

Marisa Araújo Silva

**UTILIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA O DIAGNÓSTICO
ETIOLÓGICO DA MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo da Silva

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2008**

S586u Silva, Marisa Araújo, 1982-
Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite
bovina / Marisa Araújo Silva. – 2008.
32 p. : il.

Orientador: Nivaldo da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Mastite – Diagnóstico – Teses.
3. Leite – Análise – Teses. I. Silva, Nivaldo da. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo.

Aos meus irmãos pela amizade, amor e companheirismo.

Ao Prof. Nivaldo da Silva, pela orientação, respeito e confiança em meu trabalho.

A todos os colegas de laboratório pelo convívio, respeito, trabalho e oportunidades,

À Embrapa Gado de Leite, Universidade Federal de Lavras e Hospital das Clínicas da UFMG pelas amostras cedidas.

As minhas queridas amigas Lívia e Telma pelos momentos de descontração e apoio durante toda essa trajetória, fazendo Belo Horizonte mais feliz.

Aos meus amigos André Bidart e Renata Mendes pelo companheirismo, por estarem sempre ao meu lado, apoiando e incentivando.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	10
2.1. Importância econômica	10
2.2. Caracterização da doença.....	10
2.3. Microrganismos mais envolvidos	11
2.3.1 <i>S. aureus</i> resistente à metilina.....	12
2.4. Controle	12
2.5. Diagnóstico do agente etiológico.....	13
2.5.1 Diagnóstico bacteriológico.....	13
2.5.1.1 Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.5.1.2 Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina	14
2.5.1.3 Identificação das espécies do gênero <i>Streptococcus</i>	15
2.5.2 Diagnóstico molecular	15
2.5.2.1 PCR Multiplex.....	15
2.5.2.2 PCR-ribotipagem	16
2.5.2.3 Detecção de microrganismos no leite	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local de realização do experimento.....	17
3.2 Amostras bacterianas.....	17
3.3 Plano de execução do experimento	17
3.4 PCR	18
3.4.1 <i>Primers</i>	18
3.4.2 Extração de DNA	18
3.4.2.1 Extração de DNA a partir de amostras de bactérias de referência em cultura pura.....	18
3.4.2.2 Extração de DNA a partir de amostras de bactérias de referência em leite artificialmente contaminadas.....	19
3.4.2.3 Extração de DNA a partir de amostras de leite de tanque de expansão	19
3.4.3 Padronização das PCRs	19
3.4.3.1 Padronização da PCR individual com DNA obtido a partir de amostras de bactérias de referência em cultura pura.....	19
3.4.3.2 Padronização de PCR multiplex com DNA obtido a partir de amostras de bactérias de referência em cultura pura.....	19
3.4.3.2.1 PCR Multiplex para detecção de microrganismos a partir das amostras de leite de tanque de expansão	20
3.4.4 Avaliação da especificidade	20
4. RESULTADOS	20
4.1 Otimização da PCR individual.....	20
4.2 Otimização da PCR Multiplex.....	20
4.3 Especificidade dos <i>primers</i>	20
4.4 Sensibilidade da PCR a partir de culturas puras.....	21
4.5 Sensibilidade da PCR a partir de amostras do leite.....	21

4.6	Testes em amostras de leite de tanque de expansão	24
5.	DISCUSSÃO	26
6.	CONCLUSÕES	28
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
LISTA DE QUADROS		
Quadro I	Testes bioquímicos tradicionalmente empregados para separar as espécies <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus</i> spp. do ambiente	15
Quadro II	Plano de execução do experimento	17
Quadro III	<i>Primers</i> utilizados	18
LISTA DE TABELA		
Tabela 1	Resultados obtidos das amostras de tanque de expansão	26
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1	Fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir de culturas puras de <i>S. aureus</i> e <i>Streptococcus</i> spp	21
Figura 2	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de <i>S. agalactiae</i> (270 pb), visualizados em gel de agarose 2%	22
Figura 3	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de <i>S. dysgalactiae</i> (264 pb), visualizados em gel de agarose 2%	22
Figura 4	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de <i>S. uberis</i> (330 pb), visualizados em gel de agarose 2%	23
Figura 5	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de <i>S. aureus</i> (900 pb, 420 pb, 200 pb), visualizados em gel de agarose 2%	23
Figura 6	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de MRSA (533 pb), visualizados em gel de agarose 2%	24
Figura 7	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de leite de tanque de expansão, visualizados em gel de agarose 2%	24
Figura 8	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de leite de tanque de expansão, visualizados em gel de agarose 2%	25
Figura 9	Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de leite de tanque de expansão, visualizados em gel de agarose 2%	25

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
CCS	Contagem de Células Somáticas
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente à Meticilina
mPCR	Reação em cadeia da polimerase multiplex
PBP	Penicillin-binding protein
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SCC <i>mec</i>	<i>Staphylococcus cassette chromosome</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
PB	Pares de Base

RESUMO

O controle eficiente da mastite requer teste sensível, rápido e específico para identificação do agente causador da doença. Testes moleculares como a PCR têm sido crescentemente utilizados em diagnósticos microbiológicos. Neste trabalho foi utilizado um protocolo de extração de DNA diretamente em amostras de leite e a utilização de uma PCR multiplex (mPCR) para identificação dos principais agentes da mastite bovina: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* e do patógeno emergente: *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA). Foram realizados testes com leite artificialmente contaminado com concentração bacteriana conhecida e posteriormente, para validação da técnica, foram analisadas 30 amostras oriundas de leite de tanque de expansão recebidas pelo Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG - MAPA. Para a realização das PCRs foram utilizados iniciadores que amplificam a região 16S-23S do RNA ribossomal de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae* e, para detecção de MRSA, utilizou-se iniciadores que amplificam o gene *Mec A*. Os iniciadores foram específicos, não havendo amplificação de DNA de outras bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. comumente encontradas no leite. O limite de detecção dos microrganismos envolvidos em infecções de glândula mamária é 10^3 UFC/mL por mPCR, o que demonstra a alta sensibilidade do método para o diagnóstico etiológico de mastite bovina.

Palavras chave: Mastite bovina; PCR multiplex, Leite; diagnóstico etiológico; *Streptococcus*; *Staphylococcus*.

ABSTRACT

Efficient control for mastitis requires sensitive, fast and specific tests to identify the agents that cause the disease. Molecular tests as the PCR have been used in microbiological diagnostics. This study was used a protocol for extraction of DNA directly in samples of milk and use of a multiplex PCR (mPCR) to identify the main agents of bovine mastitis: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* and the pathogen *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA). Tests have been carried out on milk artificially contaminated with bacteria known concentration. The validation of the technique, 30 samples from bulk milk tank available from the Milk Quality Lab Analysis - LabUFMG - MAPA. To carry out the PCRs were used primers that amplify the region 16S-23S ribosomal RNA of *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis* and *S. dysgalactiae*, and for detection of MRSA, primers used to amplify the gene that *Mec A*. The primers were specific, no amplification of DNA from other bacteria of the genus *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. commonly found in milk. The limit of detection of microorganisms involved in infections of the mammary gland is 10^3 CFU/ mL by mPCR, mPCR has showed as sensitivity method for the detection pathogens in bovine milk mastitis.

Key words: Mastitis; PCR multiplex; milk; etiologic diagnosis; *Streptococcus*; *Staphylococcus*.

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária.

Estima-se que, anualmente, as perdas mundiais devido à mastite aproximam-se de 35 bilhões de dólares. Nos Estados Unidos, o custo anual da mastite tem sido estimado em 1,5 a 2,0 bilhões de dólares, enquanto que as perdas de produção de leite, devido a mastite subclínica, e custos de reposição associados à alta contagem de células somáticas (SCCs) foi estimado em 960 milhões de dólares.

A etiologia da mastite é complexa e multifatorial. A doença pode resultar de um trauma ou injúria do úbere, irritação química ou a partir de uma infecção causada por diferentes microrganismos, principalmente as espécies bacterianas.

Vários são os agentes etiológicos da mastite bovina, sendo 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, onde se observa a predominância de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Diante desta diversidade de agentes causadores, o diagnóstico etiológico é fundamental para estabelecer as estratégias de controle e prevenção e monitoramento de rebanhos. Essas medidas devem ser tomadas com maior rapidez possível para obter sua maior eficiência.

Tendo em vista a importância do diagnóstico etiológico como forma de controle da doença, este trabalho teve como objetivo validar a PCR Multiplex como teste diagnóstico capaz de detectar *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* diretamente a partir de amostras de leite de vacas com mastite.

Espera-se que estes resultados contribuam para um diagnóstico etiológico rápido, de baixo custo e eficiente para controle da mastite bovina.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Importância econômica

Mastite é a doença infecciosa mais comum que afeta as vacas leiteiras e a que proporciona as maiores perdas econômicas para o setor leiteiro, tanto por sua alta frequência, quanto pelos aspectos econômicos a ela relacionados (Phuektes et al., 2001; Silva, 2003; Silva e Silva, 2005).

Pesquisas têm demonstrado que cada quarto infectado por um patógeno primário produz aproximadamente 727 Kg a menos de leite por lactação do que os quartos não infectados (Santos, 2004). Estima-se que no Brasil, em função da alta prevalência de mastites nos rebanhos, ocorra perda de produção entre 12 e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 20 bilhões de litros (Fagundes e Oliveira, 2004).

Além da redução da quantidade de leite produzido, há ainda redução da qualidade do leite e derivados, descarte prematuro de animais acometidos, aumento dos custos com drogas, serviços veterinários e mão de obra (Dias, 2007), o que pode gerar mais de 25% de todas as perdas econômicas relacionadas às doenças do gado leiteiro (Santos, 2004). No Brasil, o prejuízo anual de uma vaca com mastite subclínica é de aproximadamente 330,00 dólares, superior aos EUA, que assinala perdas de 200 dólares/vaca/ano (Langoni et al., 1999).

2.2. Caracterização da doença

A inflamação da glândula mamária pode ser classificada como mastite subclínica ou clínica. As mastites clínicas caracterizam-se por leite visivelmente anormal, e pela evidência de graus variáveis de inflamação do úbere (rubor, tumefação, calor, dor). Já nas formas subclínicas, que correspondem

a 70% das mastites bovinas, não há sinais visíveis de inflamação no úbere e o leite tem aspecto macroscópico normal, embora sua composição esteja alterada (diminuição na gordura, lactose, caseína, cálcio e fósforo) e microrganismos possam ser isolados do mesmo (Reis et al., 2003; Silva, 2003).

Geralmente, os cálculos das perdas econômicas baseiam-se principalmente na perda imediata causada pela mastite clínica, como redução transitente da produção, descarte prematuro do animal (7%) e morte (1%). Sabe-se, entretanto, que nas infecções subclínicas, os prejuízos são maiores, levando-se em consideração a sua freqüência nos rebanhos e a longa persistência inaparente de infecções (Ruegg, 2001; Dias, 2007).

A contínua ação irritante de microrganismos sobre a mucosa, durante uma ou várias lactações, provoca perda progressiva do epitélio secretor, reduzindo a produção láctea (Dias, 2007). Em revisão, Langenegger (1981) relatou que as perdas por mastite subclínica causada por *S. aureus* causam três vezes mais prejuízos que a mastite clínica. Busato et al. (2000) afirmam que os prejuízos acarretados pela mastite correspondem a 25% de todas as doenças de importância econômica e, que a mastite clínica representa 18% do prejuízo total, por causar morte ou descarte prematuro; a redução na produção total é representada principalmente pela mastite subclínica (82%). Além do comprometimento da qualidade do leite.

2.3. Microrganismos mais envolvidos

A mastite pode ser causada por mais de 137 microrganismos, que são classificados como patógenos contagiosos ou ambientais de acordo com o reservatório primário e o modo de transmissão. Os patógenos contagiosos são os que se disseminam de um quarto infectado para outro durante o processo de ordenha e o reservatório primário é o próprio animal, dentre eles se destacam o *S. agalactiae*, *S. aureus* e *Corynebacterium bovis*. Os microrganismos denominados ambientais estão presentes no ambiente, principalmente nas fezes,

cama e solo e são adquiridos principalmente nos intervalos da ordenha, os mais comuns são *Escherichia coli*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* (Leigh, 1999; Riffon et al., 2001; Silva, 2003; Santos, 2004).

Dentre os microrganismos bacterianos, predominam as mastites causadas por *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*, que produzem em média 90 a 95% das infecções intramamárias dos rebanhos leiteiros (Reis et al., 2003; Silva, 2003; Cremonesi et al., 2005).

Brito et al. (1998) realizaram exames microbiológicos de 6315 amostras de leite, originadas de 48 rebanhos localizados em Minas Gerais, e encontraram 19,2% de *S. aureus*, 12,4% de *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, 6,9% *S. agalactiae*, 4,0% de *Streptococcus* sp. esculina positivos, 2,1% de *Streptococcus* sp. esculina negativos. *S. aureus* foi isolado de 47 rebanhos, 37 deles com até 20% dos quartos infectados. *S. agalactiae* foi isolado em 29 rebanhos (60%) e em 24 deles a média de quartos infectados foi de 3,6%.

Pereira et al. (2007) estudaram 31 rebanhos leiteiros localizados na região sul do Estado de Minas Gerais, de 1272 amostras coletadas para exame microbiológico, isolou-se 35,57% de *Staphylococcus* coagulase positivo, 21,33% de *S. agalactiae*, 15,53% de Diferóides, 7,37% de *Staphylococcus* coagulase negativos, 5,51% de *S. uberis*.

Em Alta Mogiana, São Paulo, Nader Filho et al. (2004) isolaram de 200 casos clínicos de mastite em vacas lactantes, *Staphylococcus* spp. 41% e *Streptococcus* spp 18,5%.

Em Pernambuco, Mota et al. (2004), de 294 amostras provenientes de animais com mastite subclínica, 240 (81,63%) foram positivas ao exame microbiológico, destas os principais agentes isolados foram: *Staphylococcus* spp (52,16%, sendo 11,6% *S. aureus*), *Streptococcus* spp (15,11%) e *Corynebacterium* spp (13,31%). Freitas et al (2005) também em Pernambuco tiveram os seguintes resultados, de 477 vacas com

mastite isolou-se 13,6% de *S. aureus* e 3,8% se *Streptococcus* spp.

Muitas vezes, o diagnóstico do agente causador da mastite bovina e os testes de sensibilidade aos antibióticos são negligenciados; e a contínua pressão seletiva resultante do uso intensivo de antibióticos para limitar a disseminação bacteriana produz linhagens resistentes e o aparecimento de genes de resistência entre os microrganismos patogênicos (Pérez-Roth et al., 2001; Cuteri et al., 2004; Goñi e Vergana, 2004).

Nas últimas décadas, tem-se observado a emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos, dentre os quais se destaca a espécie *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA – Methicillin-Resistant *S. aureus*). Essas linhagens não são comumente encontradas em animais, entretanto, nos dois últimos anos, houve registros de aumento de casos de infecções em animais domésticos (Rich et al., 2005; O'Mahony et al., 2005; Middleton et al., 2005), sugerindo que as infecções mamárias por MRSA em bovinos leiteiros são problemas no campo (Lee et al., 2004).

2.3.1. *S. aureus* resistente à meticilina

MRSA foi primeiramente reportado em 1961 no Reino Unido e em meados dos anos 70 tornou-se endêmico em muitos países (Lee, 2003). Inicialmente, as infecções constituíam-se primariamente, num problema hospitalar, recentemente, elas têm se estabelecido em comunidades sem risco identificável (Jones et al., 2002; Lee, 2003) e a transmissão por alimentos é possível (Jones et al., 2002). Em animais o isolamento de MRSA foi primeiramente reportado por Devriese et al. (1972) a partir de leite de vacas mamáticas.

Essas bactérias são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (Tonin, 2003; Lee et al., 2004). O tipo de resistência do MRSA é denominado de resistência intrínseca, uma vez que não é devido à destruição do

antibiótico por β lactamases e sim por modificações na estrutura-alvo do antimicrobiano. A base molecular da resistência a meticilina é a síntese de uma PBP (Penicillin-binding protein) adicional, referida como PBP2a ou PBP2' (Braoios, 2005).

As PBPs possuem função de peptidoglicano-transpeptidases e funcionam como ligases na região pentaglicil transpeptidação, ou seja, atuam na "montagem" final do peptidoglicano da parede bacteriana. As PBPs têm afinidade por antibióticos β lactâmicos, aos quais se ligam covalentemente inibindo a transpeptidação, resultando assim na inibição da etapa final da síntese do peptidoglicano. Amostras de *Staphylococcus* spp sensíveis à meticilina apresentam cinco PBPs: PBP1, PBP2, PBP3, PBP3' e PBP4, alguns autores desconsideram a PBP3' (Braoios, 2005). As PBP2a produzidas por MRSA caracterizam-se pela baixa afinidade à maioria dos antibióticos β lactâmicos (Braoios, 2005; Metan et al., 2005; Santos et al., 2005).

A PBP2a é codificada cromossomicamente pelo gene *mecA*, gene exógeno, localizado em um elemento móvel designado *Staphylococcus cassette chromosome (SCCmec)* que não tem equivalente alélico em amostras sensíveis à meticilina (Hiramatsu et al., 2002). Estudos epidemiológicos e genéticos sugerem os estafilococos coagulase-negativos como doadores do gene exógeno (Coelho et al., 2002; Tonin, 2003; Braoios, 2005).

Os MRSA representam um problema cosmopolita, sendo o controle de sua disseminação um importante desafio.

2.4. Controle

De acordo com o Conselho Nacional de Mastite dos EUA, rebanhos leiteiros que não adotam medidas de controle para mastite apresentam cerca de 50% das vacas infectadas, em média, em dois quartos (NMC, 1996). As estimativas brasileiras apontam valores de até 73% para a prevalência da doença em rebanhos dos

estados de Minas Gerais e São Paulo (Costa et al., 1995).

Em todo o mundo, fazendeiros têm alcançado grande sucesso na redução da incidência da mastite contagiosa com a adoção de cinco princípios básicos do controle da mastite: desinfecção do teto após ordenha, terapia da vaca seca, tratamento apropriado nos casos clínicos, descarte de animais cronicamente infectados e manutenção regular da ordenhadeira mecânica (Ruegg, 2001; Silva, 2003). A adoção destas práticas tem reduzido as infecções causadas por *S. aureus* e *S. agalactiae*; estima-se que esses agentes hoje sejam responsáveis por menos de um terço de todos os casos de mastites, que há vinte anos atrás eram responsáveis por 75% (Ruegg, 2001).

A maioria dos rebanhos que adotaram com sucesso essas estratégias de controle experimentou redução na mastite subclínica e redução na contagem de células somáticas tanto no tanque de expansão como nas vacas individualmente, entretanto o mesmo não foi observado para as mastites ambientais (Ruegg, 2001; Reis et al., 2003; Silva, 2003).

Para reduzir o risco da presença de microrganismos indesejáveis no leite cru são necessárias medidas para diminuir a prevalência das infecções intramamárias, daí a importância de se conhecer quais os agentes patogênicos presentes nos rebanhos (Ruegg e Reinemann, 2002).

2.5. Diagnóstico do agente etiológico

A correta identificação das espécies bacterianas que causam a mastite bovina é de importância não apenas no aspecto clínico, mas também no biotecnológico, epidemiológicos e em estudos ambientais. Esses conhecimentos podem ajudar no desenvolvimento de estratégias preventivas, indicando formas de tratamento do animal durante a lactação, descarte ou servir de base para a administração do tratamento seletivo no período seco (Reis et al., 2003; Zschöck et al., 2004).

O alto investimento no tratamento da mastite e o risco de recorrer a terapias inadequadas, ou ainda, desenvolver resistência bacteriana, tornam necessário um diagnóstico preciso (Ristow et al., 2006).

Existem diversos métodos de diagnóstico para a discriminação de microrganismos em gêneros, espécies e estirpes, que podem ser divididos em fenotípicos e genotípicos. As análises fenotípicas dependem da expressão de fatores biológicos da célula tais como, a produção de enzima, utilização de nutrientes, produtos finais do metabolismo e susceptibilidade a agentes químicos. Destas abordagens fisiológicas, poucas são úteis na 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 (Silva e Silva, 2005).

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 (Silva e Silva, 2005).

2.5.1. Diagnóstico bacteriológico

Os métodos comumente utilizados para diagnóstico etiológico dos casos de mastite se baseiam na cultura bacteriológica, através do isolamento e identificação das bactérias por técnicas bioquímicas. Esses métodos são limitados pela baixa sensibilidade e crescimento lento ou inviável do microrganismo. Além disso, vacas subclínicamente infectadas podem eliminar intermitentemente o patógeno. Desta forma, a cultura feita a partir do leite pode não revelar qual microrganismo verdadeiramente causador da doença naquele rebanho. Culturas negativas também podem ocorrer quando resíduos de antibióticos estão presentes na amostra, inibindo o crescimento microbiano. A

presença de leucócitos e alta contagem de células somáticas no leite também têm um potencial de inibição do crescimento (Phuerktes et al., 2001; Cremonesi et al., 2005).

A cultura tem grande valor quando aplicada para focar um programa de controle específico, detectar a presença de um patógeno novo ou emergente, avaliar a eficiência do tratamento ou estabelecer padrões de suscetibilidade para auxiliar no desenvolvimento de uma estratégia de tratamento racional. Mas o sucesso do programa de cultura varia dependendo do tipo de organismo, metodologia de coleta de amostra e procedimentos laboratoriais (Ruegg e Reinemann, 2002). Segundo estes autores, as amostras de leite composto (pool de vários animais) são frequentemente usadas para reduzir o custo do teste. A sensibilidade relativa da cultura bacteriológica de uma única amostra composta usada para detectar *S. aureus* tem sido estimada de 63%. Essa sensibilidade aumenta com o aumento do número de glândulas infectadas por vaca. Usando várias amostras compostas pode-se aumentar a sensibilidade. A probabilidade de obter uma amostra negativa a partir de uma vaca com no mínimo uma glândula infectada pode diminuir de 37% (uma amostra composta) para 14% (duas amostras consecutivas) para 5% (três amostras consecutivas).

O uso de amostragens consecutivas é considerado de alto custo, entretanto, a falha em identificar vacas infectadas em um rebanho com moderada ou baixa prevalência da mastite contagiosa permite que a fonte de infecção permaneça dentro do rebanho (Ruegg e Reinemann, 2002).

2.5.1.1. Identificação de *Staphylococcus aureus*

Na rotina laboratorial para a identificação de *S. aureus*, utiliza-se teste da coagulase em tubo, teste de term nuclease, produção de acetoina, fermentação aeróbica da sacarose, D-manose, D-manitol, D-celobiose, D-xilose, D-trealose, maltose, L-arabionose e rafinose (Quinn et al., 1995).

Entretanto, estes não são suficientes para uma caracterização definitiva (Vieira-da-Motta et al., 2001).

A produção de coagulase ainda é o teste mais tradicional para a identificação de *S. aureus*. Apesar do papel da coagulase na infecção intramamária ainda ser incerto, sabe-se que a maioria das linhagens de *S. aureus* isoladas de infecções é coagulase positiva (Tonin, 2003; Silva e Silva, 2005). O teste da coagulase em tubo é o teste fenotípico padrão na rotina, porém, vários pesquisadores asseguram que a análise molecular é mais acurada e alertam para o risco de possíveis erros no diagnóstico com o uso do referido teste (Vieira-da-Motta et al., 2001).

2.5.1.2. Identificação de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

Na rotina microbiológica, o diagnóstico para MRSA é baseado nas características fenotípicas. A técnica de difusão em ágar com discos de oxacilina é a mais usada. O NCCLS (2000) recomenda a utilização do ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina, o Screen agar, para confirmação de resistência à metilina (Lee et al., 2004; Braoios, 2005; Metan et al., 2005).

Entretanto, a expressão fenotípica de resistência à metilina é frequentemente heterogênea e os métodos fenotípicos podem falhar na detecção desta resistência, uma vez que, a expressão fenotípica pode ser influenciada pelas condições de cultivo, como temperatura, pH e concentração de NaCl do meio. Como consequência, amostras com baixos níveis de resistência podem não ser detectadas, uma vez que duas subpopulações podem co-existir na mesma cultura e nem todas as células, apesar de possuírem a informação genética, expressam *in vitro* o fenótipo de resistência. A distinção entre as cepas hiperprodutoras de penicilinase e cepas verdadeiramente resistentes à metilina (*MecA* positiva) é problemática (Braoios, 2005). E muitas bactérias resistentes a metilina podem ser inicialmente susceptíveis a essa droga (Lee et al., 2004).

O padrão ouro para o diagnóstico dessa espécie é a detecção do gene *MecA* (Lee et al., 2004; Braoios, 2005; Metan et al., 2005).

2.5.1.3. Identificação das espécies do gênero *Streptococcus*

Os testes tradicionalmente empregados para separar as espécies de *Streptococcus*

do ambiente e *S. agalactiae* estão descritos no quadro I. Esse esquema é bastante utilizado, no entanto não permite diferenciar as espécies envolvidas nem classificar corretamente os gêneros destes microrganismos (Reis et al., 2003).

Quadro I: Testes bioquímicos tradicionalmente empregados para separar as espécies *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus* do ambiente

Espécie	Hemólise	Trealose	Sorbitol	Lactose	Inulina	Hipurato	Esculina	CAMP
<i>S. agalactiae</i>	beta	+	-	+	-	+	-	+
<i>S. dysgalactiae</i>	alfa	+	+/-	+	-	-	-	-
<i>S. uberis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+/-
<i>S. bovis</i>	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>S. zooepidemicus</i>	beta	-	+	+	-	-	-	-

CAMP: Christie, Atkis e Munch-Peterson (Quinn et al., 1994)

2.5.2. Diagnóstico molecular

Com a finalidade de se obter técnicas acuradas, rápidas e específicas para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da mastite bovina, métodos moleculares têm sido crescentemente utilizados em diagnósticos microbiológicos (Zschöck et al., 2004).

A PCR apresenta vantagens em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico: maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias inviáveis (proveniente de amostras inadequadamente preservadas) e que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (Martinez et al., 2001; Phuerktes et al., 2001).

Na literatura encontram-se vários trabalhos que utilizaram a PCR e suas variantes para detecção, identificação e estudos epidemiológicos de diferentes

microrganismos, dentre elas a PCR Multiplex (Pérez-Roth et al., 2001; Phuektes et al., 2001; Tamarapu et al., 2001; Ramesh et al., 2002; Phuektes et al., 2003; Cremonesei et al., 2005) e PCR de ribotipagem (Forsman et al., 1997; Martinez et al., 2001; Meiri-Bendek et al., 2002; Hassan et al., 2002; Tonin, 2003; Cremonesi et al., 2005).

2.5.2.1. PCR Multiplex

A PCR Multiplex (mPCR) é uma variação da PCR convencional empregada de maneira crescente nos últimos anos. Utilizando mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilita a amplificação simultânea de mais de uma seqüência de DNA e que mais de uma espécie bacteriana possa ser identificada através da mesma PCR, promovendo uma análise mais ampla, mais rápida e mais barata (Phuerktes et al., 2001; Gandra, 2006). Desde sua introdução, a mPCR tem sido aplicada com sucesso em muitas áreas de diagnóstico de DNA, incluindo análise de deleção, mutação e

polimorfismo, análise quantitativa e detecção de RNA.

2.5.2.2. PCR-ribotipagem

A PCR-ribotipagem é uma técnica amplamente utilizada em estudos epidemiológicos, esse método foi desenvolvido para permitir a amplificação de regiões polimórficas do espaçador intergênico da região 16S-23S do RNA ribossomal (Tonin, 2003). Essa região não é funcional e conseqüentemente sofre a mínima pressão seletiva. Sua taxa de evolução é dez vezes menor que o ribossomo 16rDNA, seqüência rotineiramente usada para estudos filogenéticos de bactérias (Forsman et al., 1997).

Quando empregados *primers* universais a PCR-ribotipagem pode ser utilizada para várias espécies de microrganismos, mas quando se aplica *primers* espécie-específicos o método serve tanto para se diagnosticar a bactéria alvo como para tipificar o microrganismo (Tonin, 2003).

A técnica de PCR associada à ribotipagem tem-se mostrado bastante útil para esta finalidade, devido à sensibilidade e rapidez, possibilitando o monitoramento de cepas e o estudo taxonômico molecular (Fagundes e Oliveira, 2004).

2.5.2.3. Detecção de microrganismos no leite

A maioria dos métodos de PCR empregados para a detecção de microrganismos no leite ou em outras amostras orgânicas necessita de enriquecimento em meio de cultura previamente à extração (Phuekts et al., 2001; Riffon et al., 2001; Gandra, 2006). A detecção direta de patógenos bacterianos em amostras lácteas é um trabalho difícil devido à presença de substâncias inibidoras da PCR freqüentemente associadas ao meio de enriquecimento, reagentes de isolamento de DNA e a própria matriz do alimento, adicionalmente composta da

microflora indígena (Ramesh et al., 2002; Cremonesi et al., 2005).

Na literatura existem citações sobre o desenvolvimento de metodologias que não empregam o enriquecimento previamente à extração de DNA total. Várias delas obtiveram êxito no seu propósito. Como Romero e Lopez-Goni (1999), que testaram diferentes métodos de extração para DNA bacteriano a partir de leite bovino para melhorar a detecção direta de *Brucella* por PCR. Usando um tampão de lise com concentrações altas de Tris, EDTA e NaCl, e altas concentrações de SDS e proteinase K associadas a alta temperatura de incubação, conseguiu-se um limite de detecção de 5 a 50 UFC/mL.

Tamaparu et al. (2000) através de um procedimento de extração com solventes, etanol, hidróxido de amônio concentrado e éter petróleo, conseguiram amplificar em uma reação multiplex com dois pares de *primers*, DNA de *S. aureus* obtido a partir de 10 mL de leite artificialmente contaminado com 10 UFC/mL.

Martinez et al. (2001) na PCR desenvolvida por eles para a detecção de *S. agalactiae* em leite artificialmente contaminado conseguiram um limite de detecção de 100UFC/mL, o processo de extração empregado utilizou SDS, Triton X e Pronase.

Ramesh et al. (2002) conseguiram um limite de detecção de 10^3 UFC/mL individualmente e de 10^4 UFC/mL simultaneamente para *S. aureus* e *Y. enterocolitica* em uma reação multiplex com dois pares de *primers*, utilizando a combinação de solventes orgânicos, detergentes e alcalis no método de extração.

Meiri-Bendek et al. (2002) utilizaram Tris-EDTA para remover os inibidores de PCR presente no leite. No processo de lise foi utilizado lisozima e proteinase K. Os resultados obtidos foram um limite de detecção de 10^4 e 10^5 UFC/mL sem enriquecimento e 1 UFC/mL com enriquecimento.

Entretanto, ainda há necessidade de melhoria na etapa de extração, para reduzir os fatores inibidores da PCR (Ramesh et al., 2002), permitir a detecção de limites inferiores ao obtidos até agora (Gandra, 2006) e ser aplicável em laboratórios de rotina (Zanini et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

O trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas e Diagnóstico de Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2. Amostras bacterianas

Foram utilizadas amostras padrão de *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. intermedius* 08/ 96PE-FUNED,

isolados clínicos a partir de vacas mamílicas de *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *S. bovis* cedidos pela EMBRAPA Gado de Leite e pela Universidade Federal de Lavras. Os isolados clínicos humanos de *S. aureus* resistente à metilina foram cedidos pelo Hospital das Clínicas UFMG. As amostras foram mantidas em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth – Acumedia Manufacturers) com 50% de glicerol a -20°C até o momento do uso.

3.3. Plano de execução do experimento

No quadro II pode ser visualizado o plano de execução do experimento.

Quadro II: Plano de execução do experimento

Etapa	Procedimento	Objetivo
I	Padronização de PCR individual realizadas com DNA extraído a partir de amostras de referência em cultura pura	Avaliar a especificidade e o limite de detecção da PCR individual
II	PCR individual de DNA extraído a partir de amostras de referência em leite artificialmente contaminado	Avaliar a utilização da técnica Lise/alcalina, descrita por Millar et al (2000), em amostras de leite; verificar a especificidade e o limite de detecção em PCR individuais a partir de leite artificialmente contaminado com UFC/mL conhecidas
III	Padronização de PCR multiplex de DNA extraído a partir de amostras de referência em cultura pura	Avaliar a especificidade e o limite de detecção da PCR multiplex
IV	PCR multiplex de DNA extraído a partir de amostras de referência em leite artificialmente contaminado	Avaliar a especificidade e o limite de detecção da PCR multiplex realizadas com DNA obtidos diretamente a partir de leite artificialmente contaminado com UFC/mL conhecida
V	PCR multiplex a partir de DNA extraído a partir de leite de tanque de expansão	Validar a técnica para uso em amostras de leite de campo

3.4. PCR

3.4.1. Primers

As ampliações dos segmentos específicos do espaço intergênico 16S a 23S do rRNA das espécies *S. aureus*, *S.*

uberis, *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* foram realizadas com iniciadores (Invitrogen-Brasil) descritos por Forsman et al. (1997). Para MRSA foram utilizados iniciadores (Invitrogen-Brasil) criados a partir da seqüência do gene *MecA* descritos por Lee (2003).

Quadro III: Primers utilizados

Primer	Seqüência de primers 5'-3'	Espécie bacteriana	Tamanho do produto (pb)
STRU-UbI STRU-UbII	TAA GGA ACA CGT TGG TTA AG TTC CAG TCC TTA GAC CTT CT	<i>S. uberis</i>	330
STRA-AgI STRA-AgII	AAG GAA ACC TGC CAT TTG TTA ACC TAG TTT CTT TAA AAC TAG AA	<i>S. agalactiae</i>	270
STRD-DyI STRD-DyII	GAA CAC GTT AGG GTC GTC AGT ATA TCT TAA CTA GAA AAA CTA TTG	<i>S. dysgalactiae</i>	264
STAA-AuI STAA-AuII	TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG	<i>S. aureus</i>	420
MecA1 MecA2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	MRSA	533

3.4.2. Extração de DNA

O protocolo de extração pode ser dividido em três etapas:

1. Preparação da amostra: essa etapa tem como objetivo retirar cálcio, o principal inibidor da PCR presente no leite. Utiliza-se o tampão NET (50mM NaCl, 125 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl), descrito por Romero e Lopez-Goñi (1999).
2. Extração: etapa de extração propriamente dita, onde emprega-se o protocolo de extração descrito por Millar et al (2000).
3. Purificação do DNA: o objetivo dessa etapa é retirar proteínas e debris celulares através do uso do protocolo de Fenol-Clorofórmio descrito por Silva e Silva (2005).

3.4.2.1. Extração de DNA a partir de amostras de bactérias de referência em cultura pura

A extração a partir de culturas puras foi realizada visando à determinação da especificidade e limite de detecção da PCR individual e multiplex.

Cada microrganismo foi inoculado individualmente em caldo BHI e incubado a 37°C por oito horas. Transferiu-se para um microtubo, 1,8 mL das amostras e adicionou-se 200 µL de Tampão NET (50mM NaCl, 125 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl – pH 7,6). Após um minuto, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm a temperatura ambiente por dez minutos e o sobrenadante descartado por inversão.

A extração foi realizada segundo o protocolo proposto por Millar et al. (2000) e em seguida o DNA obtido foi purificado com fenol-clorofórmio (Silva e Silva, 2005).

A quantidade de DNA foi mensurada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®ND-1000 UV-Vis). Para determinação do limite de detecção da PCR, realizou-se diluição do DNA com Tris-EDTA, para obter as concentrações de 100ng, 50ng, 40ng, 20ng, 25ng, 1ng, 500pg, 400pg, 200pg, 250pg, 50pg, 10pg e 1pg.

3.4.2.2. Extração de DNA a partir de amostras de bactérias de referência em leite artificialmente contaminadas

Foram utilizadas amostras de leite artificialmente contaminadas para avaliar se o procedimento, descrito por Millar et al. (2000) para extração de DNA, poderia ser empregado diretamente a partir de amostras de leite.

Cada microrganismo foi inoculado individualmente em caldo BHI e incubado a 37°C por oito horas. Foram realizadas diluições seriadas em leite UHT e em seguida realizou-se o plaqueamento em ágar Plate Count (Oxoid). Obteve-se as concentrações 50, 10², 10³, 10⁴ e 10⁵ UFC/mL de cada microrganismo.

As mesmas metodologias empregadas para extração a partir de cultura pura foram utilizadas para as amostras diluídas em leite. Os controles negativos foram realizados com amostras de leite não inoculadas.

3.4.2.3. Extração de DNA a partir de amostras de leite de tanque de expansão

O DNA bacteriano foi extraído de 30 amostras de leite enviadas para análise bacteriológica no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG da Rede de Laboratórios de Qualidade do Leite do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e que continham contagens bacterianas totais acima de 1.000 UFC/mL. O leite continha azidiol, substância bacteriostática que possui como princípio ativo clorafenicol e azida sódica, que permite a conservação estável da amostra por até uma semana sem modificação dos seus componentes. As

técnicas utilizadas foram as mesmas descritas para leite artificialmente contaminados.

3.4.3. Padronização das PCRs

3.4.3.1. Padronização da PCR individual com DNA obtido a partir de amostras de bactérias de referência em cultura pura

A concentração dos componentes da reação (20µL) foi de 10mM de Tris HCl (pH 8,3), 200 µM de cada dNTP, e 100 ng de DNA extraído. Testes preliminares com diferentes concentrações de cloreto de magnésio (Phoneutria) (1,5; 2; 2,5 e 3 mM), da *Taq* DNA polimerase (Phoneutria) (0,5; 1; 2 e 2,5 U por reação) e dos *primers* (20, 30 e 40 pmol) foram realizados para definir quais as condições ideais de cada PCR individualmente. As reações ocorreram em termociclador (Thermo Hybaid), com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C e uma incubação final de 10 minutos a 72°C. A temperatura de anelamento e o número de ciclos foram subseqüentemente otimizados para cada teste individualmente. Avaliou-se o limite de detecção com diferentes concentrações de DNA.

3.4.3.2. Padronização de PCR multiplex com DNA obtido a partir de amostras de bactérias de referência em cultura pura

Os genes de interesse foram amplificados em uma PCR Multiplex com um volume final de 50µL. Utilizou-se Tampão Especial Phoneutria, que confere uma reação em Hot-Start (3,5 mM de MgCl₂, 10mM de Tris HCl - pH8,3), e inicialmente 200 µM de cada dNTP e 20 pmol de cada *primer*.

As reações foram incubadas a 94°C por 3 minutos, seguidas por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e posteriormente incubação final de 10 minutos a 72°C. Testes com diferentes concentrações de cloreto de magnésio (1,5; 2; 2,5 e 3 mM), da *Taq* DNA polimerase (0,5; 1; 2 e 2,5 U por reação) e dos *primers*

(30 pmol, 40 pmol, 50 pmol) foram realizados visando otimização da reação.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,1 µg/L de brometo de etídio em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 0,1 mM EDTA), a 100 V e 400 A por 50 minutos. Os produtos foram visualizadas sob iluminação de luz ultravioleta.

Para medir a sensibilidade da técnica foram realizadas PCRs com DNA nas seguintes concentrações: 50ng, 25ng, 1ng, 500pg e 250pg.

3.4.3.2.1. PCR Multiplex para detecção de microrganismos a partir das amostras de leite de tanque de expansão

Após a padronização da técnica com amostras bacterianas de referência, trabalhou-se com 30 amostras de leite proveniente do tanque de expansão de 30 fazendas de diferentes bacias leiteiras. O método de obtenção do material genético seguiu a mesma metodologia aplicada às amostras de referência.

3.4.4. Avaliação da especificidade

A especificidade da técnica foi verificada utilizando-se outras bactérias: *Streptococcus bovis* e *Staphylococcus intermedius* e *S. epidermidis*, comumente encontradas no leite.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização da PCR individual

A PCR individual foi padronizada com volume final de reação de 20 µL, usando-se

Tampão Phoneutria, 1,5 mM de MgCl₂, 30 pmol de cada iniciador, 200 pM de dNTPs, 1,0 U de Taq polimerase e 100 ng de DNA. Ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos a 94°C por um minuto, 59°C por um minuto para *S. agalactiae* e *S. uberis*, 61°C para *S. aureus* e MRSAe 62°C para *S. dysgalactiae* por um minuto e 72°C por um minuto. E por fim um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos.

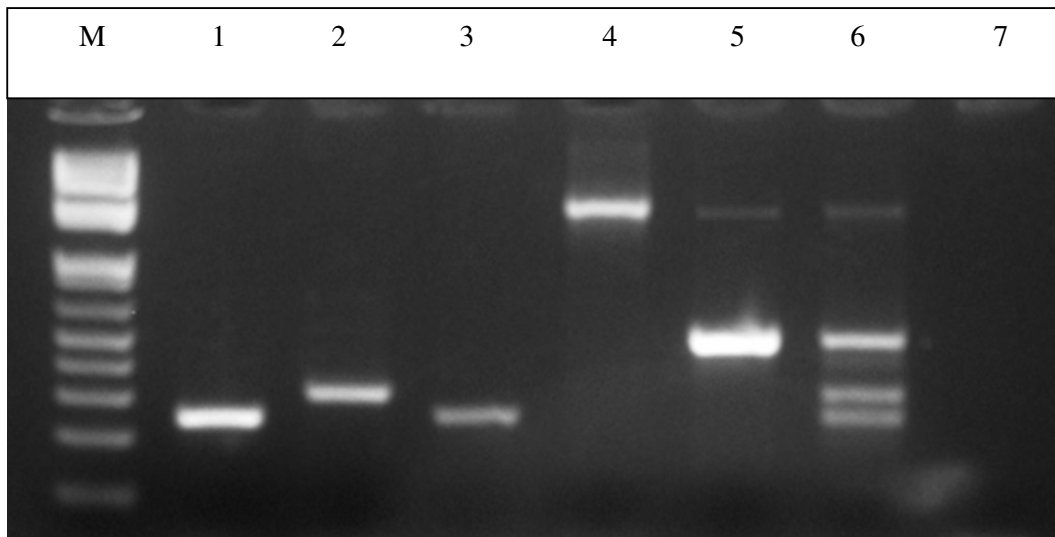
4.2. Otimização da PCR Multiplex

A PCR multiplex foi padronizada com volume final de reação de 50 µL, usando-se Tampão Especial Phoneutria, que confere uma reação em Hot-Start (3,5 mM de MgCl₂), 40 pmol dos iniciadores de MRSA, *S. uberis* e *S. agalactiae*, 50 pmol de *S. aureus* e *S. dysgalactiae*, 300 mM de dNTPs, 2,0 U de Taq polimerase e 50 ng de DNA. Ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos a 94°C por um minuto, 59°C por um minuto e 72°C por minutos. E por fim um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos.

4.3. Especificidade dos primers

Na PCR individual e multiplex, tanto de isolados de cultura pura, quanto isolados a partir do leite, observou-se apenas as bandas de DNA esperadas para cada microrganismo, exceto para *S. aureus*, onde foram observadas mais três bandas, de 1300, 900 e 200 pb, sendo a banda de 900 pb na maioria das vezes predominante.

Em nenhuma reação com os primers descritos houve amplificação para os moldes das espécies *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. bovis*.



Legenda: M: Padrão de peso molecular (DNA Ladder 100 pb); 1: *S. agalactiae* (264 pb); 2: *S. uberis* (330 pb); 3: *S. dysgalactiae* (270 pb); 4: *S. aureus* (900 pb); 5: MRSA (533 pb); 6: *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus* e MRSA; 7: Controle negativo.

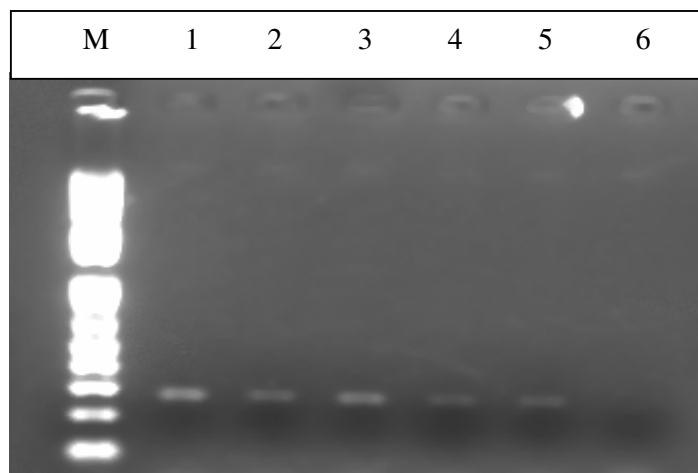
Figura 1. Fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir de culturas puras de *S. aureus* e *Streptococcus* spp.

4.4. Sensibilidade da PCR a partir de culturas puras

Na PCR individual foi alcançado o limite de detecção de 10pg de DNA; para a PCR multiplex foi possível detectar 500pg de DNA extraído de *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. aureus* e, para o DNA extraído de MRSA foi alcançado um limite de detecção de 250pg.

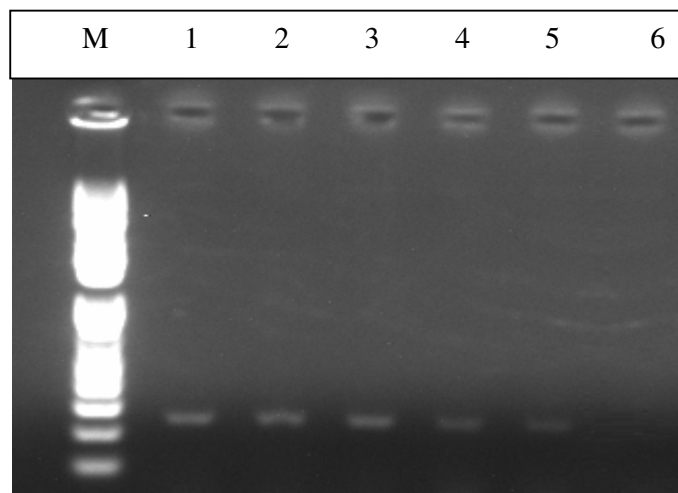
4.5. Sensibilidade da PCR a partir de amostras do leite

O limite de detecção de bactérias pela PCR individual foi 10^2 UFC/mL; pela técnica de PCR multiplex foram observados produtos a partir de 10^3 UFC/mL. Chamberlain et al. (1994), sugerem que a competição entre os *primers* em uma PCR Multiplex pode contribuir para redução da sensibilidade do teste.



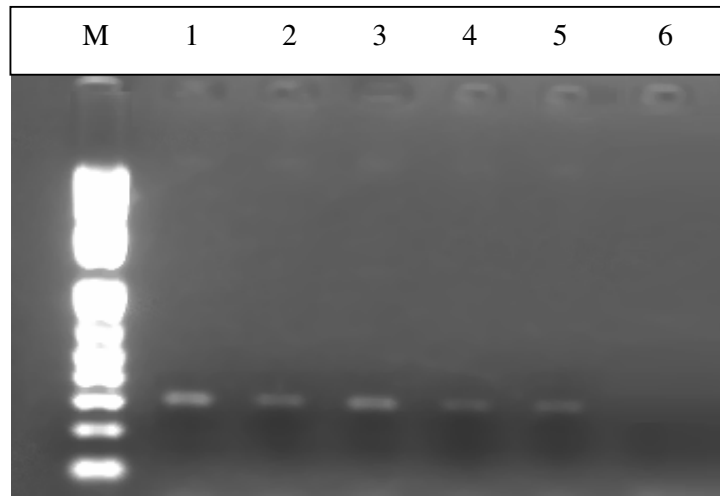
Legenda: M: Padrão de peso molecular (DNA Ladder 100 pb), 1- 10^7 UFC/mL, 2- 10^6 UFC/mL, 3- 10^5 UFC/mL, 4- 10^4 UFC/mL, 5- 10^3 UFC/mL, 6- 10^2 UFC/mL.

Figura 2. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de *S. agalactiae* (270 pb), visualizados em gel de agarose 2%.



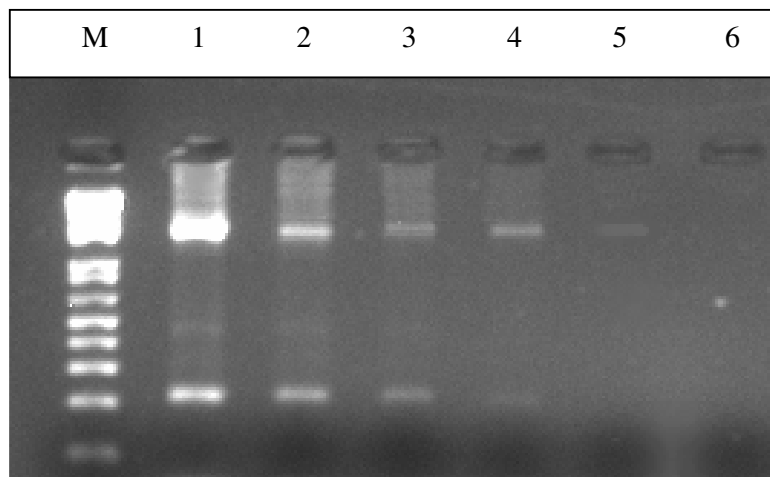
Legenda: M: Padrão de peso molecular (DNA Ladder 100 pb), 1- 10^7 UFC/mL, 2- 10^6 UFC/mL, 3- 10^5 UFC/mL, 4- 10^4 UFC/mL, 5- 10^3 UFC/mL, 6- 10^2 UFC/mL.

Figura 3. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de *S. dysgalactiae* (264 pb), visualizados em gel de agarose 2%.



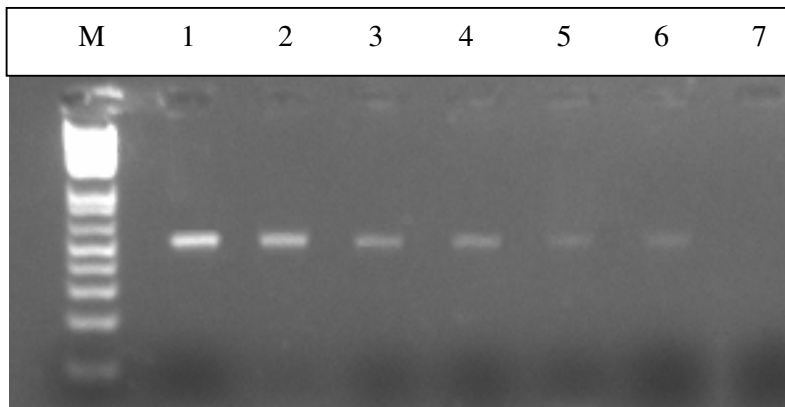
Legenda: M: Padrão de peso molecular (DNA Ladder 100 pb), 1- 10^7 UFC/mL, 2- 10^6 UFC/mL, 3- 10^5 UFC/mL, 4- 10^4 UFC/mL, 5- 10^3 UFC/mL, 6- 10^2 UFC/mL.

Figura 4. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de *S. uberis* (330 pb), visualizados em gel de agarose 2%.



Legenda: M: Padrão de peso molecular (DNA Ladder 100 pb), 1- Controle positivo, 2- 10^6 UFC/mL, 3- 10^5 UFC/mL, 4- 10^4 UFC/mL, 5- 10^3 UFC/mL, 6- 10^2 UFC/mL.

Figura 5. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de *S. aureus* (900 pb, 420 pb, 200 pb), visualizados em gel de agarose 2%.



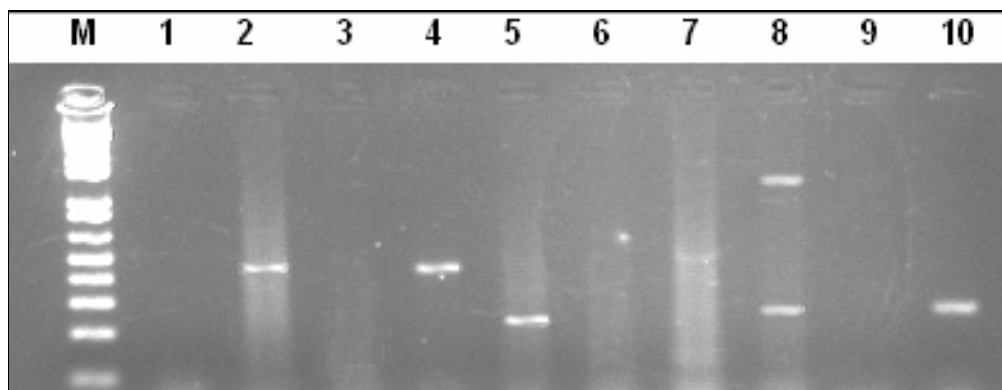
Legenda: M: Padrão de peso molecular (DNA Ladder 100 pb), 1- Controle Positivo, 2- 10^7 UFC/mL, 3- 10^6 UFC/mL, 4- 10^5 UFC/mL, 5- 10^4 UFC/mL, 6- 10^3 UFC/mL, 7- 10^2 UFC/mL.

Figura 6. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de MRSA (533 pb), visualizados em gel de agarose 2%.

4.6. Testes em amostras de leite de tanque de expansão

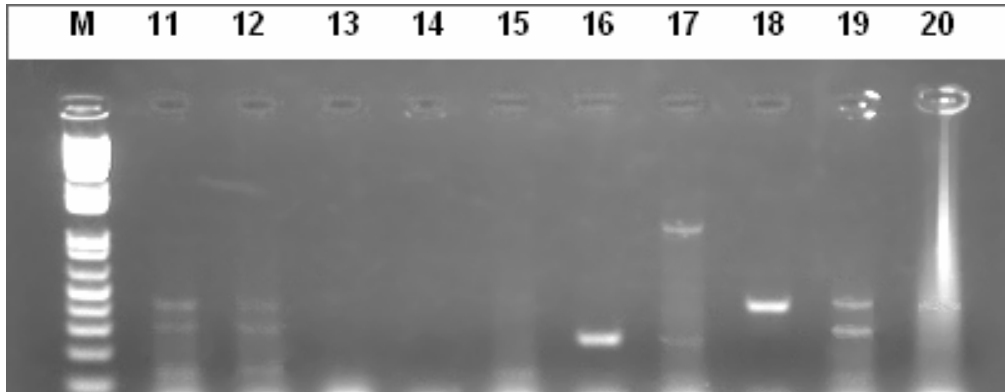
Na tabela 1 e nas figuras 7, 8 e 9 se encontram os resultados obtidos nas 30

amostras de tanque de expansão testadas. Não foi observada interferência do azidiol, presente na amostra, sobre a amplificação dos produtos de PCR.



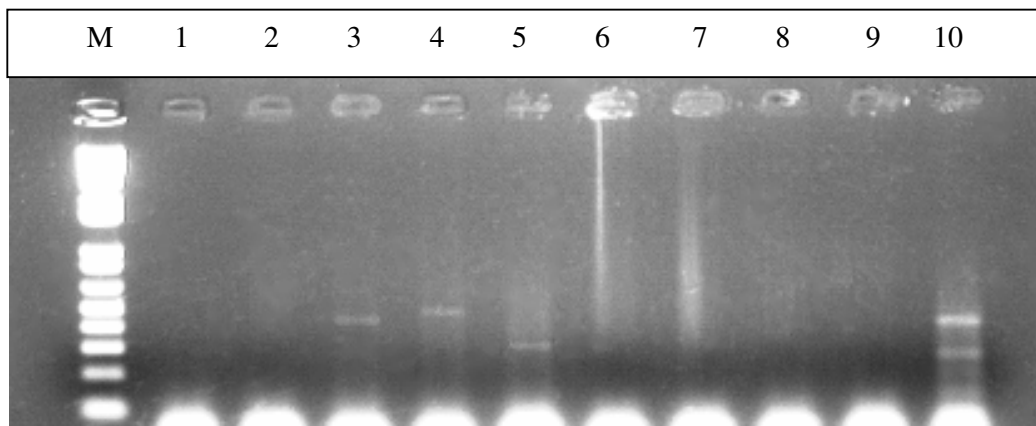
Legenda: M: Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 100 pb), 1-10: Amostras de leite.

Figura 7. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de leite de tanque de expansão, visualizados em gel de agarose 2%.



Legenda: M: Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 100 pb), 11-20: Amostras de leite.

Figura 8. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de leite de tanque de expansão, visualizados em gel de agarose 2%.



Legenda: M: Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 100 pb), 21-30: Amostras de leite.

Figura 9. Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de leite de tanque de expansão, visualizados em gel de agarose 2%.

Tabela 1. Utilização da PCR multiplex para detecção de microrganismos em leite bovino com diferentes contagens bacterianas totais e contagens de células somáticas, diretamente do tanque de expansão.

Amostra	CBT ¹	Microrganismos identificados por mPCR
1	2475	NA
2	2033	<i>S. aureus</i>
3	7095	NA
4	11070	<i>S. aureus</i>
5	9546	<i>S. agalactiae</i>
6	6344	<i>S. aureus</i>
7	5453	<i>S. aureus</i>
8	2302	<i>S. aureus</i> e <i>S. dysgalactiae</i>
9	9846	NA
10	6000	<i>S. dysgalactiae</i>
11	2067	<i>S. aureus</i> e <i>S. uberis</i>
12	2313	<i>S. aureus</i> e <i>S. uberis</i>
13	1744	NA
14	3821	NA
15	4359	<i>S. aureus</i>
16	2013	<i>S. agalactiae</i>
17	8565	<i>S. agalactiae</i> e <i>S. aureus</i>
18	1309	<i>S. aureus</i>
19	1284	<i>S. uberis</i> e <i>S. aureus</i>
20	6906	<i>S. aureus</i>
21	3551	NA
22	2548	NA
23	1719	<i>S. aureus</i>
24	7095	<i>S. aureus</i> resistente à meticilina
25	5990	<i>S. uberis</i>
26	2302	NA
27	10999	NA
28	6344	NA
29	1763	NA
30	8254	<i>S. agalactiae</i> e <i>S. aureus</i>

1 – Contagem Bacteriana Total/ mL de leite - NA: Não amplificado

5. DISCUSSÃO

Os objetivos de um teste diagnóstico no contexto do controle e erradicação de doença animal são identificar rebanhos doentes, além de animais infectados dentro dos rebanhos. Durante a fase inicial de um programa de controle, a sensibilidade de um teste diagnóstico é considerada como a característica mais importante para garantir que todos os animais doentes em um rebanho sejam detectados, a não ser quando se tem uma reduzida prevalência da doença, o que torna a especificidade mais importante e um segundo teste diagnóstico pode ser conduzido para aumentar a

capacidade de identificação de animais não doentes (Zafalon et al., 2005).

Os avanços tecnológicos levaram ao desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para a diferenciação de microrganismos resultando no aumento de testes bioquímicos e enzimáticos, muitos dos quais são baseados em análises genotípicas (Vieira-da-Motta et al., 2001). Entretanto, as técnicas fenotípicas além de exigirem vários testes para a identificação de espécies, podem levar aos resultados falso-negativos devido ao reflexo de fatores ambientais sobre a expressão gênica. Segundo Zschock et al. (2005), testes

convencionais podem gerar de 1 a 10% de resultados atípicos.

Atualmente, a biologia molecular tem sido amplamente utilizada em estudos epidemiológicos de enfermidades. Os métodos genotípicos têm substituído com êxito os métodos fenotípicos que apresentam baixa reprodutibilidade e são baseados em características instáveis dos microrganismos (Oliveira e Ramos 2002). Dentre as técnicas mais utilizadas em estudos epidemiológicos, destaca-se a PCR, por sua rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados, podendo ser empregada para fundamentar e complementar informações geradas em estudos epidemiológicos (Silva, 2003).

A especificidade de uma PCR depende da fidelidade dos *primers* utilizados, por isso, é necessário utilizar seqüências específicas de *primers* direcionadas para o patógeno alvo (Tamaparu, 2001). Neste trabalho foram utilizados os *primers* descritos por Forsman et al. (1997), que foram específicos para os genes desejados, não havendo amplificação de nenhum outro microrganismo testado. O aparecimento de mais de uma banda de DNA nas reações onde se detectava *S. aureus*, deve-se ao fato desse microrganismo possuir nove *operons*, as bandas mais fracas podem representar moléculas de heteroduplex resultante de hibridização cruzada de produtos amplificados de diferentes tipos de *operons* (Forsman et al., 1997).

Já a sensibilidade depende das condições da reação, da pureza e da quantidade de DNA. Matrizes alimentícias geralmente são ricas em substâncias inibitórias da PCR. Particularmente no leite, componentes como Ca^{2+} , proteinase, gordura e proteínas do leite podem bloquear o DNA e impedir o acesso pela polimerase, conseqüentemente, o desenvolvimento de uma estratégia de preparação da amostra que possa capturar o DNA da bactéria patogênica no alimento em alta qualidade é necessária.

A caseína é um dos principais inibidores presentes no leite, que em associação com

cálcio forma micelos. A adição de soluções com altas concentrações de EDTA quelam o cálcio dissolvendo os micelos de caseína (Murphy et al., 2002). Muitos estudos que utilizaram soluções de EDTA obtiveram uma melhor visualização das bandas de DNA (Romero e Lopez-Goñi, 1999; Murphy et al., 2002). Neste experimento usou o tampão NET que possui alta concentração de EDTA e Tris-HCl. Foi testado também PBS estéril no lugar do tampão NET. Os resultados foram similares, no entanto, o tampão NET é mais prático, uma vez que os *pellets* se dissolvem com mais facilidade e a solução fica mais limpa. Em questão às endonucleases, as mesmas são inativadas pelo NaOH presente na solução de lise.

Outro fator importante é a lise da bactéria e a quantidade de DNA extraído. Um bom processamento da amostra deve promover uma lise eficiente da parede celular bacteriana sem danificar o DNA, o que foi observado na técnica aplicada.

Os limites de detecção alcançados neste trabalho foram maiores que os de Romero e Lopez-Goni (1999), entretanto, neste experimento utilizou-se bactérias Gram positivas que conhecidamente possuem uma parede celular mais resistente. Em relação a trabalhos que usaram bactérias Gram positivas, foram obtidos resultados similares a de Martinez et al. (2001), com a detecção de 100 UFC/mL em reações individuais e de Ramesh et al. (2002) que obtiveram limite de detecção de 10^3 CFU/mL para *S. aureus* e *Y. enterocolitica* em reação multiplex. Em comparação ao protocolo de Meiri-Bendek et al. (2002) obteve-se um limite de detecção menor que o apresentado por eles. O alto limite de detecção desse grupo (10^4 e 10^5 UFC/mL) provavelmente se deve à excessiva manipulação da amostra.

O método de extração para DNA de bactérias Gram positivas a partir do leite apresentado se mostrou eficiente e de fácil realização, os reagentes são econômicos, equipamentos sofisticados não são requeridos, há pouca manipulação da amostra e o tempo de análise requerido durante todo o processo de diagnóstico é aproximadamente oito horas. Daí a sua

aplicabilidade na rotina de detecção de patógenos no leite.

Nas amostras de leite obtidas em tanque de expansão, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae* foram detectados pela PCR multiplex. Estes patógenos são os mais frequentemente isolados e identificados como causadores de mastite em diferentes bacias leiteiras do País (Brito et al., 1998, Costa et al., 1995; Mota et al.; 2004; Pereira et al., 2007). Deve-se registrar que, na literatura nacional, não existe registro de identificação de MRSA em amostras de leite a partir da detecção do gene *MecA*. Santos et al. (2005) identificaram 17 amostras resistentes à metilina, no entanto essas amostras não possuíam o gene *MecA*, a resistência delas era devido à hiperprodução de betalactamases. Estas amostras foram identificadas a partir de isolados do leite pelos métodos bacteriológicos. Nossos registros foram feitos diretamente a partir do leite, em menor tempo e economia. Chama-se a atenção, a partir destes resultados, para o risco para a saúde pública, da presença de MRSA em amostras de leite.

Devido às características da disseminação da infecção por *S. aureus* e *S. agalactiae* entre os animais, vacas com quartos mamários infectados sem evidência da reação inflamatória podem constituir em importante fonte de infecção para o rebanho. Portanto, a identificação de vacas infectadas por estes dois agentes é importante para que medidas recomendadas de controle sejam direcionadas para agentes contagiosos da mastite, o que implica no exame de quartos mamários aparentemente sadios (Brito et al.; 1998). A confiabilidade da PCR e a sua alta sensibilidade revelam potencial de uso da técnica para diagnóstico de mastite clínica e subclínica.

6. CONCLUSÕES

As técnicas de PCR individual e da mPCR podem ser utilizadas diretamente em leite bovino para detecção dos microrganismos causadores de mastite sem a necessidade de pré-tratamentos ou de isolamentos bacterianos;

O limiar de detecção de DNA em PCR individuais, a partir de culturas de *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. agalactiae* e *S. aureus* e *Staphylococcus aureus* metilina resistente, é de 10 pg; em PCR multiplex é de 500pg para *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. agalactiae* e *S. aureus* e 250pg para MRSA.

O limite de detecção de microrganismos a partir da extração diretamente do leite é de 10^2 UFC/mL pela técnica de PCR individual e 10^3 UFC/mL pela técnica de PCR multiplex.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSATO, A.; TRACHSEL P.; SCHALLIBAUM, M. et al. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Prev. Vet. Med.*, v. 44, p. 205-220, 2000.

BRAOIOS, A. *Estudo de Staphylococcus aureus resistente à metilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas*. 2005. 102f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara .

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

- COELHO, S. M. O. C.; MORAIS, R. A. M.; SOARES, L. C. et al. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *Mec A* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* Oxacilina-resistente isolados de espécies humanas e animais. *Ciê. Rural*, v. 37, n. 01, p. 195-200, 2007.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R. et al. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.17, n.5, p.215-217, 1995.
- CHAMBERLIN, J. S.; CHAMBERLAIN, J. R. Optimization of multiplex PCRs, In: Mullis, K. B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. A. (eds.). *The Polymerase Chain Reaction*. Cambridge: Birkhäuser Boston, 1994. p. 38-45.
- CUTERI, V.; MARENZONI, M. L.; MAZZOLLA, R. et al. *Staphylococcus aureus*: study of genomic similarity of strains isolated in veterinary pathology using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Diseases*, v. 27, p. 247-253, 2004.
- CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cel. Probes*, v. 19, p. 299-305, 2005.
- DEVRIESE, L.A.; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicilin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated from bovine mastitis cases. *Zbl. Vet. B.* v. 19, p. 598-605, 1972.
- DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Vet. Bras.*, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciê. Rural*, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- FORSMAN, P.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiol.*, v. 143, p. 3491-3500, 1997.
- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.
- GANDRA, E. A. *Multiplex PCR para detecção de Staphylococcus aureus, S. intermedius e S. hyicus em leite UHT artificialmente contaminado*. 2006. 66f. Tese (Doutorado Ciência e Tecnologia agroindustrial), Faculdade de Agronomia Eliseu Marciel – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- GOÑI, P.; VERGARA, Y.; RUIZ, J. et al. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strain from ovine and rabbit mastitis. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, v. 23, p. 268-272, 2004
- HASSAN, A. A.; AKINEDEN, Ö; LÄMMLER, C et al. Molecular Characterization of Phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *J. Vet. Med.* v. 49, p. 257-259, 2002.
- HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YUZAWA, H. et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. microbial.*, v. 292, p. 67-74, 2002.
- JONES, T. F.; KELLUM, M. E.; PORTER, S. S. et al. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Diseases*, v. 8, n. 1, p. 82-84, 2002.
- LANGENEGGER, J.; VIANI, M. C. E.; BAHIA, M. G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 1, n. 2, p. 47-52, 1981.

- LANGONI, H.; TONIN, F. B.; CABRAL, K. G. et al. Tratamento da mastite bovina com a associação ampicilina + cloxacilina. *Rev. Napgama*, n. 3, p. 21-23, 1999.
- LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.
- LEE, J. H.; JEONG, J. M.; PARK, Y. H. et al. Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J. Clin. Microbiol.*, Jun., v. 42, n. 6, p. 2780-2782, 2004.
- LEIGH, J. A. *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet. J.* v. 157, issue 3, p. 225-238, 1999.
- MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Can. J. Vet. Res.*, v. 65, p. 68-72, 2001.
- MEIRI-BENDEK, I.; LIPKIN, E.; FRIEDMANN, A. et al. A PCR-Based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *J. Dairy Sci.* v. 85, p. 1717-1723, 2002.
- METAN, G.; ZARAKOLU, P.; UNAL, S. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. *J. Hosp. Infect.*, v. 61, p. 93-99, 2005.
- MIDDLETON, J. R.; FALES, W. H.; LUBY, C. D. et al. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 6, p. 2916-2918, 2005.
- MILLAR, B. C.; JIRU, X.; MOORE, J. E. et al. A simple and sensitive method to extrat bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J. Microbiol. Methods*, v. 42, p. 139-147, 2000.
- MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. *Rev. Napgama São Paulo*, v.7, n.1, p. 10-13, 2004.
- MURPHY, M. A.; SHARIFLOU, M. R.; MORAN, C. High quality genomic DNA extraction from large milk samples *J. Dairy Res.* v. 69, p. 645-649, 2002.
- NADER FILHO, A.; HELLÚ, J. A. A.; OLIVEIRA, M. B. C. et al. Eficácia da associação Sulfametoxazol, Trimetropim e Diclofenaco de Sódio no tratamento da mastite clínica bovina. *Rev. Napgama São Paulo*, v.7, n.1, p.7-9, 2004.
- Performance standards for antimicrobials disk susceptibility tests. 5. ed., Wayne: NCCLS, 2000, p. **totais** Approved Standard M2-A7, v.20, n.1.
- A global organization for mastitis control and milk quality*, Disponível em: <www.nmconline.org>, acesso em: 12 de setembro de 2006.
- OLIVEIRA, A. M.; RAMOS, M. C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, v. 35, p. 175-180, 2002.
- O'MAHONY, R.; ABBOTT, Y.; LEONARD, F.C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Vet. Microbiol.*, v. 109, p. 285-296, 2005.
- PEREIRA, U. P.; COSTA, G. M.; SILVA, M. A. et al. Mastite subclínica em bovinos leiteiros do sul de Minas Gerais. In: *IV Encontro de Pesquisadores em Mastites*, n. 2007, Botucatu : FMVZ – UNESP, 2007, p. 92.
- PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; VILLAR, J. et al. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin ad mupirocin resistance. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 11, p. 4037-4041, 2001.

- PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci.*, v. 84, p. 1140-1148, 2001.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K. et al. *Clinical Veterinary Microbiology* London:Wolfe, 1995. 648 p.
- RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B. P.; CHANDRASHEKAR, A. et al. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol Cel Probes* v. 16, p. 307-314, 2005.
- REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.
- RICH, M.; DEIGHTON, L.; ROBERTS, L. Clindamycin resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet. Microbiol.*, v. 111, p. 237-240, 2005.
- RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H. et al. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 2584-2589, 2001.
- RISTOW, L. E.; JÚNIOR, A. A. P.; MEIRA, F. A. Coleta de material para análise laboratorial e diagnóstico de mastite. *Revista técnica da Bovinocultura de leite. Leite Integral*, ano 1, n. 1, fev., 2006.
- ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, 1999.
- RUEGG, P. L. Emerging Mastitis Threats on the Dairy *Udder Health Resources Home*. 2001. Disponível em: <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/emergingmastitispathogens_2001.pdf> Acesso em: 01 de dezembro de 2007
- RUEGG, P. L.; REINEMANN, D. J. Milk Quality and Mastitis Tests *Udder Health Resources Home*. 2002. Disponível em: <<http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/milk%20quality%20tests01.pdf>> Acesso em: 01 de dezembro de 2007.
- SANTOS, E. M. P. *Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de Streptococcus e gêneros relacionados isolados de mastite bovina*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal). 2004. 81f. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SANTOS, F. G. B.; OLIVEIRA, W. L. M.; GARINO JÚNIOR, F. et al. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. *Rev. Napgama*, v. 8, n. 2, p. 14-18, 2005.
- SILVA, N. Doença da glândula mamária. In: MARQUES, D. C. *Criação de Bovinos*. 7. ed. Belo Horizonte: CVP – Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. p. 435-451.
- SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 4, p. 260-264, 2005.
- TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.*, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001

TONIN, F. B. *Epidemiologia molecular aplicada ao estudo da mastite caprina causada por Staphylococcus spp.* 2003. 33f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VIEIRA-DA-MOTTA, O.; FOLLY, M. M.; SAKYIAMA, H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Bras. J. Microbiol.*, v.32, n.1, p. 27-31, 2001.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V. et al. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 25, n. 23, p. 159-163, 2005.

ZANINI, M. S. *Identificação de Mycobacterium bovis em leite através da reação em cadeia da polimerase PCR*, 1998. 48 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ZSCHÖCK, M.; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A. et al. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. *J.Dairy Sci.*, v. 72, p. 333-337, 2005.