leitura deverá ser efetuada, sendo considerados positivos os tubos em que a cultura apresentar coloração vermelha após 15 min (MAC FADDIN, 1976).

Caracterização molecular dos isolados

A caracterização molecular dos isolados deverá ser realizada em todas as estirpes que se apresentaram como cocos Gram-positivos, agrupados sob a forma de “cachos de uva” e que se mostraram positivas nos testes da catalase, da coagulase e de Voges-Proskauer.

Extração de DNA

Para a extração de DNA das estirpes isoladas, poderá ser utilizado o Kit Invitek®, – Extração de Material Genômico, que contém o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram-positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e colunas de purificação, conforme descrito abaixo:

Centrifugar 1,5 mL de cultura a ser testada, retirada do caldo BHI (37°C por 18 a 24 horas) a 11.000 xg por 3 min a 25°C. Em seguida, todo o sobrenadante deverá ser descartado em solução de hipoclorito de sódio.

O precipitado deverá ser ressuscitado em 400 µL de Ressuspension Buffer R, transferido para o Extration Tube L e incubado a 37 °C por 10 min, sob constante agitação. Posteriormente, a amostra deverá ser incubada a 65 °C por 10 min e, por fim, incubada a 95°C por 10 min sob constante agitação.

Adicionar à amostra 400 µL de Binding Buffer B6, homogeneizar e em seguida todo o conteúdo do Extration Tube L deverá ser transferido para o RTA Spin Filter Set, incubado à temperatura ambiente por 1 min e centrifugado a 11.000 xg por 1 min, descartando o filtrado.

Ao RTA Spin Filter Set adicionar 500 µL de Wash Buffer I. Em seguida a amostra deverá ser centrifugada a 11.000 xg por 1 min. O filtrado deverá ser descartado juntamente com o tubo, sendo que o RTA Spin Filter Set será colocado em um novo tubo RTA Receiver.

Ao RTA Spin Filter Set adicionar 600 µL de Wash Buffer II e posteriormente a amostra deverá ser centrifugada a 11.000 xg por 1 min. Após o descarte do filtrado, a amostra deverá ser novamente centrifugada para total eliminação do Wash Buffer II, a 11.000xg por 4 min, sendo o filtrado descartado juntamente com o tubo. O RTA Spin Filter Set deverá ser colocado em um RTA Receiver de 1,5 mL.

Ao RTA Spin Filter Set adicionar 200 µL do Elution Buffer D. A amostra deverá ser incubada à temperatura ambiente por 1 min, e em seguida, centrifugada a 11.000xg por 1 min. O filtrado contendo o material genético desejado deverá ser armazenado em freezer -20°C até o momento da utilização nas reações de PCR.



Foto: Viviane de Souza

Figura 1. Kit Invitek® – Extração de Material Genômico, com protocolo de extração de DNA para bactérias Gram-positivas.

PCR quantitativo

A confirmação molecular dos isolados de *S. aureus*, para a identificação da espécie, deverá ser feita a partir da amplificação de fragmentos de 108 bp de DNA cromossômico específico do *S. aureus* de acordo com o protocolo descrito por Martineau et al. (1998), com adaptações para PCR quantitativo. Reações de 25 µl deverão ser montadas utilizando os seguintes componentes: 50 ng de DNA (ou volume equivalente em água para controle negativo), 12,5 µl de 2x Fast Start Universal SYBR Green Master Mix (Roche, Sussex, UK), 0,4 µM de cada primer (Sa442 - 5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3' e Sa442-2 - 5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3') e água livre de nucleases. DNA extraído da cepa *S. aureus* ATCC 25923 poderá ser utilizado

como controle positivo. As amplificações deverão ser realizadas em um termociclador utilizando o seguinte programa: 95 °C por 10 min e 30 ciclos de 95 °C por 1 segundo e 55 °C por 30 segundos. Ao final do programa, todas as amplificações passarão por análise de curva de dissociação para detecção de dímero de primers. Produtos de PCR também poderão ser visualizados por transiluminação UV após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Sendo assim, 10 µL do

produto amplificado serão aplicados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo a uma concentração de 50 µL/L e submetido à corrida eletroforética a 120 V por 90 min. Utilizar marcador de peso molecular em escada de 100 pares de bases (pb), disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese, como padrão para o tamanho das bandas de DNA formadas. O tamanho dos segmentos amplificados será de 108 pb.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para identificação da espécie de *Staphylococcus aureus* e o respectivo tamanho do fragmento esperado.

Primers	Sequência	Tamanho do fragmento esperado - pares de bases
Sa442-1	5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG-3'	108
Sa442-2	5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA-3'	

Fonte: Martineau et al. (1998).



Figura 2. Exemplo de um resultado da amplificação do fragmento de 108 pb específico para *S. aureus* (amostras 1 e 31) após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M: marcador molecular em escada de 100 pb, C+: ATCC 25923, C-: controle negativo.

Referências

- BERGONIER, D.; DE CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, Paris, v. 34, n. 5, p.689-716, Oct. 2003.
- BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO, L. M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4th, ed. Madison: National Mastitis Council, 1998. 64 p.
- CONTRERAS, A.; CORRALES, J. C.; SANCHES, A.; SIERRA, D. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **Journal of Dairy Science**, Chanpaign, v. 80, n. 11, p. 2815-2819, 1997.
- CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n.1, p. 145-153, 2007.
- FAGUNDES, H. OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1315-1320, jul./ago. 2004.
- GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 584-553, Mar. 1980.
- MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1976. 312 p.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 618-623, Mar. 1998.
- OLIVER, S. P.; HOGAN, J. S.; JAYARAO, B. M.; OWENS, W. E. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4th. Verona, WI: National Mastitis Council, 2004. 47 p.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Campinas: Westfalia Landtechnik do Brasil: Milkbizz, 2002. 188 p.
- PRATA, M. C. A.; BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; OLIVEIRA, V.M.; SOUZA, G. N.; LANGE, C. C.; RIBEIRO, A. C. C. L.; CARVALHO, A.C.; ARCURI, E.F.; SILVA, M.R.; FARIA, C.G. Saúde Animal. In: SANTOS, C. A. dos; CARVALHO, L. de A.; CAMPOS, O. F. de; ARCURI, P. B. (Ed.). **Embrapa Gado de Leite: 30 anos de pesquisa e conquistas para o Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006. p.103-122.
- TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington, DC: ASM Press,1999. Cap. 13, p. 215-244.
- TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis: Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n.1/2, p. 29-36, Feb. 2009.

Comunicado Técnico, 153

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Caprinos e Ovinos**

Endereço: Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4. Caixa Postal 145. CEP 62010-970. Sobral - CE.

Fone: (88) 3112-7400

Fax: (88) 3112-7455

SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

On-line (2015)

CGPE 12858

Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

Comitê de Publicações

Presidente: Vinícius Pereira Guimarães
Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho
Membros: Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Ana Maria Bezerra Oliveira Lôbo, Carlos José Mendes Vasconcelos, Diões Oliveira Santos, Maira Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Tânia Maria Chaves Campelo, Viviane de Souza.

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho
Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos
Normalização: Tânia Maria Chaves Campelo
Editoração eletrônica: Maira Vergne Dias