

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

***Staphylococcus aureus* isolados de mastite em rebanhos
leiteiros no Rio Grande do Sul: identificação de grupos *agr* e
enterotoxinas**

Mario de Menezes Coppola

Pelotas, 2014

MARIO DE MENEZES COPPOLA

***Staphylococcus aureus* isolados de mastite em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul: identificação de grupos *agr* e enterotoxinas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Junior

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C781s Coppola, Mario de Menezes

Staphylococcus aureus isolados de mastite em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul: identificação de grupos *agr* e enterotoxinas / Mario de Menezes Coppola. – 61f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Sanidade Animal. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientador Thomaz Lucia Júnior.

1.Veterinária. 2. *Staphylococcus aureus*. 3.Mastite bovina. 4.*agr*. 5.Enterotoxinas. I.Lucia Júnior, Thomaz. II. Título.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (UFPel)

Prof. Dr. João Rodrigo Gil de los Santos (UFPel)

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (UFPel)

Agradecimentos

Aos meus pais Mario e Sandra Coppola e meu irmão Fábio pelo apoio e incentivo durante a realização do curso.

Ao Prof. Thomaz Lucia Júnior pela sua orientação competente e segura.

Ao Prof. Wladimir Padilha da Silva por ceder as amostras padrão utilizadas nesse trabalho e seu apoio técnico.

Ao Prof. João Rodrigo Gil de los Santos pelo auxílio técnico durante o curso.

À Dra. Fabiana Quos Mayer pelo auxílio e conhecimentos transmitidos durante a execução das técnicas de Biologia Molecular.

À Márcia Regina Loiko pela colaboração e apoio durante as atividades no Laboratório de Bacteriologia e execução do experimento.

Aos pesquisadores, técnicos, bolsistas e estagiários do IPVDF pela convivência e colaboração.

Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Veterinária pela convivência durante as aulas.

Resumo

COPPOLA, Mario de Menezes. ***Staphylococcus aureus* isolados de mastite em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul: identificação dos grupos *agr* e enterotoxinas.** 2014. 61f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A mastite bovina é uma doença importante dos rebanhos leiteiros por trazer prejuízos à sanidade e produção. Os objetivos desse estudo foram isolar *Staphylococcus* de amostras de leite de casos de mastite bovina clínica e subclínica no Rio Grande do Sul, confirmar a presença de *S. aureus* através da amplificação do gene *nuc* por PCR, identificar os genes das EEs A, B e D e os grupos *agr* I-IV e a relação entre os genes dos grupos *agr* e de EEs. Duzentas e sessenta e seis amostras de leite foram analisadas, sendo 218 provenientes de vacas com mastite subclínica e 48 de casos clínicos. Bactérias do gênero *Staphylococcus* foram isoladas em 88 amostras. A identificação por PCR confirmou 58 amostras como *S. aureus*, o que correspondeu a 21,7% do total de amostras, 25 foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e 5 como coagulase positiva. Nas amostras de leite originárias de vacas com mastite subclínica e nos casos clínicos o isolamento de *S. aureus* foi superior aos SCN e *Staphylococcus* coagulase positiva. *S. aureus* foi isolado em maior número de rebanhos, comparado aos SCN e *Staphylococcus* coagulase positiva. Esses 58 isolados de *S. aureus* juntamente com outros 32 isolados de casos de mastite bovina no Rio Grande do Sul pertencentes ao banco de isolados do Laboratório de Bacteriologia do IPVDF, num total de 90 isolados foram testados por PCR para a presença de genes dos grupos *agr* I-IV e das EEs A, B e D. O gene *agr* mais frequente foi *agr*-III, seguido por *agr*-I. Quanto à distribuição por rebanhos, foi identificada maior ocorrência do gene *agr*-III. O gene de EEs mais encontrado foi *sea* e quanto à relação entre gene de EEs e *agr*, foi observada associação significativa entre a presença de *sea* e *agr*-I.

Palavras chave: Mastite. *Staphylococcus aureus*. *agr*. Enterotoxinas.

Abstract

COPPOLA, Mario de Menezes. ***Staphylococcus aureus* isolados de mastite em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul: identificação dos grupos agr e enterotoxinas.** 2014. 61f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Bovine mastitis is an important disease of dairy cattle, which affects sanity and production. The objectives of this study were to isolate *Staphylococcus* on milk samples from subclinical and clinical cases in the Rio Grande do Sul state, to confirm the presence of *S. aureus* through amplification of the *nuc* gene by PCR, to identify the occurrence of enterotoxin (SE) genes A, B e D and agr I-IV groups in *S. aureus* and the relationship among agr genes and SEs. Two hundred sixty six milk samples were analyzed, 218 from cows with subclinical mastitis and 48 from clinical cases. The *Staphylococcus* genus was identified in 88 samples. The PCR identification confirmed 58 samples as *S. aureus* which corresponded to 21,7% of all samples, 25 were classified as CNS and 5 as coagulase positive. In milk samples from cows with subclinical mastitis and clinical cases, the isolation of *S. aureus* was superior to CNS and coagulase positive *Staphylococcus*. *S. aureus* was isolated on most herds compared to CNS and coagulase positive *Staphylococcus*. This 58 isolates of *S. aureus* with others 32 isolates of bovine mastitis cases from Bacteriology Laboratory of IPVDF, were tested through PCR to presence of agr-I-IV groups and SEs A, B e D genes. The most frequent agr gene was agr-III, followed by agr-I. On herds, the most occurrence gene was agr-III. The most frequent SEs gene found was sea and as for the relationship among SEs genes and agr genes, occurred association for sea and agr-I.

Keywords: Mastitis. *Staphylococcus aureus*. agr. Enterotoxins.

Lista de Figuras

ARTIGO 1	Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em casos de mastite no Rio Grande do Sul entre 2011 e 2012
Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene <i>nuc</i> por PCR.....36
ARTIGO 2	Identificação de grupos <i>agr</i> e enterotoxinas em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite bovina por PCR
Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos genes <i>nuc</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> e <i>sed</i> por PCR.....58
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos genes <i>agr</i> -I-IV por PCR.....59

Lista de Tabelas

ARTIGO 1	Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em casos de mastite no Rio Grande do Sul entre 2011 e 2012
Tabela 1	Distribuição das amostras de leite por tipo de mastite e rebanhos entre as mesorregiões do Rio Grande do Sul..... 31
Tabela 2	Sequência de oligonucleotídeos usados como primers.....32
Tabela 3	Frequência de isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva de amostras de leite por rebanhos..... 33
Tabela 4	Frequência de isolamento de <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva de amostras de leite por tipo de mastite..... 34
Tabela 5	Frequência de isolamento de <i>S. aureus</i> em amostras de leite de casos de mastite bovina por estação do ano.....35
ARTIGO 2	Identificação de grupos <i>agr</i> e enterotoxinas em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite bovina por PCR
Tabela 1	Sequência de oligonucleotídeos usados como primers.....55
Tabela 2	Frequência dos grupos <i>agr</i> em <i>S. aureus</i> isolados de amostras de leite de mastite bovina e por rebanhos leiteiros.....56
Tabela 3	Relação entre a presença dos genes para EE em <i>S. aureus</i> isolado de mastite bovina com o gene <i>agr</i>57

Sumário

1.Introdução.....	10
2.Objetivos	11
3.Artigos.....	12
3.1.Artigo 1.....	12
1.Introdução.....	14
2.Material e Métodos.....	17
3.Resultados.....	20
4.Discussão.....	21
5.Conclusão.....	24
6.Referências.....	24
3.2. Artigo 2.....	37
1.Introdução.....	39
2.Material e Métodos.....	41
3.Resultados.....	45
4.Discussão.....	45
5.Conclusões.....	48
6.Referências.....	49
4.Conclusão Geral.....	60
5.Referências.....	61

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das doenças mais importantes para os rebanhos leiteiros nos países produtores de leite (BLOWEY & EDMONDSON, 2010; RUEGG, 2012). Caracteriza-se por ser uma inflamação da glândula mamária, geralmente de origem infecciosa, que pode ocorrer na forma clínica ou subclínica (BRADLEY, 2002). A infecção intramamária provoca redução na quantidade e qualidade do leite e ocasiona perdas econômicas elevadas (BLOWEY & EDMONDSON, 2010; RUEGG, 2012). Entre as bactérias que provocam mastite, *Staphylococcus aureus* é considerado um agente importante nos rebanhos leiteiros, por ser um patógeno contagioso, transmitido de vacas infectadas para não infectadas (ZADOKS et al., 2011).

Em *S. aureus* a síntese de produtos relacionados à virulência tais como enterotoxinas (EEs), pode estar relacionada à ativação do *locus agr* (*accessory gene regulator*), que pode ser dividido em quatro grupos categorizados de I até IV (LYONS & NOVICK, 2004; NOVICK & GEISINGER, 2008). *S. aureus* isolados de mastite bovina são associados principalmente ao grupo *agr-I* e menos freqüentemente aos grupos *agr-II* e *agr-III* (BUZZOLA et al., 2007).

As EEs de *S. aureus* são classificadas em 22 tipos (HENNEKINNE et al., 2012). Os tipos A, B, C, D e E, denominadas de EEs clássicas, são comuns em casos de intoxicação alimentar associados ao leite e produtos lácteos (ARGUDIN et al., 2010; HENNEKINNE et al., 2012). A identificação de isolados que apresentam esses genes em casos de mastite bovina é importante porque sua presença pode influenciar no estabelecimento da doença (HAVERI et al., 2007). ZECCONI et al. (2006) sugerem que infecções intramamárias provocadas por esses isolados podem representar um risco para a saúde humana, devido à presença das EEs no leite.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de *Staphylococcus* em amostras de leite de casos de mastite bovina clínica e subclínica no Rio Grande do Sul, e identificar os genes dos grupos *agr* I-IV e das EEs A, B e D em *S. aureus* isolados dos casos de mastite bovina.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus coagulase positiva* em amostras de leite de casos de mastite bovina clínica e subclínica no Rio Grande do Sul entre 2011 e 2012.
- Identificar a presença dos genes dos grupos *agr* I-IV em *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina por PCR.
- Identificar a presença dos genes das EEs A, B e D em *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina por PCR.
- Relacionar a ocorrência entre os genes dos grupos *agr* e de EEs em *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina.

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1

Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite no Rio Grande do Sul entre 2011 e 2012

Mario de Menezes Coppola; João Rodrigo Gil de los Santos; Fabiana Quoos Mayer; Márcia Regina Loiko; Wladimir Padilha da Silva; Thomaz Lucia Júnior

Será submetido à revista Ciência Rural

1 **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite no Rio Grande do Sul entre**
2 **2011 e 2012**

3 **Occurrence of *Staphylococcus aureus* on mastitis cases in the Rio Grande do Sul state**
4 **during 2011 and 2012**

5
6 **Mario de Menezes Coppola; João Rodrigo Gil de los Santos; Fabiana Quoos Mayer;**
7 **Márcia Regina Loiko; Wladimir Padilha da Silva; Thomaz Lucia Júnior**

8
9 **RESUMO**

10 *Staphylococcus aureus* é o principal patógeno contagioso de mastite bovina, a sua
11 diferenciação de outras espécies de *Staphylococcus* é necessária para o controle da doença nos
12 rebanhos leiteiros, pois as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) provocam
13 formas menos severas da doença. Os objetivos desse estudo foram isolar *Staphylococcus* de
14 amostras de leite de casos de mastite bovina clínica e subclínica no Rio Grande do Sul e
15 confirmar a presença de *S. aureus* através da amplificação do gene *nuc* por PCR. Foram
16 analisadas 266 amostras de leite sendo 218 provenientes de vacas com mastite subclínica e 48
17 de casos clínicos. Bactérias do gênero *Staphylococcus* foram isoladas em 88 amostras. A
18 identificação por PCR confirmou 58 amostras como *S. aureus*, o que correspondeu a 21,7%
19 do total de amostras, 25 foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e
20 5 como coagulase positiva. Nas amostras de leite originárias de vacas com mastite subclínica
21 e nos casos clínicos o isolamento de *S. aureus* foi superior a SCN e *Staphylococcus* coagulase
22 positiva. *S. aureus* foi isolado em maior número de rebanhos, comparado a SCN e
23 *Staphylococcus* coagulase positiva. Os resultados deste estudo indicam que *S. aureus* é a
24 bactéria do gênero *Staphylococcus* mais importante em casos de mastite bovina no Estado do
25 Rio Grande do Sul.

26 Palavras chave: Mastite, *Staphylococcus aureus*, PCR.

27

28 **ABSTRACT**

29 *Staphylococcus aureus* is the major contagious pathogen of bovine mastitis, and the
30 differentiation from other *Staphylococcus* species is necessary to control that disease in dairy
31 cattle, because coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) cause less severe forms of mastitis.
32 The objectives of this study were to isolate *Staphylococcus* from milk samples from
33 subclinical and clinical cases in the Rio Grande do Sul state and to confirm the presence of *S.*
34 *aureus* through amplification of the *nuc* gene by PCR. Two hundred sixty six milk samples
35 were analyzed, 218 from cows with subclinical mastitis and 48 from clinical cases. The
36 *Staphylococcus* genus was identified in 88. The PCR identification confirmed 58 samples as
37 *S. aureus* which corresponded to 21,7% of all samples, 25 were classified as coagulase
38 negative *Staphylococcus* (CNS) and 5 as coagulase positive. In milk samples from cows with
39 subclinical mastitis and on clinical cases, the isolation of *S. aureus* was superior to CNS and
40 coagulase positive *Staphylococcus*. *S. aureus* was isolated on most herds compared to CNS
41 and coagulase positive *Staphylococcus*. The results of this study indicate that *S. aureus* is the
42 most important bacteria from *Staphylococcus* genus in cases of bovine mastitis in the Rio
43 Grande do Sul state.

44 Keywords: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, PCR.

45

46 **INTRODUÇÃO**

47 O rebanho leiteiro brasileiro é composto por cerca de 22,9 milhões de vacas, que
48 produziram em 2012 um volume de 22,338 bilhões de litros que foram adquiridos por
49 estabelecimentos industriais e que funcionam sob algum tipo de inspeção sanitária, federal,
50 estadual e municipal (IBGE, 2013). Entre os Estados brasileiros, o Rio Grande do Sul é o

51 segundo maior produtor, com cerca de 1,5 milhões de vacas, contribuindo com 15,4% do total
52 de leite produzido no país (IBGE, 2013).

53 A mastite é uma inflamação da glândula mamária, geralmente de origem infecciosa,
54 que pode ocorrer na forma clínica ou subclínica (BRADLEY, 2002; BLOWEY &
55 EDMONDSON, 2010). O controle e tratamento da mastite são grandes desafios para os
56 países produtores de leite, por ser uma doença endêmica que afeta diretamente a glândula
57 mamária reduzindo a quantidade e a qualidade do leite (BLOWEY & EDMONDSON, 2010;
58 RUEGG, 2012). Trabalhos realizados nos Estados Unidos da América (CHA et al., 2011),
59 Reino Unido (KOSSAIBATI & ESSLEMONT, 1997) e Brasil (LOPES et al., 2012) relataram
60 elevadas perdas econômicas devido a essa enfermidade.

61 *Staphylococcus aureus* é considerado um agente importante, tendo sido o principal
62 patógeno isolado no Brasil em amostras de todos os quartos mamários de vacas com e sem
63 mastite (BRITO et al., 1999) e em amostras de vacas com mastite (RIBEIRO et al., 2009;
64 BANDEIRA et al., 2012). No entanto, outros autores detectaram maior ocorrência de
65 *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) em relação a *S. aureus* (FREITAS et al., 2005;
66 MARQUES et al., 2013).

67 No diagnóstico de mastite, a prova da coagulase é utilizada para diferenciar *S. aureus*
68 de *Staphylococcus* não produtores de coagulase (SEARS & MCCARTHY, 2003). Entretanto,
69 *S. hyicus* e *S. intermedius* são outras espécies que podem ser coagulase positiva e podem ser
70 isoladas do leite (ROBERSON et al., 1996; SCHLEIFER & BELL, 2009). Outro teste
71 utilizado para identificar *S. aureus* é a detecção da enzima termonuclease, porém *S. hyicus* e
72 *S. intermedius* também podem apresentar reação positiva (SILVA et al., 2000; BARON et al.,
73 2004; SCHLEIFER & BELL, 2009).

74 Métodos genotípicos para identificação de espécies de *S. aureus* apresentam maior
75 poder discriminatório que as técnicas fenotípicas e são independentes da expressão de genes

76 específicos em condições de laboratório (STEPÁN et al., 2004). *S. aureus* pode ser
77 identificado utilizando-se reação em cadeia da polimerase (PCR) através da amplificação do
78 gene da termonuclease estável (*nuc*) que codifica para a termonuclease dessa bactéria. A
79 especificidade do gene *nuc* para identificação de *S. aureus* foi demonstrada por outros autores
80 em bactérias isoladas ou em amostras clínicas. BRAKSTAD et al. (1992) observaram alta
81 especificidade ao detectar *S. aureus* por PCR utilizando a amplificação do gene *nuc* em
82 amostras de sangue e fluidos corporais humanos. CREMONESI et al. (2005) utilizaram a
83 amplificação do gene *nuc* para desenvolver um PCR multiplex (mPCR) para identificação de
84 *S. aureus* enterotoxigênicos isolados de leite e produtos lácteos. GRABER et al. (2007)
85 desenvolveram um PCR para detecção de *S. aureus* em amostras de leite de vacas com
86 mastite através da amplificação do gene *nuc* e relataram alta especificidade e sensibilidade.
87 GANDRA et al. (2011) desenvolveram um mPCR para identificação de *S. aureus*, *S.*
88 *intermedius* e *S. hyicus* utilizando a sequência do gene *nuc*. A identificação de *S. aureus* em
89 isolados de mastite bovina por PCR através da amplificação do gene *nuc* foi utilizada também
90 por outros autores (SILVA et al., 2013; RALL et al., 2014).

91 *S. aureus* é um patógeno contagioso, transmitido de vacas infectadas para não
92 infectadas (FOX & GAY et al., 1993; SEARS & MCCARTHY, 2003; ZADOKS et al., 2011)
93 e podem provocar infecções intramamárias persistentes (MORK et al., 2012). *S. aureus*
94 provoca quadros mais severos da doença em comparação às espécies de *Staphylococcus*
95 coagulase negativa que provocam mastite subclínica ou mastite clínica menos severa
96 (TAPONEN & PYÖRÄLÄ, 2009). Por essas razões, a identificação de *S. aureus* envolvidos
97 em casos de mastite bovina é importante para adoção de medidas de controle que reduzam a
98 transmissão do agente entre os animais, tais como higiene da ordenha, adoção de linha de
99 ordenha, realizando a ordenha das vacas não infectadas primeiro e terapia antimicrobiana
100 durante a secagem das vacas (SEARS & MCCARTHY, 2003; KEEFE, 2012). Práticas de

101 manejo associados à alta contagem de células somáticas em leite de tanque foram estudadas
102 por SOUZA et al. (2005), que identificaram como fatores de risco a não adoção de linha de
103 ordenha, alimentação durante a ordenha e ausência de antissepsia dos tetos após a ordenha. O
104 manejo inadequado, a falta de treinamento dos ordenadores, o uso de equipamentos de
105 ordenha sem manutenção periódica e a não utilização de diagnóstico microbiológico para
106 mastite foram fatores de risco apontados por COENTRÃO et al. (2008) para a ocorrência de
107 mastite subclínica em rebanhos leiteiros.

108 Os objetivos desse estudo foram isolar *Staphylococcus* em amostras de leite de casos
109 de mastite bovina clínica e subclínica no Rio Grande do Sul e confirmar a presença de *S.*
110 *aureus* através da amplificação do gene *nuc* por PCR.

111 **2 MATERIAL E MÉTODOS**

112 **2.1 Amostras de leite**

113 Amostras de leite de vacas previamente diagnosticadas com mastite subclínica e
114 clínica (n = 266) foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de
115 Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), situado no município de Eldorado do Sul
116 (RS), entre janeiro de 2011 até dezembro de 2012. Duzentas e vinte e seis eram amostras
117 individuais e 40 eram amostras de mais de um quarto mamário da mesma vaca, representando
118 246 animais analisados quanto à presença de *Staphylococcus* no leite. O critério de
119 classificação como amostras clínicas foi a presença de alterações macroscópicas no leite, tais
120 como presença de grumos e coloração alterada, e as amostras subclínicas foram identificadas
121 através dos resultados do *California Mastitis Test* (CMT) ou da contagem de células
122 somáticas. Destas, 218 tinham o diagnóstico de mastite subclínica (82%) e 48 eram de casos
123 clínicos (18%). Foram recebidas amostras de leite de 107 rebanhos leiteiros, localizados em
124 três mesorregiões do Rio Grande do Sul (FEE, 2013), sendo 96 da mesorregião Noroeste, 8 da
125 Metropolitana e 3 da Centro-Oriental. Essas amostras foram provenientes de 26 municípios,

126 sendo 17 situados na mesorregião Noroeste, 6 na Metropolitana e 3 na Centro-Oriental.
127 Quanto ao número de amostras de leite por rebanho, de 52 propriedades foi remetida uma
128 amostra, de 30 foram 2 amostras, de 9 foram 3 amostras, de 5 foram 4 amostras e de 11 mais
129 de 5 amostras.

130 **2.2 Análise microbiológica, isolamento e identificação bioquímica de *S. aureus***

131 As amostras de leite foram semeadas em placas de Petri com ágar sangue contendo 5%
132 de sangue ovino, incubadas em condições aeróbias a 37 °C, por 24 até 48 horas. Os isolados
133 foram identificados através da coloração de Gram e as bactérias classificadas como cocos
134 Gram-positivos foram submetidos à prova da catalase. Os isolados classificados como
135 *Staphylococcus* foram caracterizados bioquimicamente através do teste da coagulase livre em
136 tubo com plasma de coelho liofilizado (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil) e fermentação de
137 Manitol e Maltose. Os isolados com reação positiva na prova da Coagulase e na fermentação
138 de Maltose e Manitol foram classificados como *S. aureus*, conforme descrito por BARROW
139 & FELTHAM (2004). Após a identificação bioquímica, essas amostras em cultura pura foram
140 submetidas ao processo de liofilização em liofilizador de bancada (EDWARDS®, Sussex,
141 Reino Unido) para posteriormente serem submetidas à PCR.

142 **2.3 Identificação de *S. aureus* por PCR**

143 **2.3.1 Isolados bacterianos**

144 Como controle positivo da reação, foi utilizada a cepa padrão de *S. aureus* FRI-S6.

145 **2.3.2 Extração do DNA**

146 A extração do DNA dos isolados foi realizada de acordo com o protocolo descrito
147 por MATTHEWS et al. (1997), com modificações. Os isolados liofilizados foram cultivados
148 em ágar *brain-heart-infusion* (BHI) a 37 °C durante 24 horas e 2-3 colônias foram
149 transferidas para um microtubo contendo 100µL de tampão TAE, até atingir a turbidez 0,5 na
150 escala de McFarland. Posteriormente, em cada microtubo, foram adicionados 100µL de

151 solução de Lisostafina (Sigma®, St. Louis, EUA), na concentração de 100µg/mL. Esses
152 microtubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 45 minutos. Após esse período,
153 foram acrescentados 20µL de solução de tampão TEB + 20%SDS e 3µL de Proteinase-K
154 (Life Biotechnologies®, Carlsbad, EUA). Os microtubos foram incubados em banho-maria a
155 55 °C, durante 1 hora. A seguir, adicionou-se 200µL de NaCl 5M e os microtubos foram
156 colocados em uma centrífuga refrigerada (Life Biotechnologies®, Carlsbad, EUA) e
157 centrifugados a 14.000 x g a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos
158 microtubos, aos quais foram acrescentados 200µL de fenol e 200µL de clorofórmio. Os
159 microtubos foram submetidos à centrifugação de 14.000 x g, a 4 °C por 5 minutos. O
160 sobrenadante foi transferido para outro microtubo, no qual foram adicionados 400µL de
161 etanol absoluto gelado, para a precipitação do DNA, durante 1 hora. Posteriormente, os
162 microtubos foram centrifugados a 14.000 x g a 4 °C, por 10 minutos. Após o descarte do
163 sobrenadante, foram adicionados 300µL de etanol a 70%. Procedeu-se a mais uma
164 centrifugação a 14.000 x g a 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os
165 microtubos incubados a 37 °C até a evaporação completa do etanol e a seguir o *pellet* foi
166 suspenso em 30µL de água ultrapura estéril. Após o processo de extração, a concentração de
167 DNA de cada amostra foi estimada em um espectrofotômetro quantificador de DNA (Loccus
168 Biotechnology®, Cotia, São Paulo, Brasil).

169 **2.3.3 Identificação de *S. aureus* através da PCR**

170 Para identificação de *S. aureus*, realizou-se a amplificação do gene *nuc*, através dos
171 *primers* descritos por CREMONESI et al. (2005). A sequência de oligonucleotídeos utilizados
172 e o tamanho do produto de amplificação são apresentados na Tabela 1.

173 Para a PCR, foi preparada uma mistura contendo 0,75µL de cloreto de magnésio,
174 1µL de dNTP, 1,5µL de tampão para PCR, 0,5µL de cada *primer* e 0,1µL de Taq-DNA
175 polimerase (todos obtidos de Invitrogen®, Carlsbad, EUA), diluídos em água ultrapura estéril,

176 totalizando um volume de 24 μ L. A essa mistura, acrescentou-se 1 μ L do DNA extraído na
177 concentração de 100ng/ μ L, totalizando 25 μ L por amostra. Para o controle negativo da reação,
178 não se adicionou DNA à mistura.

179 As amostras foram colocadas em um termociclador (Applied Biosystems®, Foster
180 City, EUA) e submetidas a um ciclo de 95 °C, por 5 minutos para desnaturação inicial do
181 DNA. Após, foi realizada a amplificação, consistindo de 40 ciclos com extensão a 95 °C por 1
182 minuto, seguido por anelamento a 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, para extensão.
183 Um ciclo final de 72 °C por 7 minutos completou a extensão final.

184 Para a visualização e análise dos produtos amplificados, os produtos da PCR, foram
185 submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (Promega®, Madison, EUA) a 1,5%, com
186 brometo de etídio (Amresco®, Solon, EUA), sob uma voltagem de 95V durante
187 aproximadamente 30 minutos. A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram
188 realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber-
189 Lourmat®, Marne La Vallée, França), e o tamanho dos produtos amplificados verificado por
190 comparação com os padrões de peso molecular de 50 pares de bases (Invitrogen®, Carlsbad,
191 EUA).

192 **2.4 Análise estatística**

193 As amostras foram agrupadas de acordo com a data de recebimento em quatro
194 estações do ano: verão (meses de janeiro, fevereiro e dezembro), outono (março a maio),
195 inverno (junho a agosto) e primavera (setembro a novembro). Foram geradas distribuições de
196 frequências para ocorrência de *S. aureus* por tipo de mastite, mesorregião e estação do ano.
197 As frequências foram comparadas pelo teste do chi-quadrado. Todas as análises foram
198 conduzidas com o programa Statistix® (2008).

199 **3 RESULTADOS**

200 Das 266 amostras de leite analisadas, foi detectada a presença de bactérias do gênero

201 *Staphylococcus* em 88 (33%). Na prova da coagulase 62 isolados apresentaram reação
202 positiva e 26 foram negativos. Na prova de fermentação de manitol e maltose, esses 62
203 isolados apresentaram reação positiva. A PCR confirmou a presença de *S. aureus* em 58
204 isolados coagulase positiva, conforme a Tabela 2. O resultado da eletroforese da PCR do gene
205 *nuc* da cepa padrão de *S. aureus* FRI-S6 está demonstrado na figura 1. Nas amostras de leite
206 originárias de vacas com mastite subclínica e nos casos clínicos o isolamento de *S. aureus* foi
207 superior a SCN e *Staphylococcus* coagulase positiva (Tabela 2). *S. aureus* foi isolado em mais
208 rebanhos, comparado a SCN e *Staphylococcus* coagulase positiva de acordo com a tabela 2.
209 Na comparação pelo teste do chi-quadrado, o isolamento de *S. aureus* foi mais frequente nos
210 meses da primavera do que no outono ($P < 0,05$), mas não houve diferença entre as demais
211 estações (Tabela 3).

212 **4 DISCUSSÃO**

213 No presente estudo *S. aureus* foi identificado em 21,7% das amostras de leite e em
214 36,2% das propriedades que submeteram amostras para exame microbiológico ao laboratório,
215 superior à frequência de SCN e *Staphylococcus* coagulase positiva. Os resultados encontrados
216 foram próximos ao estudo realizado na região Sul do Rio Grande do Sul por BANDEIRA et
217 al. (2012) que identificaram *S. aureus* em 17,6% dos casos através de provas fenotípicas. Essa
218 semelhança entre os resultados pode estar relacionada às características da criação e manejo
219 das propriedades estudadas no Estado. Os resultados também foram semelhantes aos
220 encontrados em Minas Gerais por BRITO et al. (1999) que isolaram *S. aureus* em 19,2% das
221 amostras de todos os quartos mamários de vacas diagnosticadas com mastite e com escore
222 negativo no CMT, sugerindo que os animais inicialmente identificados como negativos por
223 CMT podem servir de fonte de infecção para o rebanho. A frequência encontrada no presente
224 trabalho foi superior aos valores encontrados por outros autores que também utilizaram a
225 amplificação do gene *nuc* para identificar *S. aureus* em outras regiões. SILVA et al. (2013)

226 detectaram *S. aureus* em 6,5% das amostras de leite em rebanhos leiteiros no Estado de São
227 Paulo e RALL et al. (2014) em 4,8% amostras de leite com mastite subclínica também em
228 propriedades no Estado de São Paulo. Entretanto ainda em São Paulo, RIBEIRO et al. (2009)
229 encontraram uma frequência maior, identificando o agente em 25,7% das amostras através de
230 testes fenotípicos. Essa variação entre os resultados pode estar relacionada às características
231 da criação e manejo das propriedades estudadas, pois RIBEIRO et al. (2009) conduziram o
232 estudo em pequenas propriedades rurais que utilizam mão de obra essencialmente familiar.

233 A ocorrência de *S. aureus* nos rebanhos é importante de ser avaliada por ser um
234 patógeno contagioso e a presença de uma vaca infectada apresentar potencial para transmissão
235 do agente ao restante do rebanho. FERGUSON et al. (2007) relataram presença de *S. aureus*
236 em 88,1% dos rebanhos estudados e BRITO et al. (1999) em 98%. A ocorrência de *S. aureus*
237 por rebanhos nesse trabalho foi menor que a relatada por outros autores. Essa diferença
238 possivelmente decorre do fato de terem sido submetidas poucas amostras por rebanho para
239 exame microbiológico, 82 das 107 propriedades remeteram até 2 amostras de leite ao
240 laboratório.

241 Quanto à presença de SCN, nesse estudo foi encontrada uma frequência menor em
242 relação a *S. aureus*, porém sua ocorrência em 14,5% dos casos de mastite clínica sugere que
243 sua importância na doença não pode ser desconsiderada. Outros autores relataram maior
244 ocorrência de SCN comparado a *S. aureus*. Em Pernambuco, FREITAS et al. (2005)
245 detectaram SCN em 36% das amostras e *S. aureus* em 13%, enquanto MARQUES et al.
246 (2013) identificaram SCN em 58% das amostras de rebanhos do Rio de Janeiro. Em estudo
247 conduzido em São Paulo, RALL et al. (2014) isolaram SCN em 22,6% e *S. aureus* em 4,8%
248 amostras de leite com mastite subclínica. Espécies coagulase negativas encontradas em locais
249 extramamários, ocasionalmente podem provocar mastite, porém podem ser parte da
250 microbiota da pele ou contaminantes de origem ambiental (TAPONEN et al., 2008). Quanto à

251 origem, THORBERG et al. (2006) detectaram que as mesmas cepas de *S. epidermidis* foram
252 identificadas no leite e nas mãos de ordenhadores, indicando que essas infecções
253 intramamárias podem ser de origem humana.

254 No presente trabalho, *Staphylococcus* coagulase positiva foi isolado em 1,9% das
255 amostras de leite e em 3,7% dos rebanhos. CAPURRO et al. (1999) identificaram que 97%
256 das espécies coagulase positiva isoladas de casos de mastite eram *S. aureus*, 2% *S.*
257 *intermedius* e 1% *S. hyicus*. Em casos de mastite subclínica na região Sul do Rio Grande do
258 Sul, 85,7% das colônias consideradas coagulase positivas corresponderam a *S. aureus*, 8,5%
259 com *S. intermedius* e 5,8% com *S. hyicus*. (BANDEIRA et al., 2012). Por serem isolados
260 ocasionalmente em casos de mastite e serem pouco estudados a importância de
261 *Staphylococcus* coagulase positiva na patogenia da mastite ainda é incerta.

262 No que diz respeito à distribuição dos isolados de *S. aureus* em amostras de mastite
263 ao longo do ano, o presente estudo identificou uma maior frequência de isolados na primavera
264 do que no outono. Embora tenham sido recebidas menos amostras durante a primavera que
265 em relação às outras estações, a frequência ainda assim foi superior. Porém, existem relatos de
266 maior frequência de isolamentos no inverno em relação às outras estações do ano, e na
267 primavera, em relação ao outono e verão (MAKOVEC & RUEGG, 2003). Ainda,
268 FERGUSON et al. (2007) relataram maior frequência de isolamento de *S. aureus* na
269 primavera e no inverno em comparação com o outono.

270 A identificação da frequência de *S. aureus* em casos de mastite é importante para a
271 adoção de medidas de controle e tratamento mais eficazes. Devido à natureza contagiosa do
272 agente, uma vaca infectada por *S. aureus* pode servir de fonte de infecção para outras. VAN
273 DE BORNE et al. (2010) sugerem que o tratamento de mastite subclínica por *S. aureus* é mais
274 efetivo no estágio inicial da infecção, porém se não há cura de todos os quartos mamários
275 infectados, há alto risco de ocorrer infecção dos quartos não infectados sendo que as infecções

276 subclínicas não tratadas podem se tornar clínicas (ZADOKS et al., 2011).

277 Os resultados encontrados em nosso trabalho demonstram que *S. aureus* é um agente
278 importante em casos de mastite bovina no Rio Grande do Sul e revelam que SCN pode ser
279 considerado um patógeno relevante para a doença. Estudos envolvendo um número de maior
280 de propriedades, com amostras de todas as mesorregiões do Estado e com análise de fatores
281 de risco relacionados ao manejo poderiam fornecer mais informações a respeito da frequência
282 observada para esses agentes. As técnicas moleculares apresentam melhor poder
283 discriminatório e mais rapidez na obtenção de resultados em comparação com as técnicas
284 fenotípicas, porém fatores como o custo de equipamentos e reagentes e a necessidade de
285 especialização de mão de obra podem limitar seu uso como técnica de rotina laboratorial. No
286 entanto as técnicas moleculares permitem a obtenção de resultados mais precisos em estudos
287 sobre a ocorrência, epidemiologia e a diversidade de isolados em uma determinada região.
288 Pesquisas sobre a presença de genes associados à virulência e suas combinações poderiam
289 fornecer informações a respeito da patogenia e das características genéticas dos isolados da
290 região, o que poderia promover a adoção de medidas de controle mais eficientes.

291 **5. CONCLUSÃO**

292 A ocorrência de *S. aureus* foi superior a SCN e *Staphylococcus* coagulase positiva
293 em amostras de leite de vacas com mastite subclínica e clínica e nos rebanhos leiteiros no Rio
294 Grande do Sul. O isolamento *S. aureus* foi mais frequente nos meses da primavera do que no
295 outono.

296

297 **6 REFERÊNCIAS**

298 BANDEIRA, F.S. et al. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina
299 subclínica na região sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.
300 80, n.1, p.1-6, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572013000100001>>

- 301 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1590/S1808-16572013000100001.
- 302 BARON, F. et al. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus*
303 and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.67, n.10, p.2302-
304 2305, 2004.
- 305 BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. **Cowan and Steel's manual for the identification of**
306 **medical bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004, 331p.
- 307 BLOWEY, R.W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. 2.ed. Winslow:
308 CABI, 2010, 226p.
- 309 BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, Amsterdam,
310 v.163, n.1, p.1-13, 2002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/tvj.2002.0724>>. Acesso
311 em: 26 fev. 2014. doi:10.1053/tvj.2002.0724.
- 312 BRAKSTAD, O.G. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction
313 amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.7, p.
314 1654-1660, 1992. Disponível em:<<http://jcm.asm.org/content/30/7/1654>> Acesso em: 26 fev.
315 2014.
- 316 BRITO, M.A.V.P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de
317 todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivos Brasileiros de Medicina**
318 **Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.2, p.129-135, 1999. Disponível em:
319 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09351999000200001>>. Acesso em 26 fev. 2014.
320 doi:10.1590/S0102-09351999000200001.
- 321 CAPURRO, A. et al. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine
322 milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.40, n.4, p.315-321, 1999.
- 323 CHA, E. et al. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows
324 estimated by dynamic programming. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.94, n.9,
325 p.4476-4487, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-4123>>. Acesso em:

- 326 26 fev. 2014. doi:10.3168/jds.2010-4123.
- 327 COENTRÃO, C.M. et al. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras.
328 **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.2,
329 p.283-288, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000200001>>.
330 Acesso em 26 fev. 2014. doi: 10.1590/S0102-09352008000200001.
- 331 CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of
332 *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products.
333 **Molecular and Cellular Probes**, London, v.19, n.5, p.299-305, 2005. Disponível em:<
334 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2005.03.002>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
335 doi:10.1016/j.mcp.2005.03.002.
- 336 FEE, Fundação Estadual de Estatística do Rio Grande do Sul. www.fee.rs.gov.br. Acesso em
337 30 de dezembro de 2013.
- 338 FERGUSON, J.D. et al. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily from 2000 to
339 2006. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.12, p.5798-5813, 2007. Disponível em:
340 <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-903>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:10.3168/jds.2006-903.
- 341 FOX, L.K.; GAY, J.M. Contagious mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food**
342 **Animal Practice**, Philadelphia, v.9, n.3, p.475-487, 1993.
- 343 FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus*
344 coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de
345 Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.
346 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700012>>. Acesso em: 26 fev.
347 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2009000700012.
- 348 GANDRA, E.A. et al. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase
349 positive *Staphylococcus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, n.4, p. 946-
350 949, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000400019>>. Acesso

- 351 em: 26 fev. 2014. doi:10.1590/S0101-20612011000400019.
- 352 GRABER, H.U. et al. Development of a highly sensitive and specific assay to detect
353 *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90,
354 n.10, p.4661-4669, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-902>>. Acesso
355 em: 26 fev. 2014. doi:10.3168/jds.2006-902.
- 356 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Online. Disponível em
357 <http://ibge.gov.br>, acesso em janeiro de 2014.
- 358 KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for
359 management of mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**,
360 Philadelphia, v.28, n.2, p.203-216, 2012. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/](http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010)
361 [j.cvfa.2012.03.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010)>. Acesso em 26 fev. 2014. doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.010.
- 362 KOSSAIBATI, M.A.; ESSLEMONT, R.J. The costs of production diseases in dairy herds in
363 England. **Veterinary Journal**, London, v.154, n.1, p.41-51, 1997. Disponível em:<
364 [http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80007-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80007-3)>. Acesso em 26 fev. 2014.
365 doi:10.1016/S1090-0233(05)80007-3.
- 366 LOPES, M.A. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos
367 leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.4, p.477-483, 2012. Disponível
368 em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572012000400003>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
369 doi:10.1590/S1808-16572012000400003.
- 370 MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological
371 examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86,
372 n.11, p.3466–3472, 2003. Disponível em:<[http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/](http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030203739514.pdf)
373 [journals/0022-0302/PIIS0022030203739514.pdf](http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030203739514.pdf). Acesso em: 26 fev. 2014.
- 374 MARQUES, V.F. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus spp.* e
375 de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária**

- 376 **Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.161-170, 2013. Disponível
377 em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200005>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
378 doi:10.1590/S0100-736X201300020000.
- 379 MATTHEWS, K.R. et al. Identification and differentiation of coagulase negative
380 *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Ames, v.
381 60, n.6, p. 686-688, 1997.
- 382 MORRIS, T. et al. Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder.
383 **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.159, n.1-2, p.171-180, 2012. Disponível em:
384 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.034>>. Acesso em 26 fev. 2014. doi:
385 10.1016/j.vetmic.2012.03.034.
- 386 RALL, V.L. et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes
387 isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy**
388 **Science**, Champaign, v.97, n.2, p.829-837, 2014. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.3168/](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7226)
389 [jds.2013-7226](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7226)>. Acesso em 26 fev. 2014. doi: 10.3168/jds.2013-7226.
- 390 RIBEIRO, M.G. et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de
391 antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária**
392 **Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n.1, p.52-58, 2009. Disponível em:
393 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100008>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
394 doi:10.1590/S0100-736X2009000100008.
- 395 ROBERSON, J.R. et al. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than
396 *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal Veterinary Research**,
397 Chicago, v.57, n.1, p.54-58, 1996.
- 398 RUEGG, P.L. New perspectives in udder health management. **The Veterinary Clinics of**
399 **North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v.28, n.2, p.149-63, 2012. Disponível
400 em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.001>>. Acesso em 26 fev. 2014.

- 401 doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.001.
- 402 SEARS, P.M.; MCCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis.
403 **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v.19, n.3,
404 p.171-185, 2003.
- 405 SCHLEIFER, K.H.; BELL, J.A. Genus I: *Staphylococcus* In: **Bergey's manual of systematic**
406 **bacteriology**, v.3, 2.ed., 2009, p. 392-421.
- 407 SILVA, W.P. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus*
408 in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of**
409 **Microbiology**, São Paulo, v.31, n.2., p.103-106, 2000. Disponível em:
410 <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000200008>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
411 doi:10.1590/S1517-83822000000200008.
- 412 SILVA, N.C. et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible
413 *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**,
414 Champaign, v.96, n.11, p.6856-6862, 2013. Disponível em <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6719)
415 2013-6719>. Acesso em 26 fev. 2014. doi:10.3168/jds.2013-6719.
- 416 SOUZA, G.N. et al. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite
417 do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de**
418 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, supl.2, p.251-260, 2005.
419 Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000800018> >. Acesso em: 26 fev.
420 2014. doi:10.1590/S0102-09352005000800018.
- 421 STATISTIX®. Statistix® 9 Analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008.
- 422 STEPÁN, J. et al. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. **Folia**
423 **Microbiologica**, Praga, v.49, n.4, p.353-386, 2004. Disponível em:
424 <http://www.cssm.info/priloha/fm2004_353.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2014.
- 425 TAPONEN, S. et al. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary

426 sites and intramammary infections in a single dairy herd. **Journal of Dairy Research**,
427 London, v.75, n.4, p.422-429, 2008. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1017/
428 S0022029908003312](http://dx.doi.org/10.1017/S0022029908003312)>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:10.1017/S0022029908003312.

429 TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis
430 - not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam,
431 v.134, n.1, p.29-36, 2009. Disponível em:<[http://dx.doi.org/ 10.1016/j.vetmic.2008.09.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011) >.
432 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.011.

433 THORBERG, B.M. et al. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from
434 bovine milk and human skin. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.115, n.1-3, p.163-
435 172, 2006. Disponível em:<[http://dx.doi.org/ 10.1016/j.vetmic.2006.01.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.013) >. Acesso em: 26
436 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.013.

437 VAN DEN BORNE, B.H.P. et al. Therapeutic effects of antimicrobial treatment during
438 lactation of recently acquired bovine subclinical mastitis: Two linked randomized field trials.
439 **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.93, n.1, p.218-233, 2010. Disponível
440 em:<<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2567>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
441 10.3168/jds.2009-2567.

442 ZADOKS, R.N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and
443 comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**,
444 New York, v.16, n.4, p.357-372, 2011. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1007/s10911011-
445 9236-y](http://dx.doi.org/10.1007/s10911011-9236-y) >. Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1007/s10911-011-9236-y.

446

447

448

449

450

451 Tabela 1: Distribuição das amostras de leite por tipo de mastite e rebanhos entre as
 452 mesorregiões

Mesorregião	N° de Rebanhos	Amostras por tipo de mastite		Total
		Subclínica	Clínica	
Centro-Oriental ^A	3	52	5	57
Metropolitana ^B	8	17	5	22
Noroeste ^C	96	149	38	188
Total	107	218	48	266

453

454 A: Latitude 29°-30°Sul; Longitude 51°-52°Oeste.

455 B: Latitude 29°-31°Sul; Longitude 50°-51°Oeste.

456 C: Latitude 27°-29°Sul; Longitude 51°-55°Oeste.

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473 Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos usados como *primers*

Gene	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho dos produtos amplificados (pb)
Termonuclease	NUC-forward	AGTTCAGCAAATGCATCACA	400
	NUC-reverse	TAGCCAAGCCTTGACGAACT	

474 *Primers* descritos por CREMONESI et al. (2005)

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493 Tabela 3: Frequência de isolamento de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e
 494 *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de leite por rebanhos

Isolados	Nº de rebanhos (%)
<i>S. aureus</i>	38 (35,5)
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	18 (16,8)
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	4 (3,7)
Total	107 (100)

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515 Tabela 4: Frequência de isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase
 516 negativo e *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de leite por tipo de mastite

Isolados	Mastite Subclínica (%)	Mastite Clínica (%)	Total de amostras (%)
<i>S. aureus</i>	43 (19,7)	15 (31,2)	58 (21,8)
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	18 (8,3)	7 (14,5)	25 (9,4)
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	5 (2,3)	-	5 (1,9)
Total	218 (100)	48 (100)	266 (100)

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536 Tabela 5: Frequência de isolamento de *S. aureus* em amostras de leite de casos de mastite
 537 bovina por estação do ano

Estação do ano*	Amostras	Isolados de <i>S. aureus</i> (%)
Verão	55	15 (27,2) ^{abc}
Outono	100	17 (17,0) ^b
Inverno	69	12 (17,4) ^{abc}
Primavera	44	14 (31,8) ^c

538 ^{abc}Frequências com expoentes diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

539 * Verão (meses de janeiro, fevereiro e dezembro), outono (março a maio), inverno (junho a
 540 agosto) e primavera (setembro a novembro).

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

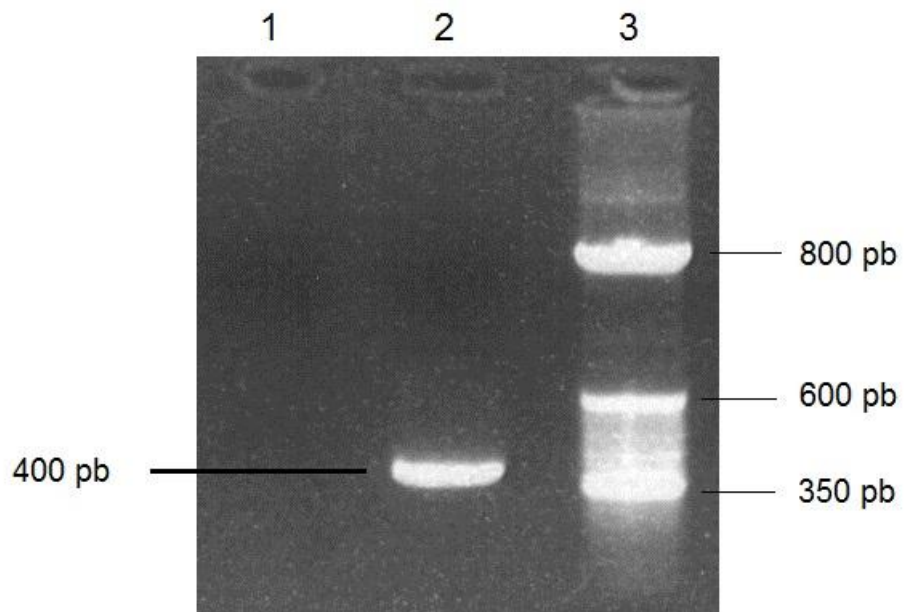
551

552

553

554

555



556

557 Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene *nuc*.

558 Coluna 1: controle negativo, sem DNA.

559 Coluna 2: controle positivo FRI-361 (400 pb).

560 Coluna 3: marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen®).

3.2 Artigo 2

**Identificação de grupos *agr* e enterotoxinas em *Staphylococcus aureus*
isolados de casos de mastite bovina por PCR**

**Mario de Menezes Coppola; João Rodrigo Gil de los Santos; Fabiana Quoos
Mayer; Márcia Regina Loiko; Wladimir Padilha da Silva; Thomaz Lucia Júnior**

Será submetido à revista Ciência Rural

1 **Identificação de grupos *agr* e enterotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de casos**
2 **de mastite bovina por PCR**

3
4 **Identification of *agr* groups and enterotoxins on *Staphylococcus aureus* isolated from**
5 **bovine mastitis cases by PCR**

6
7 **Mario de Menezes Coppola; João Rodrigo Gil de los Santos; Fabiana Quoos Mayer;**
8 **Márcia Regina Loiko; Wladimir Padilha da Silva; Thomaz Lucia Júnior**

9
10 **RESUMO**

11 *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina apresentam genes associados à
12 virulência, tais como as enterotoxinas (EEs) e *locus agr* (*accessory gene regulator*). Como as
13 EEs clássicas são uma causa comum de intoxicação alimentar por ingestão de leite e produtos
14 lácteos, infecções intramamárias bovinas provocadas por *S. aureus* com esses genes podem
15 representar um risco para a saúde humana. O *locus agr* coordena o sistema *quorum sensing*
16 em *S. aureus* e pode ser dividido em quatro grupos (I, II, III e IV). Os objetivos desse estudo
17 foram identificar os genes das EEs A, B e D e os grupos *agr* I-IV em *S. aureus* isolados de
18 casos de mastite bovina no Estado do Rio Grande do Sul e a relação entre os genes dos grupos
19 *agr* e de EEs. Noventa isolados de *S. aureus* foram testados por PCR para a presença desses
20 genes e a maior frequência quanto aos genes *agr* foi de *agr*-III, seguido por *agr*-I. Quanto à
21 distribuição por rebanhos, foi identificada maior ocorrência do gene *agr*-III. O gene de EEs
22 mais encontrado foi *sea* e quanto a relação entre gene de EEs e *agr*, foi observada associação
23 significativa entre a presença de *sea* e *agr*-I.

24 **Palavras chave:** mastite, *Staphylococcus aureus*, *agr*, enterotoxinas.

26 ABSTRACT

27 *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis may present genes associated to
28 virulence, such as enterotoxins (SE) and *locus agr* (*accessory gene regulator*). As the
29 classical SE are common causes of foodborne diseases by ingestion of milk and dairy
30 products, intramammary infection by *S. aureus* presenting such genes may represent risk to
31 human health. The *locus agr* coordinates the *quorum sensing* system on *S. aureus* and may be
32 divided in four groups (I, II, III and IV). The objectives of this study were to identify the
33 occurrence of SE genes A, B e D and *agr* I-IV groups in *S. aureus* isolated from samples of
34 bovine mastitis from the Rio Grande do Sul state. Ninety isolates of *S. aureus* were tested
35 through PCR for the presence of such genes, and the most frequent *agr* gene, was *agr*-III,
36 followed by *agr*-I. On herds, the most occurrence gene was *agr*-III. The most frequent SE
37 gene found was *sea* and as for the relationship among SE genes and *agr* genes, occurred
38 association for *sea* and *agr*-I.

39 Keywords: mastitis, *Staphylococcus aureus*, *agr*, enterotoxins.

40

41 **1 INTRODUÇÃO**

42 *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina apresentam genes associados à
43 síntese de produtos relacionados à virulência, tais como adesinas, proteína A, cápsula e
44 exotoxinas que se distinguem em hemolisinas, leucocidinas, toxinas esfoliativas e
45 enterotoxinas (EEs) (KERRO-DEGO et al., 2002; ZECCONI et al., 2006). As EEs de *S.*
46 *aureus* são toxinas termoestáveis que atuam como superantígenos, por estimular a
47 proliferação de linfócitos-T (ORTEGA et al., 2010), sendo classificadas em 22 tipos
48 (HENNEKINNE et al., 2012). Os tipos A, B, C, D e E, denominadas de EEs clássicas, são
49 consideradas uma causa comum de intoxicação alimentar, sendo que o leite e os produtos
50 lácteos estão entre os alimentos associados a esses casos (ARGUDIN et al., 2010;

51 HENNEKINNE et al., 2012). A ocorrência de genes para EEs pode influenciar no
52 estabelecimento de mastite (HAVERI et al., 2007). MULLARKY et al. (2001) relataram que
53 isolados de mastite bovina com genes para enterotoxinas são mais resistentes a ação de
54 neutrófilos que aqueles que não os apresentam. ZECCONI et al. (2006) sugerem que
55 infecções intramamárias provocadas por isolados que apresentam esses genes podem
56 representar um risco para a saúde humana, devido a presença das EEs no leite.

57 *S. aureus* apresenta a habilidade de realizar o *quorum sensing*, processo na qual as
58 bactérias podem regular a expressão de genes, em resposta a variações na sua densidade
59 populacional (FUQUA et al., 1994; FUQUA et al., 2001; WATERS & BASSLER, 2005;
60 NOVICK & GEISINGER, 2008). Isso ocorre através da síntese de moléculas sinalizadoras
61 específicas chamadas de peptídeos autoindutores (AIP), que podem se difundir entre as
62 células. Na medida em que a população bacteriana aumenta, eleva-se a concentração
63 extracelular dos AIP, que ao atingir um nível crítico promovem a alteração na expressão de
64 determinados genes (FUQUA et al., 2001; WATERS & BASSLER, 2005). Em *S. aureus* o
65 sistema *quorum sensing* é coordenado pelo *locus agr* (*accessory gene regulator*), que é
66 composto por dois transcritores divergentes, RNA II e RNA III, cuja transcrição é coordenada
67 por dois promotores P2 e P3, respectivamente (JI et al., 1997; GILOT et al., 2002; NOVICK
68 & GEISINGER, 2008). O RNA II é um operon composto por quatro genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*
69 e *agrD*) que codificam a síntese de AgrA, B, C e D, respectivamente, e que ativam uma
70 cascata de auto-ativação e a síntese de AIP (NOVICK & GEISINGER, 2008; THOENDEL et
71 al., 2011). O RNA-III atua como uma molécula efetora do sistema *agr*; apresenta o gene *hld*
72 que codifica para síntese da hemolisina- δ , regula positivamente o gene *hla* promovendo a
73 síntese de hemolisina- α e reprime a tradução do gene *spa* inibindo a síntese da proteína A (JI
74 et al., 1997; GILOT et al., 2002; NOVICK & GEISINGER, 2008). Segundo LYONS &
75 NOVICK (2004), a ativação do *agr* promove ainda a produção e secreção das EEs B, C e D e

76 da toxina do choque tóxico-1 (TSST-1). O *locus agr* pode ser dividido em quatro grupos
77 categorizados de I até IV, devido à ocorrência de polimorfismo na sequência de aminoácidos
78 de AIP e dos receptores AgrC correspondentes (JI et al., 1997; JARRAUD et al., 2002;
79 GEORGE & MUIR, 2007). Esses grupos podem estar associados à ocorrência de quadros
80 clínicos em humanos (ANTUNES et al., 2010) e animais (BOYEN et al., 2009). Em casos de
81 mastite bovina *S. aureus* pertencentes ao grupo *agr-I* foram mais frequentemente
82 identificados na França por GILOT et al. (2002), Bélgica (BARDIAU et al., 2014) e
83 Argentina (BUZZOLA et al., 2007).

84 Os objetivos desse estudo foram identificar os genes das EEs A, B e D e os grupos
85 *agr I-IV* em *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina no Rio Grande do Sul, Brasil e a
86 relação entre os genes dos grupos *agr* e de EEs.

87

88 **2 MATERIAL E MÉTODOS**

89 **2.1 Isolados bacterianos**

90 Para avaliar a presença de genes para os grupos *agr* e das EEs A (*sea*), B (*seb*) e D
91 (*sed*), foram utilizados 90 isolados de *S. aureus* de casos mastite bovina no Rio Grande do
92 Sul, pertencentes ao banco de isolados do Laboratório de Bacteriologia do IPVDF. Esses
93 isolados eram provenientes de 59 rebanhos, sendo 50 localizados na mesorregião Noroeste, 6
94 na Metropolitana, 2 na Centro-Oriental e 1 na Sudeste. Setenta e oito isolados foram obtidos
95 de amostras individuais e 12 foram isolados de amostras de leite de mais de um quarto
96 mamário da mesma vaca. Quanto ao tipo de mastite, 79 isolados eram de mastite subclínica e
97 11 de casos clínicos. Como controles positivos da reação, foram utilizados os isolados de *S.*
98 *aureus* FRI S6 para os genes *sea* e *seb* e FRI 361 para *sed*. Os isolados P.19, P.20, P.21 e P.22
99 foram utilizados como controle positivo da reação, para os genes *agr-I*, *agr-II*, *agr-III* e *agr-*
100 *IV*, respectivamente.

101 **2.2 Primers**

102 Foi realizada a amplificação do gene termonuclease através da utilização dos *primers*
103 *nuc* descritos por CREMONESI et al. (2005), em todos os 90 isolados. Os *primers* utilizados
104 para a amplificação da seqüência de genes *agr-I*, *agr-II*, *agr-III* e *agr-IV* foram descritos por
105 SHOPSIN et al. (2003), sendo que o *primer* iniciador *Pan-agr* utilizado foi o mesmo para os
106 quatro genes *agr*. Para amplificação dos genes para EEs, foram utilizados os *primers sea* e *sed*
107 descritos por MONDAY & BOHACH (1999) e *seb* por MEHROTRA et al. (2000). A
108 seqüência de oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do produto de amplificação são
109 apresentados na Tabela 1.

110 **2.3 Extração do DNA**

111 A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada de acordo com o protocolo
112 descrito por MATTHEWS et al. (1997), com modificações. Isolados liofilizados de *S. aureus*
113 foram recuperados em ágar *brain-heart-infusion* (BHI) e transferidos para microtubos
114 contendo 100µL de tampão TAE, até atingir a turbidez 0,5 na escala de McFarland.
115 Posteriormente, em cada microtubo, foram adicionados 100µL de solução de Lisostafina
116 (Sigma®, St. Louis, EUA), na concentração de 100µg/mL. Esses microtubos foram incubados
117 em banho-maria a 37 °C, por 45 minutos. Após, foram acrescentados 20µL de solução de
118 tampão TEB + 20% SDS e 3µL de Proteinase-K (Life biotechnologies®, Carlsbad, EUA). Os
119 microtubos foram incubados em banho-maria a 55 °C, durante 1 hora. A seguir, foram
120 adicionados 200µL de NaCl 5M e os microtubos foram centrifugados a 14.000 x g a 4 °C por
121 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e acrescentaram-se 200µL
122 de fenol e 200µL de clorofórmio. Os microtubos foram colocados em uma centrífuga
123 refrigerada (Life Technologies®, Carlsbad, EUA) e submetidos à centrifugação de 14.000 x g
124 a 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foram
125 adicionados 400µL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA, durante 1 hora.

126 Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 14.000 x g a 4 °C, por 10 minutos. O
127 sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 300µL de etanol a 70%, ao conteúdo
128 resultante. Procedeu-se mais uma centrifugação a 14.000 x g a 4 °C, por 5 minutos. O
129 sobrenadante foi descartado e os microtubos foram incubados a 37 °C até a evaporação
130 completa do álcool. Após, o *pellet* foi suspenso em 30µL de H₂O ultrapura estéril. Em seguida
131 a concentração de DNA de cada amostra foi estimada em um espectrofotômetro quantificador
132 de DNA (Loccus Biotechnology®, Cotia, São Paulo, Brasil).

133 **2.4 PCR**

134 Todos os isolados foram submetidos a PCR para identificação do gene *nuc* de acordo
135 com o protocolo descrito por CREMONESI et al. (2005) com modificações. Para a PCR, foi
136 preparada uma mistura contendo 0,75µL de MgCl₂, 1µL de dNTP, 1,5µL de tampão para
137 PCR, 0,5µL de cada *primer* e 0,1µL de Taq-DNA polimerase diluídos em H₂O ultrapura
138 estéril, totalizando um volume de 24µL (todos os químicos obtidos de Invitrogen®, Carlsbad,
139 EUA). A essa mistura, acrescentou-se 1µL do DNA extraído, totalizando 25µL por amostra.
140 Para o controle negativo da reação, não se adicionou DNA à mistura. As amostras foram
141 colocadas em um termociclador (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) e submetidas a um
142 ciclo de 95 °C, para desnaturação inicial do DNA seguido pela amplificação, que consistia de
143 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, de anelamento a 56 °C por 1 minuto e
144 extensão a 72 °C por 1 minuto. Um ciclo final de 72 °C por 7 minutos completou a extensão
145 final.

146 Posteriormente após a confirmação dos isolados como *S. aureus*, a identificação dos
147 grupos agr foi realizada através de uma biplex PCR seguindo a metodologia descrita por
148 SHOPSIN et al. (2003) com adaptações. Foram preparadas duas soluções, uma contendo os
149 *primers agr* I e II, e outra contendo os *primers agr* III e IV. Para a PCR, foi preparada uma
150 mistura contendo 0,75µL de MgCl₂, 1µL de dNTP, 1,5µL de tampão para PCR, 0,5µL de

151 cada *primer* totalizando um volume de 24 μ L. A essa mistura acrescentou-se 1 μ L do DNA
152 extraído, totalizando 25 μ L por amostra. As amostras foram colocadas em um termociclador
153 (Applied Biosystems®, Foster City, EUA), conforme descrito acima.

154 Para identificação dos genes *sea*, *seb* e *sed* foram realizadas simplex PCR. Para
155 amplificação de *sea* e *seb* foi preparada uma mistura contendo 0,75 μ L de MgCl₂, 1 μ L de
156 dNTP, 2,5 μ L de tampão para PCR, 0,5 μ L de cada *primer* totalizando um volume de 24 μ L.
157 Para amplificação de *sed* foi utilizado 1,37 μ L de MgCl₂, com o mesmo volume dos demais
158 reagentes misturados em H₂O ultrapura estéril, até um volume de 24 μ L. A essa mistura
159 acrescentou-se 1 μ L do DNA extraído, totalizando 25 μ L por amostra. As amostras foram
160 colocadas em um termociclador (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) e submetidas a um
161 ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA. A amplificação
162 consistiu de 39 ciclos para *sea* e 40 para as demais. As condições de temperatura e tempo
163 durante os ciclos foram: desnaturação a 95 °C por 45 segundos, seguido por anelamento a 60
164 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto para *sea*; sequência de 95 °C por 1
165 minuto, seguido por 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, para *seb*; e para *sed* sequência
166 de 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos. Um ciclo final de
167 72 °C por 7 minutos completou a extensão.

168 Para visualização e análise dos produtos amplificados, os produtos da PCR, foram
169 submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (Promega®, Madison, EUA), a 1,5% com
170 brometo de etídio (Amresco®, Solon, EUA), sob uma voltagem de 95V durante
171 aproximadamente 30 minutos. As visualizações das bandas no gel e fotodigitalização foram
172 realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta, em um fotodocumentador (Vilber-
173 Lourmat®, Marne La Vallée, França). O tamanho dos produtos amplificados foi verificado
174 por comparação com os padrões de peso molecular de 50 pares de bases (Invitrogen®,
175 Carlsbad, EUA).

176 2.5 Análise estatística

177 Distribuições de frequências foram geradas para a ocorrência dos genes para os
178 grupos *agr* e enterotoxinas em *S. aureus* e a sua distribuição por tipo de mastite. A relação
179 entre a presença de genes para os grupos *agr* e as EEs analisadas foi comparada com o teste
180 de chi-quadrado. Todas as análises foram conduzidas com o programa Statistix® (2008).

181 3 RESULTADOS

182 A maior frequência quanto aos genes *agr* encontrados nos isolados estudados foi de
183 *agr*-III, seguido por *agr*-I (Tabela 2). Na figura 2 estão os resultados da padronização em gel
184 de agarose dos genes *agr*. Quanto à distribuição por rebanhos, foi identificada maior
185 ocorrência do gene *agr*-III, seguido por *agr*-I (Tabela 2). Nos isolados de mastite clínica foi
186 observada ocorrência de *agr*-I em 5 isolados, *agr*-III em 4 e *agr*-II em 2. O gene de EEs mais
187 encontrado foi *sea* conforme mostrado na Tabela 3. Os resultados da padronização em gel de
188 agarose estão dispostos na figura 1. Quanto à relação entre gene de EEs e grupos *agr* foi
189 observada associação significativa ($P < 0,05$) entre a presença de *sea* e *agr*-I (Tabela 3).

190 4 DISCUSSÃO

191 Neste estudo, a ocorrência de *agr*-III em *S. aureus* isolados de mastite bovina e nos
192 rebanhos leiteiros foi superior aos resultados encontrados por outros autores em isolados de
193 mastite bovina. Em isolados originários da Bélgica, a ocorrência dos grupos *agr*-I, II, III e IV
194 corresponderam respectivamente a 72,1%, 25,8%, 1,7% e 0,4% (BARDIAU et al., 2014).
195 Maior ocorrência de *agr*-I (54,7%) também foi identificada por ALVES et al. (2009),
196 utilizando isolados provenientes da França, Brasil, Bélgica e EUA e obtidos em 1964 e 2006,
197 porém a frequência de *agr*-III encontrada por esses autores foi de 26,6%, 17,2% de *agr*-II e
198 1,6% de *agr*-IV.

199 Associações entre os grupos *agr* com a virulência de *S. aureus* isolados de mastite
200 bovina foram estudadas por outros autores. BUZZOLA et al. (2007) relataram que os isolados

201 pertencentes ao grupo *agr-I* apresentaram maior capacidade de invasividade intracelular
202 comparado aos demais grupos *agr*, sugerindo que essa característica pode contribuir para a
203 persistência de infecções intramamárias e pode dificultar a ação dos antimicrobianos durante
204 o tratamento de mastite. Com relação aos isolados com gene *agr-II*, BARDIAU et al. (2014)
205 observaram que apresentaram baixa capacidade de invasão em células epiteliais mamárias
206 bovinas, ao contrário de isolados do grupo *agr-I*. No entanto, MELCHIOR et al. (2009)
207 relataram associação entre os isolados com gene *agr-II* e maior habilidade em formar
208 biofilme, que é um fator importante para sobrevivência em nichos extracelulares. A relação
209 entre a presença de grupos *agr* com genes de resistência a antimicrobianos foi relatada por
210 MELCHIOR et al. (2009) que correlacionaram isolados do grupo *agr-I* com resistência a
211 penicilina, enquanto os do grupo *agr-II* não apresentaram genes de resistência. BARDIAU et
212 al. (2013) estudaram 19 isolados de mastite bovina resistentes a metilina e verificaram que
213 todos pertenciam ao grupo *agr-I*, sugerindo que os bovinos poderiam ser um reservatório
214 desses isolados para humanos, enquanto SILVA et al. (2013), observaram que a maioria dos
215 isolados bovinos sensíveis a metilina pertenciam ao grupo *agr-II* e III. Considerando que a
216 maior ocorrência de um grupo *agr* em uma determinada região pode estar associado com
217 resistência a um ou mais antimicrobianos isso representaria uma dificuldade a mais para o
218 tratamento, porque esses isolados provavelmente estariam disseminados pelos rebanhos da
219 região.

220 A maior frequência de um grupo *agr* em uma determinada região geográfica pode
221 estar associada à presença de um clone específico. BUZZOLA et al. (2007) analisaram através
222 de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) isolados de diferentes distritos da
223 Argentina e identificaram na maioria o gene *agr-I* (88%), em 8% o *agr-III* e 2% eram dos
224 grupos II e IV, sendo que todos os isolados do grupo *agr-I* foram pertencentes a uma
225 linhagem definida (A/1) que foi a mais prevalente, enquanto os demais grupos apresentaram

226 maior diversidade. O predomínio de um clone associado ao grupo *agr*-I também foi
227 observado em um estudo analisando amostras bovinas predominantemente da França, mas
228 também dos EUA, Reino Unido e Japão isoladas entre as décadas de 1950 e 1990, a maior
229 parte pertenceu ao grupo *agr*-I (69%), 23,9% ao grupo *agr*-II, 2,8% ao grupo III e 1,4% ao
230 grupo IV, sendo que 56,3% dos isolados pertenciam a um mesmo clone e ao grupo *agr*-I
231 (GILOT et al., 2002). A associação entre outros grupos *agr* e um complexo clonal foram
232 identificados por VAUTOR et al. (2009), na qual 43 de 45 isolados do grupo *agr*-III em
233 ovinos e caprinos foram associados à linhagem CC1773 e por SILVA et al. (2013) que em *S.*
234 *aureus* de casos de mastite bovina, observaram que todos os isolados *agr*-III pertenciam à
235 linhagem ST1/CC1 e a maior parte dos *agr*-II à CC126. Esses resultados sugerem que a
236 relação entre um grupo *agr* e um clone específico é mais importante que entre espécies
237 animais, desse modo variações na distribuição geográfica dos grupos *agr* entre os isolados
238 poderiam ser explicadas devido ao predomínio de um clone em uma determinada região.
239 Comparado com outros experimentos, a presença de 48,9% dos isolados do grupo *agr*-III no
240 presente estudo não é comum em *S. aureus* de mastite bovina e pode indicar a ocorrência de
241 um tipo molecular distinto de outras regiões, entretanto a frequência de 36,7% do grupo *agr*-I,
242 sugere a possível predominância de dois tipos moleculares diferentes na região estudada.

243 No presente estudo, o gene para EE mais frequente foi *sea*, observado em 16,7% dos
244 isolados. Essa frequência foi semelhante á relatada por ZECCONI et al. (2006), mas superior
245 às relatadas em outros estudos, nos quais foi inferior a 7% (OTE et al., 2011; ZSCHÖK et al.,
246 2005), enquanto um estudo identificou sua presença em 62% dos isolados enterotoxigênicos
247 (MULLARKY et al., 2001). A síntese de EEA por *S. aureus* pode ser importante para a
248 sobrevivência do agente em infecções intramamárias, de acordo com MULLARKY et al
249 (2001), que observaram que EEA aumentou a resistência de *S. aureus* a ação de neutrófilos.

250 A combinação entre os genes *agr*-I e *sea* foi a mais comum encontrada neste estudo e

251 a mesma tendência foi relatada por MONECKE et al. (2007) que verificaram que esses
252 isolados bovinos pertenciam ao mesmo complexo clonal (CC8). Em *S. aureus* isolados de
253 sangue humano, WANG et al. (2012) detectaram presença de *sea* em 67%, sendo que a
254 maioria apresentou associação com *agr* I e foram agrupados ao mesmo tipo molecular e
255 também pertenceram ao complexo clonal CC8. Por outro lado no estudo conduzido por
256 SILVA et al. (2013) em isolados bovinos, o gene *sea* não foi detectado em combinação com
257 *agr*-I, II e III e foram identificados quatro complexos clonais diferentes. Esses resultados
258 apresentados por outros autores indicam a possibilidade dos isolados que apresentaram os
259 genes *sea* e *agr*-I em nosso experimento formarem parte do mesmo tipo molecular. Entretanto
260 não foi possível estabelecer uma relação entre os genes *agr* com outros genes para EEs na
261 maioria dos isolados (76,9%), pois somente a presença de 3 genes foi estudada.

262 Os resultados encontrados sugerem que a ocorrência dos genes *agr* em *S. aureus*
263 isolados de mastite bovina é variável conforme a região geográfica. A bibliografia a respeito
264 de associações entre o gene *agr*-III e a virulência de *S. aureus* isolado de mastite bovina é
265 escassa, provavelmente devido a menor frequência encontrada por outros autores em outras
266 regiões. Estudos com uma amostragem maior e utilizando tipagem molecular poderiam
267 determinar a predominância de um ou mais tipos moleculares nos rebanhos leiteiros da região
268 ou se há uma ampla diversidade genética. A pesquisa por um maior número de genes para
269 EEs possibilitaria determinar se os isolados de mastite bovina na região estudada representam
270 um maior grau de risco para saúde humana.

271 **5 CONCLUSÃO**

272 O gene para o grupo *agr*-III foi o mais encontrado nos isolados de mastite bovina no
273 Rio Grande do Sul, seguido pelo *agr*-I. O gene para EE mais frequentemente identificado foi
274 *sea*. A associação mais frequente entre gene de enterotoxinas e um grupo *agr* foi entre *sea* e
275 *agr*-I.

276 **6 REFERÊNCIAS**

- 277 ALVES, P.D.D. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated
278 from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. **Veterinary**
279 **Microbiology**, Amsterdam, v.137, n.1-2, p.190-195, 2009. Disponível em:
280 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.014>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
281 10.1016/j.vetmic.2008.12.014.
- 282 ANTUNES, L. C. et al. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**, Reading,
283 v.156, n.8, p.2271-2282, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.038794-0>>.
284 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1099/mic.0.038794-0.
- 285 ARGUDÍN, M. Á. et al. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**,
286 Basel, v.2, n.7, p.1751-1773, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.3390/toxins2071751>>
287 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.3390/toxins2071751.
- 288 BARDIAU, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant
289 *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Letters in Applied**
290 **Microbiology**, Oxford, v.57, n.3, p.181-186, 2013. Disponível em:
291 <<http://dx.doi.org/10.1111/lam.12099>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1111/lam.12099.
- 292 BARDIAU, M. et al. Associations between properties linked with persistence in a collection
293 of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**,
294 Amsterdam, v.169, n.1-2, p.74-79, 2014. Disponível em:
295 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.010>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
296 10.1016/j.vetmic.2013.12.010.
- 297 BOYEN, F. et al. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance
298 and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.135, n.3-4, p.187-195,
299 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.025>>. Acesso em: 26 fev.
300 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.025.

- 301 BUZZOLA, F.R. et al. Differential abilities of capsulated and non capsulated *Staphylococcus*
302 *aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. **Infection and**
303 **Immunity**, Bethesda, v.75, n.2, p.886-891, 2007. Disponível em:
304 <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01215-06>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
305 10.1128/IAI.01215-06.
- 306 CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of
307 *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products.
308 **Molecular and Cellular Probes**, London, v.19, n.5, p.299-305, 2005. Disponível em:<
309 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2005.03.002>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
310 doi:10.1016/j.mcp.2005.03.002.
- 311 FUQUA, C. et al. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-
312 homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.35, p.439-
313 468, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>>.
314 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913.
- 315 FUQUA, W. C. et al. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-
316 responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.176, n.2, p.269-
317 275,1994. Disponível em:<<http://jb.asm.org/content/176/2/269.long>>.Acesso em 26 fev.2014.
- 318 GEORGE, E. A.; MUIR, T. W. Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent
319 staphylococci. **ChemBiochem**, Weinheim, v.8, n.8, p.47-55, 2007. Disponível em:
320 <<http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200700023>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
321 10.1002/cbic.200700023.
- 322 GILLOT, P. et al. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating
323 components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from
324 cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.11, p.4060-4067,
325 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.11.4060-4067.2002>>. Acesso em:

- 326 26 fev. 2014. doi: 10.1128/JCM.40.11.4060-4067.2002.
- 327 HAVERI, M. et al. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and non
328 persistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied**
329 **Microbiology**, Oxford, v.103, n.4, p.993-1000, 2007. Disponível em:
330 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
331 10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x.
- 332 HENNEKINE, J.A. et al. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins:
333 characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.36,
334 n.4, p.831-836, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>>.
335 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.
- 336 JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background,
337 virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**,
338 Bethesda, v.70, n.2, p.631-641, 2002. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-](http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002)
339 [641.2002](http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002)>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1128/IAI.70.2.631-641.2002.
- 340 JI, G. et al. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. **Science**, New
341 York, v.276, p.2027–2030, 1997.
- 342 KERRO-DEGO, O. et al. Factors involved in the early pathogenesis of bovine
343 *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: a review.
344 **Veterinary Quarterly**, London, v.24, n.4, p.181-198, 2002. Disponível em:
345 <<http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2002.9695135>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
346 10.1080/01652176.2002.9695135.
- 347 LYON, G. J.; NOVICK, R. P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-
348 positive bacteria. **Peptides**, Fayetteville, v.25, n.9, p. 1389-1403, 2004. Disponível em:
349 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2003.11.026>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
350 10.1016/j.peptides.2003.11.026.

- 351 MATTHEWS, K.R. et al. Identification and differentiation of coagulase negative
352 *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Ames,
353 v.60, n.6, p. 686-688, 1997.
- 354 MEHROTRA, M. et al. PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins,
355 exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of**
356 **Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.3, p.1032-1035, 2000. Disponível em:
357 <<http://jcm.asm.org/content/38/3/1032.full.pdf>>. Acesso em 26 fev. 2014.
- 358 MELCHIOR, M. B. et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine
359 mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary**
360 **Microbiology**, Amsterdam, v.137, n.1-2, p.83-89, 2009. Disponível em:
361 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.004>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
362 10.1016/j.vetmic.2008.12.004.
- 363 MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly
364 described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of Clinical**
365 **Microbiology**, Washington, v.37, n.10, p.3411-3414, 1999. Disponível em:
366 <<http://jcm.asm.org/content/37/10/3411.full.pdf>>. Acesso em 26 fev. 2014.
- 367 MONECKE, S. et al. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance
368 determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. **Veterinary Microbiology**,
369 Amsterdam, v.125, n.1-2, p.128-140, 2007. Disponível em:
370 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.016>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
371 10.1016/j.vetmic.2007.05.016.
- 372 MULLARKY, I.K. et al. *Staphylococcus aureus* agr genotypes with enterotoxin production
373 capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. **Infection and Immunity**, v.69, n.1,
374 p.45-51, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.1.45-51.2001>>. Acesso em:
375 26 fev. 2014. doi: 10.1128/IAI.69.1.45-51.2001.

- 376 NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in *staphylococci*. **Annual Review of**
377 **Genetics**, Palo Alto, n.42, p.541-564, 2008. Disponível em:
378 <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091640>>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi:
379 10.1146/annurev.genet.42.110807.091640.
- 380 ORTEGA, E. et al. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity,
381 superantigenic activity and correlation to antibiotic resistance. **Toxins**, Basel, v.2, n.8,
382 p.2117-2131, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.3390/toxins2082117>>. Acesso em:
383 26 fev. 2014. doi: 10.3390/toxins2082117.
- 384 OTE, I. et al. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus*
385 *aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.153,
386 n.3-4, p.285-292, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.042>>.
387 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.042.
- 388 SHOPSIN, B. et al. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains
389 colonizing children and their guardians. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington,
390 v.41, n.1, p.456-459, 2003. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.1.456-](http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.1.456-459.2003)
391 [459.2003](http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.1.456-459.2003)>. Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1128/JCM.41.1.456-459.2003.
- 392 SILVA, N. C. et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible
393 *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**,
394 Champaign, v.96, n.11, p.6856-6862, 2013. Disponível em <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6719)
395 [6719](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6719)>. Acesso em 26 fev. 2014. doi:10.3168/jds.2013-6719.
- 396 STATISTIX®. Statistix® 9 Analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008.
- 397 THOENDEL, M. et al. Peptide signaling in the staphylococci. **Chemical Review**, Easton,
398 v.111, n.1, p.117-151, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/cr100370n>>. Acesso
399 em: 26 fev. 2014. doi:10.1021/cr100370n.
- 400 VAUTOR, E. et al. Genetic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy

401 ruminant species: a single-dye DNA microarray approach. **Veterinary Microbiology**,
402 Amsterdam, v.133, n.1-2, p.105-114, 2009. Disponível em:
403 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.006>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
404 doi:10.1016/j.vetmic.2008.06.006.

405 WANG, W.Y. et al. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant
406 *Staphylococcus aureus* isolates from blood in Taiwan. **PLoS One**, v.7, n.1, 2012. Disponível
407 em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.003039>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
408 doi:10.1371/journal.pone.003039.

409 WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria.
410 **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.21, p.319-346, 2005.
411 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>>. Acesso em:
412 26 fev. 2014. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.

413 ZECCONI, A. et al. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the
414 inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, London, v.40,
415 n.4, p.177-183, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2006.01.001>>.
416 Acesso em: 26 fev. 2014. doi: 10.1016/j.micpath.2006.01.001.

417 ZSCHÖCK, M. et al. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus*
418 *aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.108, n.3-4,
419 p.243-249, 2005. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.02.012>>. Acesso
420 em: 26 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.011.

421

422

423

424

425

426 Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos usados como *primers* para detecção dos genes *nuc*, *agr-I-IV*, *sea*, *seb* e *sed* em *S.*
 427 *aureus* isolados de mastite bovina

Gene	Primer	Seqüência de oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho dos produtos amplificados (pb)	Referência
Termonuclease	NUC- <i>forward</i>	AGTTCAGCAAATGCATCACA	400	CREMONESI et al (2005)
	NUC- <i>reverse</i>	TAGCCAAGCCTTGACGAACT		
<i>agr-I</i>	Pan- <i>agr forward</i>	ATGCACATGGTGACATGC	439	SHOPSIN et al (2003)
<i>agr-I</i>	<i>Agr-I reverse</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT		
<i>agr-II</i>	<i>Agr-II reverse</i>	GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	573	SHOPSIN et al (2003)
<i>agr-III</i>	<i>Agr-III reverse</i>	CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC	406	SHOPSIN et al (2003)
<i>agr-IV</i>	<i>Agr-IV reverse</i>	CGATAATGCCGTAATAC CCG	586	SHOPSIN et al (2003)
<i>sea</i>	SEA-1	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	530	MONDAY & BOHACH (1999)
	SEA-2	GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG		
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC	164	MEHROTRA et al (2000)
	GSEBR-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
<i>sed</i>	SED-1	GTGGTGAATAGATAGGACTGC	385	MONDAY & BOHACH (1999)
	SED-2	ATATGAAGGTGCTCTGTGG		

428

429

430

431

432 Tabela 2: Frequência dos grupos *agr* em *S. aureus* isolados de amostras de leite de mastite
433 bovina e por rebanhos leiteiros

Grupos <i>agr</i>	n	(%)	Rebanhos	(%)
III	44	48,9	33	55,6
I	33	36,7	24	40,7
II	7	7,8	7	11,8
IV	6	6,7	5	8,5

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459 Tabela 3: Relação entre a presença dos genes para EE em *S. aureus* isolado de mastite bovina
 460 com o gene *agr*

Gene grupo agr	Gene EE	Isolados	(%)
I	<i>sea</i>	9*	10
III	<i>seb</i>	4	4,4
I	<i>seb</i>	2	2,2
III	<i>sea</i>	2	2,2
I	<i>sea, seb</i>	1	1,1
III	<i>sea, seb</i>	1	1,1
III	<i>sea, seb, sed</i>	1	1,1
IV	<i>Sea</i>	1	1,1

461 *Indica associação significativa entre a presença do gene para EE e o gene *agr* (P<0,05).

462

463

464

465

466

467

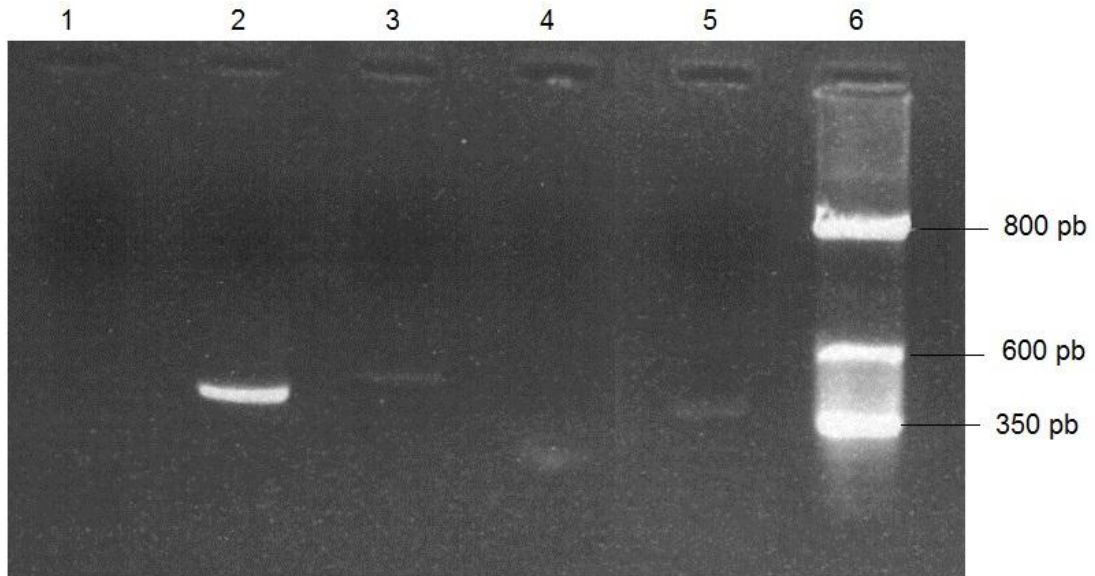
468

469

470

471

472



473

474 Figura 1 Eletroforese da PCR dos genes *nuc*, *sea*, *seb* e *sed*, visualizados em gel de agarose
475 1,5%.

476 Coluna 1: controle negativo da reação sem DNA.

477 Coluna 2: controle positivo FRI S6 e *primers nuc* (400 pb).

478 Coluna 3: controle positivo FRI S6 e *primers sea* (530 pb).

479 Coluna 4: controle positivo FRI S6 e *primers seb* (165 pb).

480 Coluna 5: controle positivo FRI 361 e *primers sed* (385 pb).

481 Coluna 6: marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen®).

482

483

484

485

486

487

488

489

490

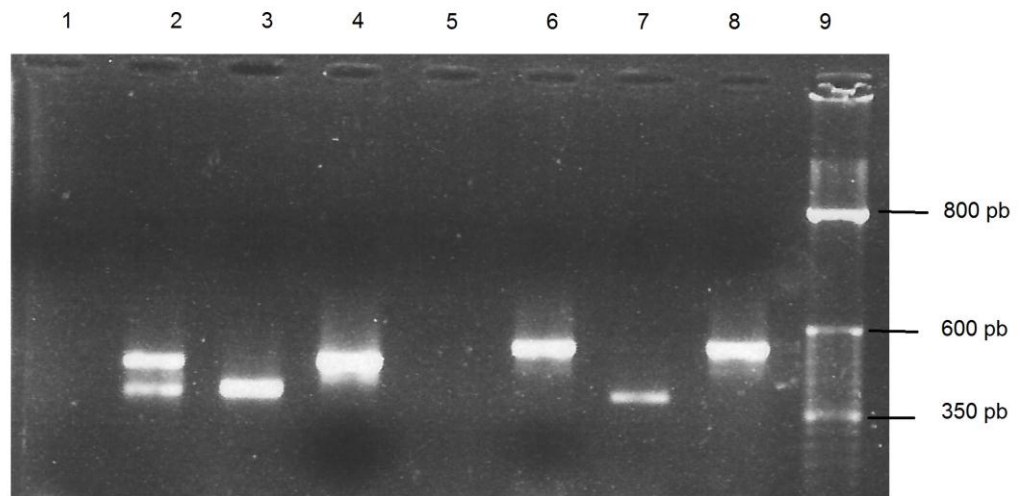
491

492

493

494

495



496

497 Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos genes *agr*-I-
 498 IV por PCR

499 Coluna-1: controle negativo da reação sem DNA.

500 Coluna-2: Produtos combinados dos controles positivos P.19 e P.20 com os *primers agr* I
 501 (440 pb) e II (573 pb).

502 Coluna-3: controle positivo P.19 e *primers agr* I e II.

503 Coluna-4: controle positivo P.20 e *primers agr* I e II.

504 Coluna-5: controle negativo sem DNA.

505 Coluna-6: Produtos combinados dos controles positivos P.21 e P.22 com os *primers agr* III
 506 (406 pb) e IV (586 pb).

507 Coluna-7: controle positivo P.21 e *primers agr* III e IV.

508 Coluna-8: controle positivo P.22 e *primers agr* III e IV.

509 Coluna 9- marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen ®).

4 CONCLUSÃO GERAL

A ocorrência de *S. aureus* foi superior a SCN e *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de leite de vacas com mastite subclínica e clínica e nos rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. O isolamento *S. aureus* foi mais frequente nos meses da primavera do que no outono. O gene para o grupo *agr*-III foi o mais encontrado nos isolados de mastite bovina no Rio Grande do Sul, seguido pelo *agr*-I. O gene para EE mais frequentemente identificado foi *sea*. A associação mais frequente entre gene de enterotoxinas e um grupo *agr* foi entre *sea* e *agr*-I.

5 REFERÊNCIAS

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, Basel, v.2, n.7, p.1751-1773, 2010.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. 2.ed. Winslow: CABI, 2010, 226p.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v.163, n.1, p.1-13, 2002.

BUZZOLA, F. R.; ALVAREZ, L. P.; TUCHSCHERR, L. P.; BARBAGELATA, M. S.; LATTAR, S. M.; CALVINHO, L.; SORDELLI, D. O. Differential abilities of capsulated and non capsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.75, n.2, p.886-891, 2007.

HAVERI, M.; ROSLÖF, A.; RANTALA, L.; PYÖRÄLÄ, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and non persistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.103, n.4, p.993-1000, 2007.

HENNEKINE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.36, n.4, p.831-836, 2012.

LYON, G. J.; NOVICK, R. P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. **Peptides**, Fayetteville, v.25, n.9, p. 1389–1403, 2004.

NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in *staphylococci*. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, n.42, p.541-564, 2008.

RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v.28, n.2, p.149-63, 2012.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v.16, n.4, p.357-372, 2011

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E.; DAPRÀ, V.; PICCININI, R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, London, v.40, n.4, p.177-183, 2006.