

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo () Relato de Experiência () Relato de Caso

PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR MULTIPLEX PARA DIAGNÓSTICO DE MASTITE EM BOVINOS

AUTOR PRINCIPAL: Isabelle Ghiggi Sgorla.

COAUTORES: Rovian Miotto, Daniel Quadros, Yasmin Kreutz, Gabriela Paraboni Frandoloso, João Antônio Guizzo, Rafael Frandoloso

ORIENTADOR: Luiz Carlos Kreutz.

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença infecto contagiosa responsável por prejuízos irreversíveis para toda a cadeia produtiva do leite. Vários tipos de bactérias estão associados às mastites clínicas que se manifestam por meio de alterações físicas do leite, ou mastites subclínicas, que se caracterizam principalmente pelo aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite. O diagnóstico definitivo das diferentes formas de mastite é importante para estabelecer protocolos de profilaxia e requer a identificação da bactéria em cultivo microbiológico. No entanto, a correta identificação da bactéria pelos métodos tradicionais bioquímicos é demorada, laboriosa e frequentemente incompleta ou equivocada, ou dificultada ainda pela incapacidade de alguns micro-organismos crescerem em meios de cultivo tradicionais como o ágar sangue. Desta maneira, este trabalho teve por objetivo a avaliação de uma técnica molecular para diagnóstico das principais bactérias causadoras de mastite em bovinos leiteiros.

DESENVOLVIMENTO:

Amostras de leite foram obtidas de vacas com mastite em uma propriedade da região. As amostras foram coletadas em tubos estéreis e transportadas refrigeradas até o laboratório de microbiologia e imunologia avançada. Alíquotas de cada amostra foram semeadas em placas contendo ágar sangue e incubadas a 37°C. Após 24 horas, as colônias bacterianas foram coletadas para caracterização morfológica e bioquímica das bactérias. A identificação inicial das bactérias apontou a possível presença de coliformes (*Escherichia coli* ou *Klebsiella* sp.) e *Staphylococcus aureus*. Cepas de *Streptococcus* sp. foram obtidas do laboratório de microbiologia do Hospital Veterinário. Colônias bacterianas representativas de cada bactéria (*E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* sp.) foram então cultivadas em meio líquido (*Brain Heart Infusion* – BHI) e uma alíquota foi então diluída em 100 µl de água para posterior extração do DNA pelo calor (95°C/10min.). Após centrifugação, o DNA bacteriano presente no sobrenadante foi quantificado por espectrofotometria e a concentração de DNA ajustada entre 10 e 100 µg/µl. Adicionalmente, o DNA bacteriano foi extraído utilizando-se um

kit de extração de DNA, tanto de colônias puras, ou a partir de amostras de leite propositalmente contaminadas para isso. A identificação do DNA bacteriano foi feita mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se primers específicos para cada agente (SHOME, B. R. et al., 2011). Cada amostra de DNA foi submetida a PCR uniplex (apenas um par de primer específico para um agente patogênico) e, posteriormente, ao PCR multiplex (mix de todos os primers para todos os agentes patogênicos). Além disso, amostras contendo o DNA da *E. coli*, *S. aureus* e *Streptococcus sp.* foram submetidas ao PCR uniplex e multiplex para validação da reação. E, para verificar a sensibilidade da PCR em detectar as bactérias, amostras de leite foram contaminadas com uma quantidade conhecida de bactérias, diluídas seriadamente (até 10.000 vezes) e submetidas simultaneamente ao cultivo em placa e extração de DNA. As condições da PCR foram conforme descritas anteriormente e o DNA amplificado foi analisado por meio de eletroforese em gel de ágar (1%). O primer para cada patógeno foi selecionado de tal forma a amplificar fragmentos de DNA de tamanhos distintos que possibilitassem a identificação por meio da eletroforese. Os resultados obtidos indicaram que o *S. aureus* é o principal causador de mastite subclínica nas vacas leiteiras analisadas. Além disso, foi possível também extrair o DNA bacteriano de colônias puras apenas pelo calor e o kit de extração de DNA possibilitou a extração de DNA de colônias puras ou a partir das amostras de leite naturalmente ou artificialmente contaminadas. Os fragmentos de DNA amplificados mostraram-se suficientemente diferentes possibilitando a correta identificação das bactérias por meio da PCR e eletroforese. Todas as bactérias foram corretamente identificadas por meio da PCR uniplex e multiplex.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A PCR pode ser aplicada para diagnóstico definitivo das mastites bovinas e apresenta resultados satisfatórios em comparação à cultura microbiológica. Porém, as análises necessitam de infraestrutura adequada e pessoas capacitadas. O custo de todo o processo ainda é levemente superior ao método convencional, mas é compensado pela rapidez e precisão na obtenção dos resultados.

REFERÊNCIAS

SHOME, B. R. et al. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, p. 1349/1356, set. 2011.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Número da aprovação.
SOMENTE TRABALHOS DE PESQUISA

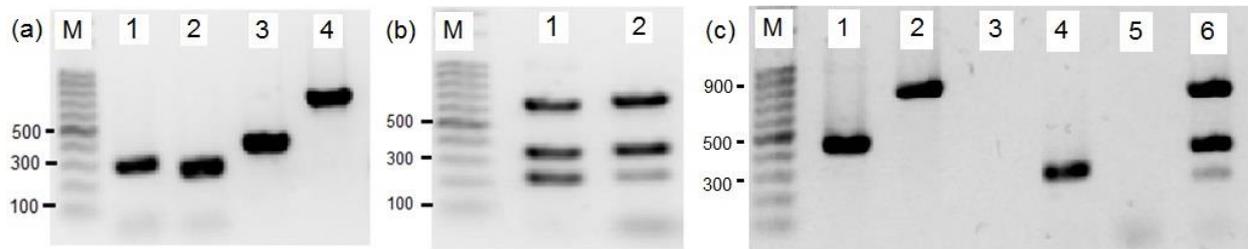


Figura 1 – PCR para detecção de patógenos no leite. (a) PCR uniplex para detecção de patógenos no leite. M) Marcador; 1) isolado de *Streptococcus* sp.; 2) isolado de *Streptococcus* sp.; 3) isolado de *Escherichia coli*; 4) isolado de *Staphylococcus aureus*. (b) PCR multiplex para detecção de patógenos no leite partir da extração de DNA por kit comercial e pelo calor. M) Marcador; 1) kit comercial - isolados de *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*; 2) extração de DNA pelo calor - isolados de *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*; (c) PCR multiplex com MIX de DNAs e primers para detecção de patógenos no leite. M) Marcador. 1) PCR multiplex de MIX de DNAs com primer para *Escherichia coli*. 2) PCR multiplex de MIX de DNAs com primer para *Staphylococcus aureus*. 3) PCR multiplex de MIX de DNAs com primer para *Streptococcus uberis*. 4) PCR multiplex de MIX de DNAs com primer para *Streptococcus agalactiae*. 5) PCR multiplex de MIX de DNAs com primer para *Streptococcus dysgalactiae*. 6) PCR multiplex de MIX de DNAs com todos os primers utilizados anteriormente.