

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

SILVA, M. A<sup>1</sup>; COSTA, G. M.<sup>2</sup>; SILVA, N<sup>1\*</sup>

## Introdução

Mastite é a doença infecciosa que mais afeta as vacas leiteiras e a responsável pelas maiores perdas econômicas do setor leiteiro. Inúmeros são os agentes etiológicos envolvidos nos processos infecciosos da glândula mamária. Assim, o diagnóstico etiológico é uma ferramenta importante para estabelecer as medidas de controle para esta doença. Este trabalho teve como objetivo, validar uma PCR Multiplex como teste diagnóstico capaz de detectar genes os *S. aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) diretamente a partir de amostras de leite de vacas com mastite, permitindo monitorar a eficiência dos programas de controle e qualidade do leite.

## Metodologia

1- Obtenção do DNA genômico a partir do leite artificialmente contaminado:

Amostras padrão foram cultivadas individualmente em caldo BHI e incubadas a 37°C, por 24 horas. 1 mL de cada caldo foi inoculado em 10 mL de leite UHT individualmente, posteriormente foram realizadas diluições seriadas em leite. Cada diluição foi plaqueada em ágar Plate Count, para se conhecer a quantidade de UFC/mL e assim avaliar a sensibilidade do teste. Transferiu-se 1,8 mL das diluições em leite artificialmente contaminados em microtubos e adicionou-se 200 µL de tampão NET (50 mM NaCl, 125 mM EDTA, 50mM Tris-HCl – pH 7,6). Após um minuto, a solução foi centrifugada e o *pellet* submetido ao processo de extração de DNA descrito por Millar et al. (2000). O DNA extraído foi purificado pelo método Fenol-Clorofórmio (Silva e Silva, 2005).

As PCRs foram realizadas com *primers* que amplificam a região espécie-específica 16-23S do rRNA de *S. aureus* (1300, 900, 420 e 200pb), *S. agalactiae* (270pb), *S. dysgalactiae* (264pb) e *S. uberis* (330pb) e para detecção de MRSA empregou-se *primers* que amplificam o gene *MecA* (533pb). A especificidade da técnica foi verificada utilizando de outras bactérias *S. bovis* e *S. epidermidis* e *S. intermedius*.

2- Obtenção do DNA genômico a partir do leite de tanque de expansão

Para validação da técnica, testou-se 30 amostras de leite de tanque de expansão enviadas ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG – MAPA. As amostras possuíam contagem bacteriana acima de 1000 UFC/mL e continham azidiol (substância bacteriostática).

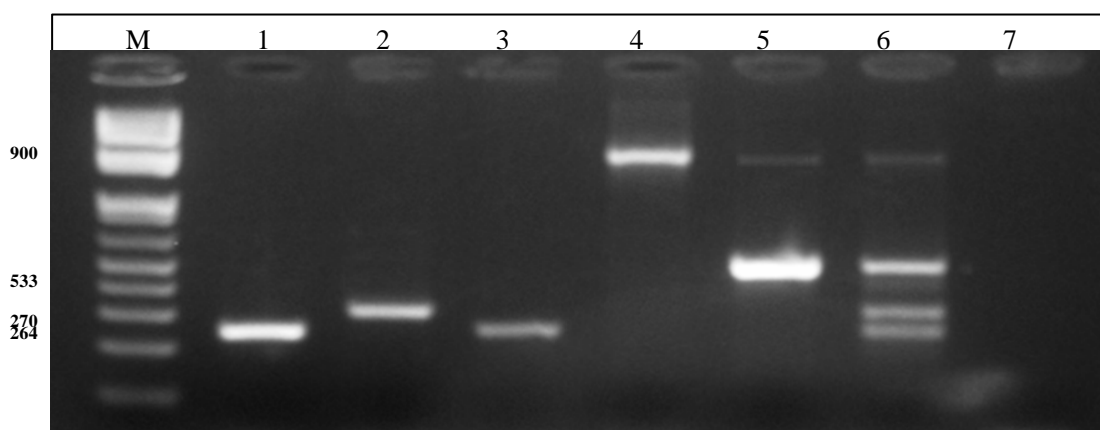
1 - Laboratório de Diagnóstico e Pesquisa em Doenças Infecciosas, DMVP - Escola de Veterinária da UFMG, Av Antônio Carlos 6627 – CEP 31270-010 – Belo Horizonte – MG – e-mail: [nivsilva@gmail.com](mailto:nivsilva@gmail.com)

2- Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

## Resultados e discussão

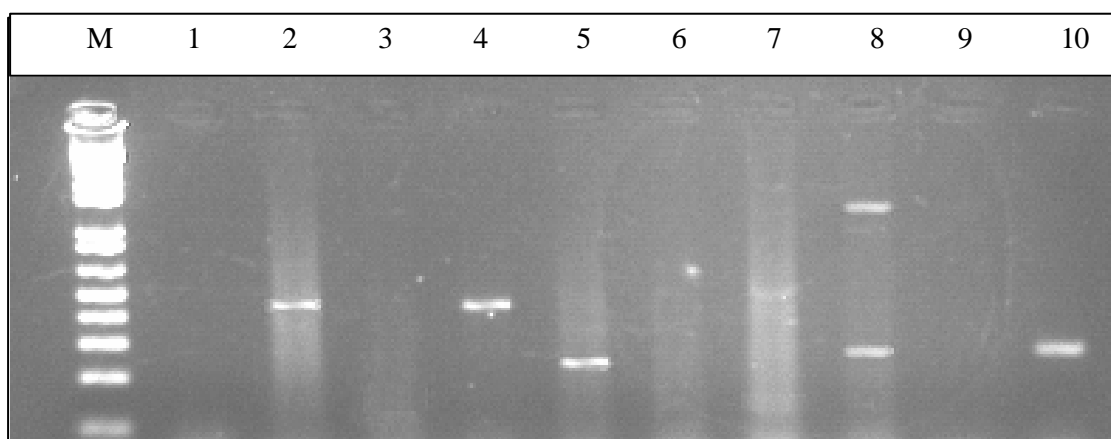
Os *primers* foram específicos para os microrganismos pesquisados (Figura 1). O limite de detecção foi de 1000 UFC/mL.

Todas as espécies foram detectadas a partir do leite de tanque de expansão, chama-se a atenção para a detecção de MRSA, que é o primeiro registro no Brasil a partir de leite bovino e que constitui um risco a saúde pública (Figuras 2 e 3). A técnica foi sensível e específica para detecção de *S. aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e MRSA diretamente a partir de leite infectado, podendo ser utilizada para diagnóstico de mastite.



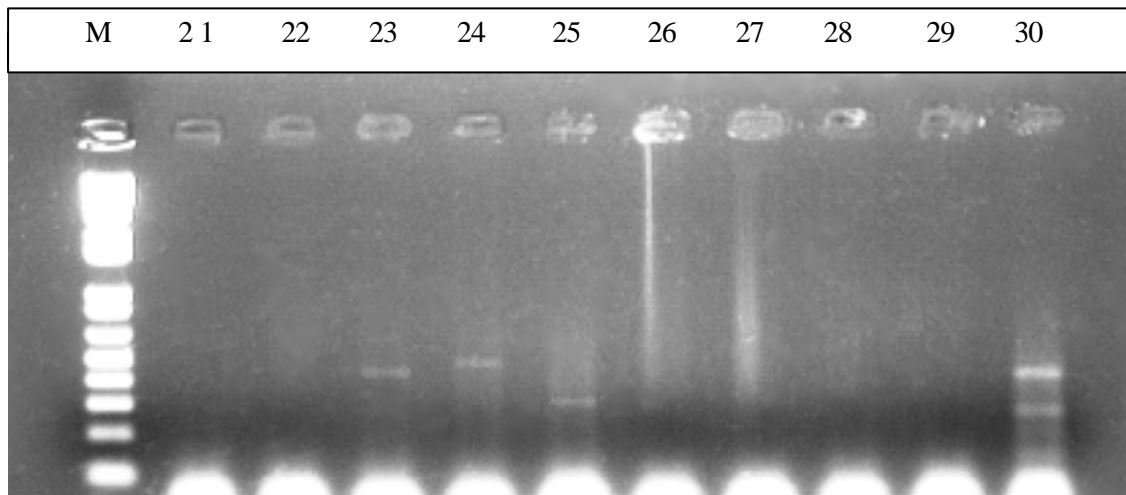
Legenda: M: Padrão de peso molecular (DNA Ladder 100 pb); 1: *S. agalactiae* (264 pb); 2: *S. uberis* (330 pb); 3: *S. dysgalactiae* (270 pb); 4: *S. aureus* (900 pb); 5: MRSA (533 pb); 6: *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus* e MRSA; 7: Controle

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



Legenda: M: Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 100 pb), 1: Não amplificado (ND), 2: *S. aureus*, 3: ND, 4: *S. aureus*, 5: *S. agalactiae*, 6: ND, 7: *S. aureus*, 8: *S. dysgalactiae*, 9: ND, 10: *S. agalactiae*

Figura 2: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de amostras de leite de tanque de expansão.



Amostras de leite de tanque de expansão: Legenda: M: Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 100 pb), 21: ND, 22: ND, 23: *S. aureus*, 24: MRSA, 25: *S. uberis*, 26: ND, 27: ND, 28: ND, 29: ND, 30: *S. aureus* e *S. agalactiae*

Figura 3: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de amostras de leite de tanque de expansão.

### Referências Bibliográficas

MILLAR, B. C.; JIRU, X.; MOORE, J. E. et al. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material *J. Microbiol. Methods*, v. 42, p. 139-147, 2000

SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil *Can. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 4, p. 260-264, 2005