

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
***Staphylococcus aureus* E PRODUÇÃO DE MARCADORES**
GENÉTICOS PARA DIAGNÓSTICO DE MASTITE EM
BOVINOS LEITEIROS

CURITIBA

2006

DICEZAR GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Staphylococcus aureus E PRODUÇÃO DE MARCADORES
GENÉTICOS PARA DIAGNÓSTICO DE MASTITE EM
BOVINOS LEITEIROS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde Animal, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof^a.Dra.Vânia Aparecida Vicente.

CURITIBA

2006

DICEZAR GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Staphylococcus aureus E PRODUÇÃO DE MARCADORES
GENÉTICOS PARA DIAGNÓSTICO DE MASTITE EM
BOVINOS LEITEIROS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde Animal, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof^a.Dra.Vânia Aparecida Vicente.

Comissão Examinadora:

Curitiba, 20 de dezembro de 2006

La différence entre l'esprit de géométrie et l'esprit de finesse. - En l'un, les principes sont palpables, mais éloignés de l'usage commun... Mais dans l'esprit de finesse, les principes sont dans l'usage commun et devant les yeux de tout le monde.

Blaise Pascal

«Différence entre l'esprit de géométrie et l'esprit de finesse»

Dedico,

*À minha esposa, aos meus filhos e amigos,
companheiros de todas as horas.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Vânia Aparecida Vicente,
Pela paciência que sempre teve e a disponibilidade para orientar este trabalho.

À Dra. Vanete Thomaz Soccol,
Pela colaboração de sempre, com o presente trabalho.

Ao Dr. José Luiz de Godoi,
Pelo incentivo, meu reconhecimento e gratidão.

Ao Dr. Carlos Ricardo Soccol,
Pela confiança, e por permitir o meu ingresso no Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos e possibilitar o desenvolvimento dos experimentos.

À Dra. Eleidi A. C. Frei Maia, e ao Dr. Ricardo L. R. de Souza,
Por permitirem trabalhos de amplificação no laboratório de Polimorfismo e Ligação.

À Dra. Jane Eire Gabriel,
Pela inestimável ajuda nos meus trabalhos no Laboratório de Biologia Molecular da PUCPR.

Ao Dr. Humberto França Madeira,
Embora não fizesse parte desta pesquisa, sua ajuda e disponibilidade em trocar idéias sempre foram bem vindas.

À Dra. Ilma H. Higuti,
Pela sua imensurável colaboração, sem qual não teria isolado com segurança as bactérias deste trabalho.

A Sra. Clotilde,
Pelo auxílio na elaboração dos meios de cultivo microbiológicos.

Ao Dr. Emanuel M. de Souza, ao Helison Faoro, ao Valter Baura e Dra. Berenice,
Pelo espírito científico e a paciência que tiveram, ao receber-me e colocar o seu
laboratório a disposição para os trabalhos de seqüenciamento.

Ao Dr. Shiguehiro Funayama,
Pela inestimável ajuda nos anos que trabalhei na UTP, pela paciência e
contribuições com essa pesquisa.

Ao Dr. Guilherme S. Schülhi, ao Dr. Marcio Pie e ao Dr. Walter Boeger,
Pelo Curso de sistemática, pela disponibilidade em orientar-me nos procedimentos
de filogenética, e pelo uso de equipamentos no laboratório de Zoologia.

Ao Dr. Higa, à Dra. Juliana V. Bittencourt, e à Maristela,
Por permitirem usar o seu laboratório, pelos conhecimentos adquiridos em biologia
molecular, e disponibilidade em me orientar.

À Elisabeth Andersen,
Pela paciência e gentileza em me ajudar quando precisei.

Aos Professores (as) e funcionários do Curso de Processos Biotecnológicos,
Pelo acolhimento nas suas disciplinas, espírito científico e disponibilidade para
ensinar.

Aos meus colegas de curso,
Ivana F. Neiva, Elza C. Arns, Rogério Saad Vaz, Augustus César, Roberto
Dietrich...
Obrigado pela amizade, e pela troca de idéias, para a continuidade dos trabalhos.

Aos colegas do “Institut de L’ Elevage”, e amigos brasileiros,
Ivon Morvan, Charlotte Duqués, Florence Kling, Lírio Rebelatto e Aparecido
Passareli... Que ao término do mestrado, me incentivaram a continuar com os
estudos e a elaborar esta pesquisa.

Aos produtores de leite,

Dr. Nélio Ribas Centa, Antonio Ribas, Terezinha Noili Vidal Henderikx, João Grochowski, João A.R. Baggio, João Vidal Baggio, Celso Shullis, René Schullis, Arnaldo Kusma, José Schullis, Edgar Barleze, José Maria Munhoz da Rocha Filho, Ilson Piovesan, Antonio Piovesan, Cleverson Piovesan, e outros,

Pela inestimável colaboração, e troca de experiências, me dizendo sempre o que era preciso para solucionar seus problemas. Isso orientou estas pesquisas. Minha eterna gratidão.

À Pontificia Universidade Católica do Paraná,

Pela Bolsa de Estudos concedida, mesmo que ao final não tenha valorizado o ser humano e a ciência. Sem ela não poderia ter continuado com as pesquisas.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, e não tenha sido citada, minha eterna gratidão.

Por último, agradeço a *Deus*,

Por haver me dado forças para recomeçar em momentos difíceis, e poder realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
GLOSSÁRIO	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 MASTITE BOVINA	3
2.2 BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS.....	4
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E TRATAMENTO.....	7
2.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA EM BACTÉRIAS	11
2.5 MARCADORES MOLECULARES.....	14
2.5.1 Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD).....	15
2.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
2.5.3 Seqüenciamento do DNA	21
2.5.4 Análise de Distância	22
CAPÍTULO I - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> DE MASTITES CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS BOVINAS.....	28
INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1 PROPRIEDADES E ANIMAIS.....	31
2.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	31

2.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO.....	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1	QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS	33
4	CONCLUSÕES.....	42
	CAPÍTULO II - EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE MOLECULAR POR MEIO DE RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) EM POPULAÇÕES DE <i>Staphylococcus aureus</i>, CAUSADORAS DE INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS EM BOVINOS	43
	INTRODUÇÃO	44
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1	ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS.....	46
2.2	EXTRAÇÃO DE DNA	46
2.3	RAPD	48
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1	EXTRAÇÃO DE DNA.....	49
3.2	RAPD	52
4	CONCLUSÕES.....	58
	CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> CAUSADORES DE MASTITES BOVINA, CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS.....	59
	INTRODUÇÃO	60
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1	SELEÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO.....	61
2.2	CLONAGEM DOS FRAGMENTOS	61
2.3	SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES CLONADAS.....	61
2.4	DESENHO DE MARCADORES	62
2.5	PCR-MULTIPLEX.....	62

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1	ISOLAMENTO E SEQÜENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DE DNA CLONADOS	63
3.2	REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO E PCR-MULTIPLEX	64
4	CONCLUSÕES	66
	AGRADECIMENTOS	67
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	78
	APÊNDICE	117

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1 - IDENTIFICAÇÃO PRESENTIVA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*..... 8

CAPÍTULO II

- FIGURA 1 - GEL DE AGAROSE NA CONCENTRAÇÃO DE 0,8%, CORADO POR BROMETO DE ETÍDIO E QUATRO AMOSTRAS EXTRAÍDAS 49
- FIGURA 2 - PADRÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE, CORADOS EM BROMETO DE ETÍDIO, COMPARANDO RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DOS PROTOCOLOS..... 50
- FIGURA 3 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DE *S. aureus*, CAUSADORES DE MASTITE BOVINA, POR MEIO DE RAPD 52
- FIGURA 4 - GRUPOS DE *S. aureus*, DISSEMINADOS EM 12 POPULAÇÕES DE BOVINOS LEITEIROS, RESSALTANDO A ALTA SIMILARIDADE ENTRE ALGUNS DELES, PORÉM COM *BOOTSTRAP* MUITO BAIXOS (N = 78) 54
- FIGURA 5 - A FORMAÇÃO DE DOIS GRUPOS DE *S. aureus*, DISSEMINADOS EM 12 POPULAÇÕES DE BOVINOS LEITEIROS, RESSALTANDO A BAIXA SIMILARIDADE ENTRE OS GRUPOS, PORÉM COM NÍVEIS DE CONFIANÇA BASTANTE ALTOS E COM SIGNIFICÂNCIA DE $p < 0,001$ (n = 18)..... 55
- FIGURA 6 - POSICIONAMENTO DAS BANDAS MONOMÓRFICAS VERIFICADAS E EXCISADAS DO GEL DE AGAROSE, PARA CADA UM DOS GRUPOS DE *S. aureus* 56

CAPÍTULO III

- FIGURA 1 - AGAROSE GEL 1%, MOSTRANDO O MARCADOR DE 1 Kbp E AMOSTRAS CLÍNICAS (S) E EM FASE AGUDA (AF). OS PLASMÍDIOS *pGEM[®]-T Easy Vector*, FORAM PREVIAMENTE RESTRINGIDOS COM ENZIMA *EcoR I* 63
- FIGURA 2 - PCR-MULTIPLEX EM GEL DE AGAROSE COM AS AMPLIFICAÇÕES DO DNA GENÔMICO DE *S. aureus*. Linhas: 1=subclínica; 2=clínica; 3 e 4=amostras de novos casos; 5=vazia; 6 e 7=tanque de leite; 8=ATCC 25923; 9=ATCC 6538; 10=*S. mutans*; 11=*E. coli*..... 65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE “CMT” E CCS	31
TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE LEITE BOVINO.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

- A:** absorbância.
- Ad:** Adenina.
- AA:** homozigoto dominante.
- Aa:** heterozigoto.
- aa:** homozigoto recessivo.
- AD:** quarto anterior direito.
- AE:** quarto anterior esquerdo.
- AFLP:** método de amplificação de DNA.
- BLAST:** Programa para análise de DNA.
- BHI:** *Brain Heart Infusion*.
- pb:** pares de base.
- C:** citosina.
- CIA:** clorofórmio-álcool isoamílico
- CMT:** *California Mastitis Test*.
- Kbp:** pares de base x mil.
- G:** Guanina.
- G(+):** Gram-positivo.
- G(-):** Gram-negativo.
- p-GEM:** Plasmídio (Promega).
- GC:** relação entre Guanina e Citosina.
- GPR:** gradiente de pressão reversa.
- IPTG:** reagente de clonagem.
- J:** coeficiente de Jaccard.
- LacZ:** gene que codifica a β -galactosidase de *E. coli*.
- NC:** não cresceu; ou não realizado.
- dNTP:** dinucleotídeo fosfato.
- LB:** meio para clonagem.
- OPJ:** Operon J.
- OPA:** Operon A.
- PCR:** *Polimerase Chain Reaction*.

PD: quarto posterior direito.

PE: quarto posterior esquerdo.

RAPD: Método de amplificação de DNA.

RFLP: Método de amplificação de DNA.

16 S: segmento de RNA com 16 Svedberg.

T: Timina.

TBE: Tampão para eletroforese.

Taq: enzima DNA Polimerase do *Thermophilus aquaticus* que polimeriza nucleotídeos.

TE: Tris-EDTA.

Tm: “melting temperature – temperatura em que 50% do DNA está hibridizado.

TOP 10 F1: linhagem de *E. coli*.

UPGMA: Algoritmo usado para análise de DNA.

VP: teste de Voges-Proskauer.

x-gal: x-galactose.

1 x: uma vez.

+, ++, +++: número de cruzes que estima a intensidade de uma infecção.

GLOSSÁRIO

- AMOVA:** Análise molecular de variância.
- ANELAMENTO:** ligação do iniciador ao mode.
- APÊNDICE:** o que faz parte do trabalho, mas pode ficar em separado.
- ATCC:** *American Type Culture Collection*.
- α -TOXINA:** toxina de estafilococos.
- β -HEMOLISINA:** enzima que provoca β -hemólise.
- BLAST:** programa do *GenBank* para análise de seqüências.
- BOOTSTRAP:** teste de confiabilidade.
- BUFFER:** tampão.
- CMT:** “*Califórnia Mastitis Test*”.
- CCS:** contagem de células somáticas.
- DNAses:** Enzima que degrada o DNA.
- DESNATURAÇÃO:** abertura da fita de DNA
- dNTP:** di-nucleotídeo fosfato
- EXTENSÃO:** alongamento da cadeia de DNA.
- FORWARD:** sentido 3’ do DNA.
- GAPS:** falhas de nucleotídeo na seqüência de DNA.
- LADDER:** marcador molecular.
- M 15:** linhagem de *E.coli*.
- PERÍODO SECO:** época que a vaca não está produzindo leite, fisiologicamente.
- PERÍODO DE LACTAÇÃO:** duração de dez meses.
- PRIMER:** iniciador.
- QUARTO:** quarta parte do úbere.
- REVERSE:** sentido 5’ do DNA.
- RNAr:** RNA ribossômico.
- RNAm:** RNA mensageiro.
- RNAses:** Degradam o RNA.
- RT-PCR:** PCR em tempo real.
- SOB:** meio rico em soja.
- TRANSDUÇÃO:** transferência de DNA exógeno a um organismo.
- XI 1 – BLUE:** linhagem de *E. coli*.

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se investigar o polimorfismo genético do *Staphylococcus aureus* causador de mastite bovina, por meio de RAPD. A análise de distância realizada pelo algoritmo UPGMA, identificou dois grupos desse agente etiológico. Por meio de marcadores RAPD, foi possível isolar bandas específicas de cada grupo, inseri-las em vetor pGEMTM (*Promega Corporation*), utilizando a linhagem TOP 10 F1 de *Escherichia coli*. Suas seqüências permitiram desenhar oligonucleotídeos iniciadores para identificação de ambos os biosorotipos. A elaboração de uma reação de multiplex-PCR, serviu para monitorar precocemente infecções por *S. aureus* em matrizes ainda jovens, e em tanque de leite, o que permitirá reduzir enormemente os prejuízos causados pela doença.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; mastite bovina; polimorfismo genético; marcador genético; diagnóstico.

ABSTRACT

This work investigates genetic polymorphism among *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis by RAPD. Distance analysis by the UPGMA algorithm was carried out the identification of two ethiological agent groups. Although, morphologic and biochemical aspects were apparently the same, after the isolation of these differences was possible to delineate the nucleotides sequences in serumtypes by means of plasmid vector insertion (Promega Corporation) using TOP 10 F1 *Escherichia coli* ancestry. These sequences allowed design primers to identify these serumtypes and in an elaboration of a multiplex-PCR reaction, it allowed to monitor infections by *S. aureus*, precociously in still young matrices and into milk tank, a result that will reduce economic damages comed by the illness.

Key words: *Staphylococcus aureus*; bovine mastitis; genetic polymorphism; genetic markers; diagnostic.

INTRODUÇÃO

Na produção e industrialização do leite, um dos fatores que mais reduz a qualidade e a quantidade do produto é a mastite. Segundo CULLOR (1992), a mastite é uma doença que ataca em média 15% das vacas leiteiras em todo mundo, com prevalência na ordem de 50% (GONÇALVES e KOZICKI, 1997). Pode-se dividi-la em mastites clínicas ou ambientais e em subclínicas ou contagiosas. Destas, as segundas são as mais importantes, por acometerem o maior número de matrizes produtivas, principalmente aquelas onde o agente etiológico é o *Staphylococcus aureus*, as quais se apresentam na forma subclínica crônica, a mais contagiosa e que não são facilmente controladas por antimicrobianos. A invasão e a lesão tecidual da glândula mamária por este microrganismo iniciam uma resposta inflamatória com conseqüente aparecimento de sinais clínicos que incluem mudanças na aparência e composição do leite, além de altas contagens leucocitárias e grande redução do volume produzido, provocando um impacto de grande importância econômica (LIPMAN et al., 1996).

AXFORD et al. (2000) relatam prejuízos causados, da ordem de US\$ 180 por animal, além de imensuráveis problemas de saúde pública. No Brasil, não existem estimativas oficiais, mas calcula-se em 12% esta queda de produção. Assim, produzem-se 20 bilhões de litros de leite por ano, significando perdas anuais de cerca de 2,4 bilhões de litros (FONSECA, 1996; BUZZOLA et al., 2001). As alterações na composição prejudicam a indústria cujos produtos passam a ter qualidade inferior, ressaltando-se mudanças drásticas de paladar e valores nutricionais igualmente comprometidos. Por outro lado, a freqüente presença de antimicrobianos impede o processamento industrial na maioria dos casos que envolvem fermentação láctica, resultando em grandes prejuízos aos laticínios. O “*National Research Council of Mastitis*”, dos Estados Unidos da América, relata os problemas de saúde pública como sendo principalmente: gastroenterites, meningites e intoxicações, provocadas por cocos e suas toxinas. O isolamento e identificação por testes enzimáticos e bioquímicos têm sido realizados (SILVA et al., 2000), porem o diagnóstico preciso e rápido vem sendo desenvolvido por marcadores moleculares (VIEIRA-DA-MOTA et al., 2001). Estudos genéticos de populações naturais de *S. aureus* têm

identificado considerável heterogeneidade e sugerido que um pequeno número de sorotipos têm sido responsável pela maioria dos casos de mastite bovina (FITZGERALD et al., 2000).

Desta forma, estudos envolvendo a etiologia e os diagnósticos da mastite bovina são de extrema importância, pois a cada ano um maior número de matrizes leiteiras é contaminado. Em fazendas produtoras a dificuldade para diagnosticar e realizar o tratamento adequado tem sido responsabilizado pelo aumento do número de matrizes acometidas (FERNANDES, 2006a). Sendo assim, a caracterização molecular dos agentes e o desenvolvimento de marcadores genéticos visando diagnóstico, contribuirá ao lado das práticas de manejo e de higiene da ordenha, para a redução dos prejuízos causados pela redução da produção, com gastos excessivos em tratamentos e descarte precoce de matrizes produtivas (LIPMAN et al., 1996; VEIGA et al., 1996 e FITZGERALD et al., 2000). Além de ofertar ao consumidor, produtos de melhor qualidade e com segurança alimentar mais desejável.

O presente trabalho foi apresentado na forma de capítulos. No capítulo I foi tratado o isolamento, purificação e caracterização do *S. aureus* de amostras de leite. Os dados referentes à extração do DNA genômico e a aplicação de marcadores RAPD, visando identificar o polimorfismo existente entre os diferentes isolados, foram sumarizados no capítulo II. O capítulo III reúne dados referentes ao desenvolvimento de um marcador molecular, a partir do seqüenciamento de bandas específicas de dois grupos separados geneticamente por meio de marcadores de RAPD, permitindo assim desenhar oligonucleotídeos iniciadores para identificar de forma rápida, a bactéria em tanques de leite e em casos de mastite subclínica.

1.1 OBJETIVOS

Investigar o polimorfismo genético de isolados de *Staphylococcus aureus*, agente etiológico de mastite em bovinos leiteiros.

Estudar a seqüência de nucleotídeos de parte do genoma destas bactérias, capazes de desenvolver marcadores moleculares para rápida detecção direta de isolados, e indireta em tanques de resfriamento de leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE BOVINA

A mastite em gado bovino é uma doença que acomete principalmente matrizes em lactação e destas principalmente as de raças leiteiras, onde as holandesas estão em primeiro lugar (FERNANDES, 2006a). Dependendo do agente etiológico são rapidamente curáveis, enquanto outras permanecem durante toda vida produtiva do animal. Por esta razão, a mastite bovina continua sendo fator limitante da produção leiteira em muitas propriedades no Brasil. As mastites subclínicas crônicas são transmitidas principalmente durante a ordenha. Não é visível aos olhos do produtor, a não ser pela queda na produção de leite, surgindo como o mais freqüente causador de prejuízos aos produtores de leite.

Normalmente, estes não protegem seu rebanho da forma adequada e só iniciam algum tipo de tratamento quando a doença já está em estágio bem avançado. Assim, a mastite tem merecido atenção e tratamento quando é visível (clínica), determinando prejuízos pela queda na produção e descarte de leite devido ao tratamento antibiótico (FERNANDES, 2006a). Este tratamento se limita aos casos clínicos emergenciais quando o prejuízo já é inevitável. A base do controle da mastite está na sua prevenção, o que significa reduzir as possibilidades de infecção por meio do manejo, sejam das mastites contagiosas (durante a ordenha) ou das ambientais (pós-ordenha) pelos 300 dias do período de lactação, e, do tratamento intramamário preventivo por 60 dias, quando da secagem das vacas, com antibiótico de longa ação. O fator determinante para o sucesso no controle da mastite é que todo o processo seja feito corretamente e com a mesma importância para cada etapa (FERNANDES, 2006a).

As mastites em vacas de leite freqüentemente ocorrem durante no período seco ou no início da lactação. Principal bactéria causadora de mastite, o *Staphylococcus aureus* pode formar focos encapsulados nas porções altas do úbere, desenvolvendo uma forma subclínica, que dificulta a cura bacteriológica durante a lactação, pois os antibióticos usados nesta fase atuam por pouco tempo, devido ao período de retirada no leite geralmente entre 10 e 12 horas, não permanecendo em níveis terapêuticos suficientes para determinar a eliminação completa da bactéria encistada (LISBOA e PIANTA, 1994; FIGUEIREDO, 1995). Porém, outras bactérias também têm sido isoladas, tais como

Streptococcus uberis, *S. agalactiae* e *Actinomyces sp.* (COLLINS e JONES, 1982; MORRISON e TILLOTSON, 1988). O tratamento de vacas no período seco reduzirá tanto o número de infecções durante esta fase, quanto o de novas infecções já no início da lactação. Em média, com este procedimento pode-se eliminar 90% de infecções por *Streptococcus agalactiae* e 70% por *S. aureus* (NAZTKE, 1971; FONSECA, 1996; EMBRAPA, 2006; FERNANDES, 2006b).

2.2 BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS

Inúmeros são os agentes etiológicos causadores dessa infecção, como fungos e leveduras, porém são as bactérias os microrganismos mais frequentes. FERREIRO et al. (1981) haviam relatado 41,65% de casos com *S. aureus*, 16,09% com *S. epidermidis*, e com *Micrococcus*, 6,1%. Quanto aos estreptococos, *S. agalactiae* 16,15%, *S. dysgalactiae* 7,3%, *S. uberis* 5,3% e ainda, *Corynebacterium spp*, 1,76%. Autores como COSTA et al. (1993) verificaram que 24,77% das infecções são causadas por fungos, enquanto 72,22% devem-se as bactérias, valores próximos a GONÇALVES e KOZICKI em (1997) que relataram dois terços dos casos provocados por bactérias, corroborando com dados anteriores. Por outro lado, estudos de BUZZOLA et al. (2001), relataram que 12,5% dos casos, não possuem motivo aparente, 1,6% devia-se a *S. dysgalactiae* e que estafilococos coagulase-negativos foram observados em 53,8% das amostras. Estafilococos coagulase-positivos apareciam somente em 7,6%, contrariando pesquisas anteriores. Estes autores concluíram também que os grupos estafilococos coagulase-negativos e coagulase-positivos estavam associados na resposta inflamatória crônica.

Em resumo, pode-se dizer que *Staphylococcus sp.* provocam a infecção no pós-parto e no primeiro terço da lactação em 90% das matrizes. Os outros 10% tem como etiologia a *Escherichia coli*. No terço final da lactação 90% dos casos são de *Staphylococcus sp.* e os restantes 10%, *Streptococcus sp.* Por outro lado, no período seco pode-se isolar *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* e *Corynebacterium sp.*, mas, mesmo assim, as mastites subclínicas são provocadas em 100% dos casos por *Staphylococcus sp.*, aparentando predomínio de microrganismos Gram-positivos. Algumas considerações inerentes às bactérias explicam este fato: bactérias Gram-positivas podem ser isoladas no período seco e no pós-parto e são representadas principalmente por: *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus*, *S.*

intermedius, *S. hyicus* e *S. epidermidis*, e como Gram-negativas, *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp.* e *Pseudomonas sp.* Os *S. agalactiae* sobrevivem somente no leite. Fora do úbere e de lesões nos tetos, não sobrevivem por mais de três semanas. São isolados das mãos de ordenhadores até dez dias após a ordenha (FERNANDES, 2006b). O *S. uberis* é isolado com maior frequência em lesões da pele do úbere, podendo também ser menos incidentes na pele sã. Podem sobreviver fora da glândula mamária (ordenhadeiras mal higienizadas e pêlos das vacas). Encontra-se com frequência na fase seca e seu isolamento significa falho processo de ordenha, seja ela manual ou mecânica. A ocorrência de Gradiente de Pressão Reversa (GPR), a secagem incorreta dos tetos antes da ordenha, ou o baixo nível de vácuo no equipamento de ordenha, predispõe a transmissão de doença de um teto infectado para outro sadio (FERNANDES, 2006b). As bactérias do gênero *Staphylococcus* representam um grupo epidemiologicamente significativo. Dentre os estafilococos encontram-se isolados coagulase positivos e negativos. Estudos de FERREIRO et al. (1981) verificaram o *S. intermedius*, enquanto que o *S. hyicus* e *S. epidermidis*, foram encontrados por (BUZZOLA et al., 2001).

O *S. aureus* é uma das causas de mastite bovina, com maior importância econômica (MYLLYS et al., 1997) e, muitos métodos bioquímicos e moleculares têm sido usados na sua investigação em infecções humanas e bovinas (HARTSTEIN et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990; PREVOST et al., 1991; KOSTEMAN et al., 1992 e KAPUR et al., 1995). O “National Center of Biotechnology Information” (NCBI) identifica o *S. aureus* como Linhagem: *Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus; Staphylococcus aureus*. O *S. aureus* RF 122, registrado no GenBank (AJ 938182) é o mais encontrado em infecções do úbere bovino. O RF 122 em seu genoma completo possui 2665 genes e traduz 2515 proteínas, com um DNA do tamanho de 2.742.531 nanômetros, do tipo circular e que codifica 74 RNAs estruturais. Este genótipo juntamente com o ambiente do úbere bovino é responsável pelo fenótipo dessa bactéria a qual se apresenta como cocos agrupados em forma de cacho de uva e que reage positivamente à coloração de Gram. É encontrado no ambiente externo e nas narinas de pessoas, nas suas pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina, assim como no úbere bovino.

Verifica-se o crescimento de infecções provocadas por *Staphylococcus spp.* ao longo dos anos, tendo como o seu maior representante o *S. aureus*. Caracterizam-se por colonizarem o canal do teto, situando-se em posição estratégica para penetração no úbere, mas não colonizam a pele sadia. Ao penetrarem, no interior do úbere burlam as defesas celulares, são

fagocitados por neutrófilos, permanecendo viáveis no interior destes e ao destruí-los, iniciam novas infecções. Possuem grande poder invasor dos tecidos com capacidade de encistamento, formando focos encapsulados profundos e de difícil acesso a antibióticos que não possuam boa dispersão, o que favorece o desenvolvimento de processos crônicos e subclínicos (HARTSTEIN et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990; PREVOST et al., 1991; KOSTEMAN et al., 1992; KAPUR et al., 1995 e FERNANDES, 2006a).

A mastite causada por *S. aureus* apresenta, segundo QUINN (1994); AXFORD et al. (2000) e FERNANDES, (2006b), as seguintes características infectológicas próprias, onde o habitat natural dessas bactérias são lesões no úbere, na pele e nas membranas mucosas. Os quartos afetados apresentam maior número de células bacterianas no leite, as quais são facilmente transmitidas através das ordenhadeiras, recipientes, utensílios e mão de ordenhadores. O *S. aureus* causa mastite que varia da forma subclínica à peraguda com ameaça à vida, como é o caso da mastite gangrenosa. A gangrena é causada pela ação da α - toxina que lesiona vasos sanguíneos, resultando em necrose isquêmica coagulativa do tecido adjacente. Os quartos afetados ficam com cor púrpura e fria e podem eventualmente desprender-se, se o animal sobreviver à toxemia (FERNANDES, 2006b).

A mastite, na forma subclínica crônica, ocasiona substituição lenta e gradativa do tecido secretório afetado por tecido fibroso com conseqüente diminuição da produção de leite no quarto afetado. Respondem mal à terapia antibiótica, pois há a formação de uma barreira que dificulta a penetração do antibiótico até o sítio da infecção, GONÇALVES e KOZICKI, (1997). A terapia em matrizes secas é mais eficaz, mas apenas 50% das infecções estafilocócicas persistentes respondem à terapia. Estes fatos fazem com que a infecção seja de difícil tratamento, tornando-se um dos maiores problemas da pecuária leiteira. O estudo biotecnológico da *S. aureus*, contribui para a solução deste problema, GONÇAVES e KOZICKI, (1997). As técnicas utilizadas para tipificação da bactéria, revelaram ser bastante eficientes, assegurando o isolamento apenas de *S. aureus*, uma vez que outros estafilococos podem estar presentes no parênquima secretor de leite bovino. Finalizando, podem ser isolados no período seco e pós-parto e estão presentes em rachaduras dos tetos, em lesões de ressecamento destes, em ferimentos, e em prolapsos de esfíncter (FERNANDES, 2006b). Entre as bactérias Gram-negativas mais relatadas são *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*. e *Pseudomonas sp*. As mastites por elas provocadas são conhecidas como mastites ambientais, e a principal é a *E. coli*. Apresentam

normalmente sintomatologia superaguda, com evolução rápida e na maioria das vezes prognóstico sombrio, para saúde da glândula mamária e do animal, devido principalmente à liberação de toxinas a partir de restos celulares provenientes das bactérias mortas, requerendo intervenção imediata e associação de antibioticoterapia sistêmica e intramamária. São isolados freqüentes durante o pós-parto, significando falhas na higienização do úbere, pois são basicamente intestinais e ambientais (FONSECA, 1996).

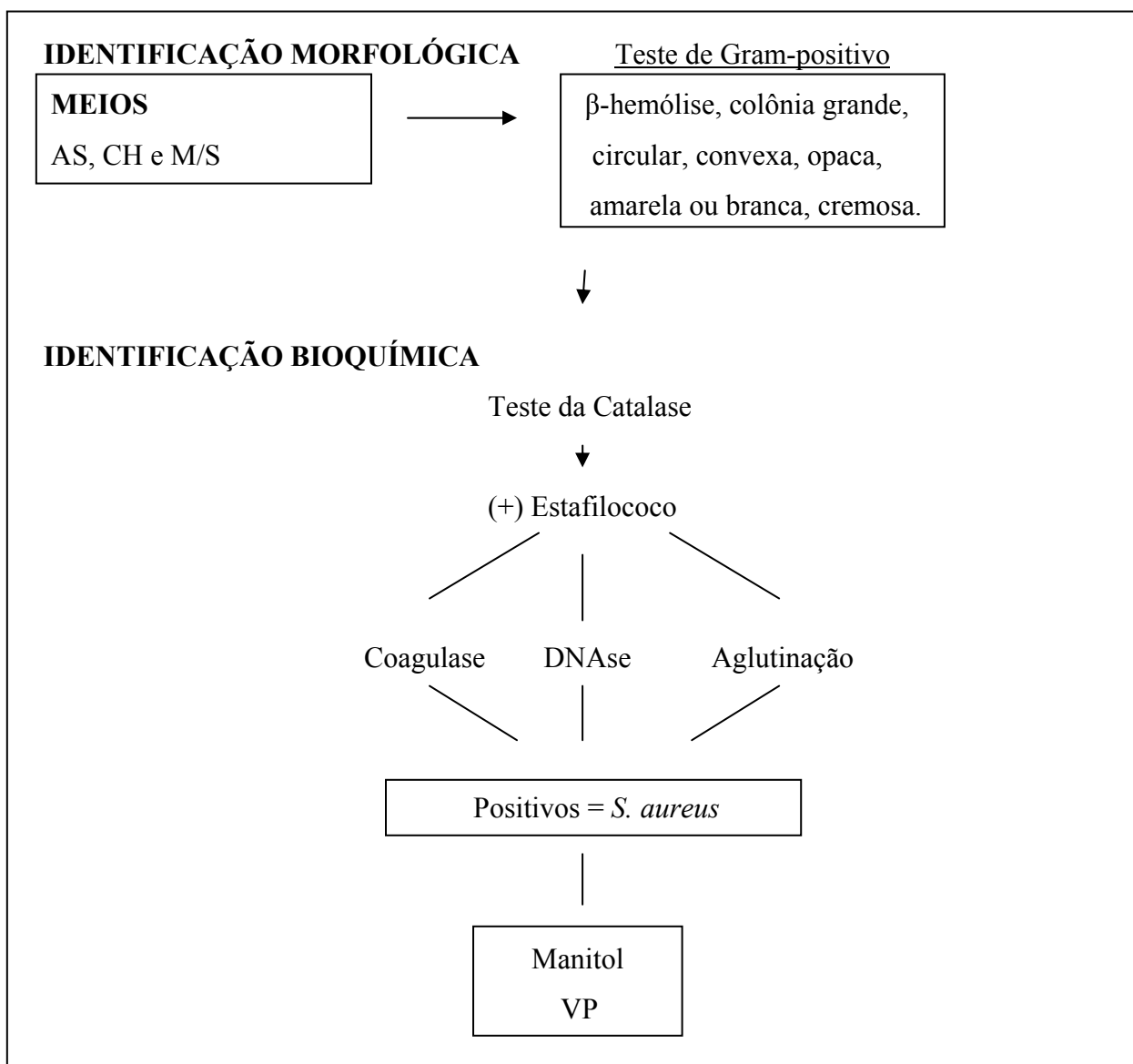
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E TRATAMENTO

Existe uma grande discussão em torno do emprego do diagnóstico laboratorial de mastites bovinas na rotina de granjas leiteiras, principalmente no que se refere ao alto custo do exame e a urgência na escolha da consulta terapêutica. Não se pode esperar 72 h após o envio da amostra ao laboratório (tempo mínimo para obtenção de resultados de isolamento do agente e antibiograma) para se tomar uma decisão. Neste período perdem-se o leite de seis ordenhas, e, dependendo da evolução do quadro clínico, poderá comprometer irreversivelmente a saúde da glândula mamária. Por outro lado, o isolamento bacteriano e respectivo antibiograma são ferramentas imprescindíveis no dia-a-dia da granja leiteira. Além de ser útil para confirmar o diagnóstico clínico, os resultados laboratoriais sugerem possíveis correções no manejo, que podem reduzir sensivelmente as recidivas (FERNANDES, 2006b).

O isolamento bacteriano é realizado por exame direto e por meio de provas bioquímicas, KONEMAN et al. (2001) de acordo com a (Figura 1). Uma vez detectada a mastite, alguns fatores devem ser levados em consideração para a escolha do antibiótico intramamário a ser adotado como o espectro de ação, a adaptação ao manejo (que não altere a rotina da propriedade), o período de carência, histórico de sucesso anterior no rebanho, sucesso reconhecido na região, resultados de testes de sensibilidade, natureza da infecção (algas, fungos e bactérias Gram-positivas e negativas) e o custo-benefício favorável (COSTA et al., 1996). Os resultados dos testes de antibiograma possuem grande importância e são aplicados na triagem dos produtos, que poderiam, a partir de então, ser usados ou não na propriedade, daí a necessidade da opção por um antibiótico de alto poder bactericida, que atue no maior número possível de agentes causadores de mastites, independente de serem clínicas ou ambientais. A aferição de sensibilidade é fundamental para a certeza de se estar utilizando o produto certo e que melhor se aplica no combate aos agentes de mastite naquela propriedade.

As principais bactérias causadoras de mastites possuem comportamentos distintos, como habitat, forma de colonização do úbere, etc. A detecção destas no leite ou no interior do úbere com conseqüentes investigações laboratoriais indica que falhas no manejo podem estar ocorrendo, e com algumas medidas práticas as recidivas podem ser evitadas (VEIGA et al., 1996; FERNANDES, 2006b).

FIGURA 1 - IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*



Meios de cultura: AS = Meio de cultura Ágar sangue; CH = Meio Ágar de Chapman; M/S = Meio Manitol-sal

A identificação do *S. aureus*, (KONEMAN et al., 2001), é mais confiável pela prova da coagulase, pois a sua é livre. Bioquimicamente, o *S. aureus*, sintetiza a coagulase, apresenta endonuclease termoestável, fosfatase alcalina e arginina diidrolase. Produz acetoína, reduz nitratos, maltose, frutose, sacarose, lactose, D-manitol, D-manose, D-trealose, ribose e D-turanose. Destes, a fermentação do manitol serve para diferenciar o *S. aureus* de espécies como o *S. epidermidis*, o *S. hyicus* e o *S. intermedius*. É negativo à ornitina descarboxilase, pirrolidonil arilamidase, β -glicosidase, β -galactosidase, oxidase modificada, rafinose, D-celobiose, D-xilose e L-arabinose. A identificação dessa bactéria é feita inicialmente a partir de esfregaços diretos corados com Gram (KONEMAN et al., 2001).

Nos esfregaços diretos dos isolados corados por Gram, os estafilococos aparecem como cocos Gram-positivos, com 0,5 μm a mais de 1,0 μm de diâmetro. As células são encontradas em forma de cacho de uvas, dentro ou fora de leucócitos polimorfonucleares. É provável que as variações em tamanho das células e na reação à coloração de Gram se devam à ação de células inflamatórias e de suas enzimas hidrolíticas sobre as bactérias. Quando a coloração de Gram apresenta aspectos mais típicos, pode ser emitido um informe como cocos Gram-positivos similares a estafilococos, com posterior confirmação por cultivo (KONEMAN et al., 2001).

O *S. aureus* produz colônias características com cocos organizados na forma de cachos de uva, em ágar sangue. As colônias de algumas cepas de *S. aureus* podem ter pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado, enquanto que outras podem produzir colônias esbranquiçadas ou até cinza. Estas últimas cepas podem ser similares a estreptococos do grupo D e enterococos catalase-negativos. A produção de pigmento por parte do *S. aureus* pode ser evidenciada após incubação à temperatura ambiente. Com freqüência algumas amostras apresentam variações de tamanho na mesma placa de cultivo. Algumas linhagens de *S. aureus* e outras coagulase-negativas podem apresentar uma difusa zona de β -hemólise ao seu redor. Esse fato deve-se à produção de β -hemolisinas por parte das células. Os membros da família *Micrococcaceae* são diferenciados da família *Streptococcaceae* pela prova da catalase. Esta prova detecta a presença de citocromo oxidases nas *Micrococcaceae*. O teste é realizado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na concentração de 3% numa lâmina. A imediata produção de efervescência indica a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio gasoso. A prova da catalase deve ser realizada a partir de um meio de crescimento sem sangue, porque eritrócitos por si só podem produzir uma reação de catalase fraca (KONEMAN et al., 2001). Entretanto, como a maioria dos laboratórios clínicos isola estafilococos de meios não seletivos, contendo sangue, deve-se ter o cuidado de colher apenas a

parte superior das colônias para execução da prova de catalase, evitando-se, assim, a contaminação com sangue e possíveis reações falso-positivas (KONEMAN et al., 2001).

A prova da coagulase é decisiva na identificação do *S. aureus*, e pode ser feita em lâmina ou em tubo. A maior parte dos *S. aureus* possui uma coagulase única ou “fator de agregação”, na superfície da parede celular. Esse fator reage diretamente com o fibrinogênio presente no plasma e produz rápida aglutinação das células bacterianas. Esta prova pode ser executada com microrganismos provenientes de crescimento em ágar sangue, ágar CNA ou outros meios nutritivos não seletivos, mas não deve ser realizada a partir de meios com elevado conteúdo em sais (ágar-manitol-salgado), porque o alto teor em sais, neste caso 7,5%, induz aglutinação espontânea das células. Qualquer cepa negativa em lâmina deve ser confirmada com a prova em tubo, pois existem cepas deficientes em fator de aglutinação e usualmente produzem coagulase livre (KONEMAN et al., 2001). Na prova em tubo, a coagulase estafilocócica detectada é secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominada de “fator de reação com a coagulase”, CRF, para formar um complexo que, por sua vez, reage com o fibrinogênio, formando fibrina. As provas que são consideradas negativas após quatro horas de incubação a 35°C, devem ser mantidas em temperatura ambiente e lidas novamente após 24 horas, já que cepas podem produzir fibrinolisinases por incubação prolongada a 35°C, o que causa a dissolução do coágulo durante o período de incubação (KONEMAN et al., 2001). Raras cepas de *S. aureus* podem ser coagulase-negativas e alguns isolados de origem animal, como em nosso caso (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* e *S. schleiferi* subesp. *coagulans*) podem ser positivos à prova de coagulase em tubo. Recentemente, isolados de infecções humanas dessa última bactéria, encontrada na otite de cães eram positivas para prova em tubos. Esses isolados também produziam DNAses termoestáveis e poderiam ser confundidas com *S. aureus*. Estas cepas podem ser diferenciadas do *S. aureus*, pela ausência da produção de ácidos a partir de maltose, lactose, manitol, sacarose e turanose.

A prova da coagulase em tubos ainda é um procedimento de referência na identificação do *S. aureus*. Embora essa prova seja realmente realizada com isolados desenvolvidos em meios de ágar, também pode sê-lo de hemocultivos, desde que com resultados positivos e sedimentadas por centrifugação.

A fermentação do manitol é outra prova muito importante, pois o *S. aureus* fermenta o manitol ao contrário de outros estafilococos coagulase-negativos, como o *S. epidermidis*. Esta propriedade é utilizada em estudos epidemiológicos para detecção do *S.*

aureus nos solos e nas fezes, assim como para detecção de portadores nasais. O meio utilizado é o ágar-sais-manitol, ou ágar manitol-salgado. Esse meio contém manitol 1%, NaCl a 7,5%, vermelho de fenol e peptonas. A alta concentração de sais inibe o crescimento de outros microrganismos, com exceção de enterococos e isola de forma seletiva o estafilococo. O *S. aureus* pode ser detectado pela presença de um halo amarelo ao redor das colônias, o que indica a produção de ácido a partir do manitol. Entretanto, outras espécies de estafilococos isoladas com pouca frequência também podem produzir ácidos a partir do manitol. Em consequência, os microrganismos manitol-positivos, devem ser controlados quanto à produção de coagulase.

Um teste definitivo para identificá-lo, é o Voges-Proskauer que, em caso positivo desenvolve cor vermelha. Este teste está baseado na conversão de acetil metil carbinol (acetoína) em diacetil através da ação de hidróxido de potássio e oxigênio atmosférico. O diacetil é convertido a um complexo vermelho sob a ação catalítica de α -naftol e da creatina. Observa-se neste teste, que a formação de acetoína e butileno glicol é uma via alternativa do metabolismo do ácido pirúvico. As bactérias que utilizam esta via, como certas linhagens do grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia*, produzem apenas pequenas quantidades de ácidos mistos, que podem ser insuficientes para diminuir o pH do meio de vermelho de metila o bastante para produzir uma mudança de cor. Em consequência, muitas amostras de enterobactérias que são Voges-Proskauer-positivas, são vermelho de metila-negativo e vice-versa, dado esse positivo na identificação do *S. aureus*. Para uma identificação segura do *S. aureus* é importante à complementação entre os testes anteriormente mencionados, para que se tenha certeza de que os isolados tratam realmente, do microrganismo requerido neste trabalho.

2.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA EM BACTÉRIAS

A extração e purificação de DNA genômico de bactérias Gram-positivas, provenientes do úbere bovino, foram estudadas recentemente (BUZZOLA et al., 2001; COUTO et al., 2001), contudo, vários métodos para isolamento do DNA de células procarióticas têm sido descritos (BEIJI et al., 1986; OWEN e BORMAN, 1987; YACOOB e ZEALEY, 1988; PITCHER et al., 1989). Estes pesquisadores demonstram ser mais fáceis extrair DNA de bactérias Gram-negativas, como a *E.coli*, que possui menor quantidade de peptidoglicano na parede celular que das Gram-

positivas, de parede mais espessa e mais difícil de ser rompida. É de se concluir que a diversidade de protocolos existentes, reflete a variabilidade da composição bioquímica encontrada em diferentes células e microrganismos. Estas diferenças protocolares procuram solucionar problemas decorrentes de DNAses endógenas, do isolamento de polissacarídeos inibidores de enzimas (os quais conferem ao DNA extraídos um aspecto gelatinoso e viscoso), de substâncias fenólicas (que conferem tom marrom devida à oxidação dos compostos quinônicos) ou de outras substâncias que possam danificar o material genético, ou inibir a ação da *Taq* polimerase. Inúmeros compostos têm sido usados para extrair o DNA e encontram-se comercialmente disponíveis. Alguns dos mais utilizados são: Tiocianato de Guanidina (BEIJI et al., 1986 e PITCHER et al., 1989); Agepol (Nonidet-Sigma), Sódio Duodecil Sulfato (SDS) (SAMBROOK, et al., 2002). Outros pesquisadores utilizaram SDS juntamente com o CTAB (DELLAPORTA et al., 1983; DOYLE e DOYLE, 1987), com bons resultados. Todos estes métodos envolvendo os reagentes citados utilizam à temperatura, geralmente em torno de 60°C a 65°C. Comercialmente existem muitos “Kits”, destinados à extração de DNA genômico fundamentados nestes detergentes (BEIJI et al., 1986 e PITCHER et al., 1989). Pesquisadores têm extraído DNA genômico de cocos Gram-positivos, utilizando-se de enzimas como a lisozima e a estafilolisina para lise da parede celular, (MYLLYS et al., 1997); (PEREIRA et al., 2002), obtendo amostras de DNA, porém com custo mais elevado.

O Brometo de cetiltrimetilamônio (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), CTAB é um composto de amônia quaternária, usado em cosméticos, desinfecção e sanitização bem como na síntese orgânica de outros produtos. Apresenta fórmula $C_{19}H_{42}BrN$, com ponto de fusão maior que 230°C. Em outras palavras o CTAB também é um detergente, que solubiliza as membranas, formando um complexo com o DNA, facilitando uma posterior precipitação diferencial deste complexo.

É mais comumente utilizado para extração de DNA de diferentes espécies vegetais. Normalmente as extrações por este método fornecem DNA suficientemente puro para digestão com enzimas de restrição e para ampliações por PCR.

O tampão utilizado com CTAB, apresenta um pH entre 8,0 e 9,0, que é desfavorável à ação de enzimas degradantes como as lipolíticas e lipodenasas (pH 5,0 e 6,0) e de DNAses endógenas (pH 7,0). Outro artifício utilizado é o uso de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) nos tampões de extração (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998). Este composto é um agente quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} e,

portanto inibe a ação das DNAses que usam metais como co-fatores (SAMBROOK et al., 2002). Para evitar efeitos indesejáveis de oxidação, diferentes produtos podem ser incluídos nos tampões de extração, como a polivinilpirrolidona solúvel (PVP-40), a albumina de soro bovino (BSA) em concentrações de 1% a 2%. O PVP é um antioxidante que inibe a ação de compostos fenólicos. A BSA atua absorvendo os polifenóis e, portanto, evitando a ação oxidativa dessas substâncias tornando o DNA inacessível às enzimas de restrição (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998; BITTENCOURT, 2000).

Outro composto que pode ser incluído nos tampões de extração para evitar a oxidação por compostos fenólicos é o β -mercaptoetanol a 2%. Ele é um agente redutor que desnatura peroxidases e polifenoloxidasas, impedindo a ação danosa destas enzimas sobre o DNA (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998). Seu aumento para a concentração de 5%, aumenta a quantidade e a qualidade do DNA extraído. Algumas preparações podem necessitar de uma etapa de purificação posterior para remoção de contaminantes como fenóis, polissacarídeos e lipídios.

O aspecto do DNA ao final da extração pode ser utilizado para diagnosticar se ocorreu o co-isolamento de substâncias fenólicas, degradação do DNA por DNAses endógenas, co-isolamento de polissacarídeos que podem inibir enzimas e o co-isolamento de outros compostos secundários que podem danificar o DNA ou inibir a *Taq* polimerase. Dentre estes aspectos observa-se a contaminação por polifenóis que pode ser evidenciada pela coloração do DNA, que tende a ficar marrom. O escurecimento é devido à oxidação dos polifenóis em compostos quinônicos. Estes por sua vez, são agentes oxidantes que danificam DNAs e também proteínas. O co-isolamento de polissacarídeos pode ser facilmente detectado pelo aspecto gelatinoso e excessivamente viscoso do DNA. A contaminação por DNAses endógenas resultam no aparecimento de DNA degradado quando visualizado em gel de agarose (BITTENCOURT, 2000). O DNA genômico obtido para que tenha boa qualidade, deve ser purificado de substâncias indesejáveis, as quais prejudicariam técnicas como a RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e seqüenciamento de amostras já amplificadas.

Após a etapa de ressuspensão do conteúdo celular, realiza-se normalmente uma desproteinização por meio de uma ou mais extrações com solventes orgânicos (fenol ou clorofórmio: álcool isoamílico), seguida de centrifugação para separar a fase orgânica da

aquosa. Esses solventes desnaturam proteínas que ficam na interface, enquanto o DNA e outras substâncias contaminantes, como carboidratos e RNAs, se mantêm na fase aquosa. Alguns protocolos utilizam proteases antes da extração com solventes orgânicos, o que facilita a separação do DNA das proteínas da cromatina (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998; BITTENCOURT, 2000).

Após a etapa de desproteinização, o DNA pode ser precipitado ou sofrer outros tratamentos que o separam dos outros contaminantes. A diálise pode ser considerada uma etapa da purificação do DNA, pois elimina diversos contaminantes de baixo peso molecular. O DNA pode ser concentrado por precipitação por meio de álcool etílico 96% a 100%, podendo realizar-se uma segunda precipitação com álcool etílico com concentração de 70% a 80% que remove sais que co-precipitam com o DNA (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998; BITTENCOURT, 2000).

2.5 MARCADORES MOLECULARES

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade do DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (POLLASTRY, 2002).

Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNRT (*Variable Number of Tandem Repeats*) (JEFFREYS et al., 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), STS (*Sequence Tagged Sites*) (PARAN e MICHELMORE, 1991), Microsatélite (LITT e LUTTY, 1989), e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima descritas. Contudo, os tipos de marcadores aqui listados são ainda os mais utilizados em estudos genéticos. Atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são

importantes para a implementação de marcadores moleculares na análise de polimorfismos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

2.5.1 Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD)

Um aspecto dos mais fundamentais da revolução causada pela PCR foi à possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA (ex. brometo de etídio). Entretanto, a técnica de PCR apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma. A construção de iniciadores para a amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse (BITTENCOURT, 2000). Para se conhecer estas seqüências é necessária a clonagem e seqüenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de seqüência conhecida, a PCR apresentou de início, um uso limitado como técnica para obtenção de marcadores moleculares. O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de seqüência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. WILLIAMS et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA polimórfico amplificado ao acaso. Neste trabalho clássico, este grupo descreveu a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. A técnica de RAPD distingue-se das demais pelo fato de utilizar iniciadores curtos com dez pares de bases de extensão, por razão probabilística. Existem 4^{10} seqüências diferentes de dez nucleotídeos, somando cerca de um milhão delas. A seqüência nucleotídica dos iniciadores é arbitrária, ao contrário de outras que requerem informações a respeito da seqüência de DNA alvo, para o desenho de iniciadores específicos (WILLIAMS et al., 1990). Considerando um genoma de 100.000.000 nucleotídeos, e supondo que a seqüência seja completamente aleatória, é esperado que, em média, existam para cada uma das seqüências de RAPD cerca de 100 seqüências que sejam

idênticas, no genoma, à seqüência de RAPD. Caso elas estejam dispostas palindrômicamente, há a amplificação por PCR. Se uma seqüência aleatória apresentasse 15 nucleotídeos, haveria apenas uma probabilidade de 1/10 de haver seqüência idêntica em um genoma de 100 milhões de nucleotídeos, pois 4^{15} são aproximadamente um bilhão (WILLIAMS et al., 1990). WELSH e McCLELLAND (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*) uma vez que os iniciadores possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso, mas sim em lugares específicos no genoma. O experimento deste grupo foi essencialmente a geração de "*fingerprints*" (impressões digitais) genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução juntamente com iniciadores um pouco mais longos.

Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas tem tido uma difusão extremamente rápida. As aplicações incluem: a obtenção de padrões genômicos de indivíduos, variedades e populações. A análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; O estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; A construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico. RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintivas: Utiliza um iniciador único ao invés de um par de iniciadores; o iniciador único tem seqüência arbitrária, e, portanto a posição da seqüência alvo é desconhecida. Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao iniciador arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese. A eletroforese é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídio em luz ultravioleta. A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a

não complementaridade do iniciador com o sítio de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento (WILLIAMS et al., 1990).

Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes. Dominância neste caso não se refere ao conceito clássico de interação entre alelos de um mesmo loco, e sim puramente do ponto de vista da interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo. Ao se observar uma banda RAPD no gel, não é possível distinguir se aquele segmento se originou a partir de uma ou de duas cópias da sequência amplificada. Ou seja, um indivíduo diplóide homocigoto para aquele loco RAPD possui dois "alelos" RAPD idênticos (AA) a partir dos quais a amplificação ocorre. Por outro lado, um indivíduo heterocigoto (Aa) para o mesmo loco RAPD possui um "alelo" (A) que é amplificado e outro (a) que não o é, devido a qualquer uma das causas de polimorfismo mencionadas anteriormente. A detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar os dois casos. Por isso enquanto o genótipo homocigoto "recessivo" (aa) é identificado pela ausência da banda no gel (fenótipo nulo), os genótipos homocigoto "dominante" (AA) e heterocigoto (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, isto é, a presença da banda no gel. A técnica RAPD detecta, assim, apenas um alelo em cada loco. A ausência de banda representa, na verdade, o conjunto de todos os outros alelos daquele loco que não podem ser amplificados por um motivo ou outro (ex. mutação, inserção, deleção).

Embora a grande maioria dos marcadores RAPD possua um comportamento "dominante", existe a possibilidade de se amplificar marcadores co-dominantes, ou seja, amplificar ambos os alelos de um loco (indivíduo diplóide) utilizando-se o mesmo iniciador. Co-dominância de marcadores RAPD resulta de pequenas inserções ou deleções de DNA entre os sítios de iniciação dos iniciadores. A detecção de marcadores co-dominantes tipicamente só é possível ser feita em experimentos que envolvam a análise de segregação de marcadores em progênies lado a lado com os parentais como, por exemplo, durante a construção de mapas genéticos. Nestas condições experimentais existe um modelo genético de segregação Mendeliana ao quais alelos co-dominantes devem se

adequar. Basicamente, alelos co-dominantes RAPD devem ser amplificados com o mesmo iniciador e estar presentes simultaneamente em indivíduos heterozigotos. Experimentos de confirmação de co-dominância podem ser realizados através da utilização de um dos segmentos RAPD como sonda de hibridização contra o outro segmento suspeito co-dominante. Frequentemente, detectam-se segmentos RAPD funcionalmente co-dominantes, mesmo quando resultantes da amplificação por iniciadores diferentes. Neste caso, os segmentos aparecem na progênie de forma mutuamente exclusiva, ou seja, sem qualquer evento de recombinação entre eles (PARAN e MICHELMORE, 1991).

A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Exceção feita para alelos co-dominantes, resultantes de pequenas inserções ou deleções no loco RAPD. Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigoto pela técnica RAPD. Esta limitação é comumente descrita como "dominância" dos marcadores RAPD. Outro aspecto que pode ser uma limitação em alguns casos é o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD. Estritamente falando, uma banda RAPD observada no gel só pode ser considerada um marcador de comportamento Mendeliano depois de verificada sua segregação de parentais para descendentes. É importante ressaltar, no entanto, que este pré-requisito é necessário, em princípio, para todo e qualquer tipo de marcador molecular, isoenzimas, RFLP ou outros. Assim como para todos os tipos de marcadores, no caso dos marcadores RAPD algumas bandas são fácil e claramente interpretadas, enquanto que outras são ambíguas. A ambigüidade pode resultar: de um iniciador específico discriminar entre sítios de amplificação distintos; da competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima, de maneira que a presença de certos segmentos pode interferir com a amplificação de outros, num processo equivalente a uma interação "epistática" entre marcadores o que influencia o fenótipo final das bandas; de problemas relacionados com a padronização de condições de amplificação. Variação de laboratório para laboratório, como resultado de perfis térmicos diferentes entre diferentes aparelhos termocicladores tem sido observada (PENNER et al., 1993; WANG et al., 1993). Dentre as diversas técnicas utilizadas, RAPD é a de menor número de etapas e tempo para obter resultados além de fácil execução. Contudo, apresenta a desvantagem de ser de baixa repetibilidade e pouca consistência de um laboratório para outro, o que

dificulta a comparação entre dados obtidos em diferentes locais. Em geral como não é necessário o conhecimento prévio sobre o genoma da espécie avaliada e os iniciadores utilizados são aleatórios, uma série de reações costuma ser realizada (cada reação um iniciador) para se avaliar o polimorfismo através de RAPD. No entanto alguns trabalhos têm sugerido que quando a variabilidade genética é elevada em uma população, o uso de poucos iniciadores, ou um menor número de reações seria suficientes, o que reduziria custo e tempo operacional (WILLIAMS et al., 1990).

2.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação da polimerase em cadeia é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações em medicina veterinária, tanto em pesquisa básica como aplicadas, tendo proporcionado a seu autor, Kary B. Mullis, no início da década de 90, o prêmio Nobel de medicina. Por meio da PCR, pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar cem bilhões de moléculas similares em uma tarde (MULLIS, 1990). PCR pode ser definido como um método “*in vitro*” para produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e seqüência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde complexo de ácido nucléico (MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). O número de fragmentos amplificados duplica-se a cada ciclo da reação, sendo, portanto, um processo exponencial.

A reação de amplificação é catalizada pela DNA polimerase que alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, chamado de oligonucleotídeo iniciador ou “*primer*”, quando este está ligado a uma fita molde de DNA. O alongamento é feito pela adição na extremidade 3’ do iniciador, do nucleotídeo complementar ao nucleotídeo correspondente na fita molde. O fragmento amplificado é aquele compreendido entre as duas extremidades 3’ de um segmento duplex, complementares aos dois iniciadores utilizados na reação. Os iniciadores são sintetizados artificialmente, tendo como base uma seqüência de nucleotídeos complementares às seqüências que delimitam o fragmento de ácido nucléico a ser amplificado. A PCR é inicializada pela separação das fitas moldes de DNA, através da elevação de temperatura da reação, ao que se chama de desnaturação. A temperatura é então diminuída para que haja o anelamento dos iniciadores com o molde de DNA, e a polimerase possa atuar estendendo um novo fragmento. O fragmento produzido

na reação anterior serve também como molde para a reação seguinte. PCR envolve, portanto, ciclos repetidos de desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores com as seqüências complementares e polimerização da fita complementar ao molde. Os segmentos de DNA são sintetizados em uma progressão geométrica, pois a cada ciclo origina-se um novo segmento a partir do inicial e de cada um dos segmentos já produzidos no ciclo anterior. Inicialmente, a enzima utilizada para a reação de PCR era a DNA polimerase de *E. coli*, fragmento Klenow da polimerase I (ERLICH et al., 1991; SLIGHTOM et al., 1995) que, por ser termolábil, era adicionada a cada ciclo de reação, porque era destruída na etapa seguinte de desnaturação. Atualmente, é utilizada a DNA polimerase isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (SAIKI et al., 1988), por isso chamada *Taq* polimerase. Essa enzima permite a realização de múltiplos ciclos de reação, com uma única adição de enzima, o que possibilitou a automatização da reação, generalizando seu uso. A *Taq* polimerase suporta temperaturas de 95°C e é mais ativa entre 70°C e 75°C, temperatura em que o pareamento entre os iniciadores e o DNA é mais específico (estringente), do que a 37°C, temperatura ótima para a polimerase de *E. coli* (SINGER et al., 1993). Para uma reação de PCR é necessário, portanto, amostra do ácido nucléico com o fragmento molde, a enzima catalizadora da reação, os iniciadores específicos, os nucleotídeos que constituirão o novo fragmento e os cofatores da reação, e um tampão.

PCR tem a vantagem de necessitar somente de quantidades muito pequenas do DNA a ser ampliado, menores que a de RAPD. É uma técnica tão sensível, que o DNA isolado de uma única célula, é suficiente para detecção de seqüências específicas de genes. Além da detecção de genes em um DNA genômico, a PCR pode ser aplicada para: clonagem de DNA; sequenciamento; quantificação de seqüências específicas; análise de expressão gênica pela amplificação a partir de mRNA; mutagênese direta e indireta; análise da estrutura de genomas; análise de interações DNA-proteína; evolução molecular; identificação de mutações, novos membros de famílias multigênicas e de polimorfismo; diagnóstico de patógenos e de doenças hereditárias; identificação de anormalidades cromossomais; mutações somáticas específicas e terapia gênica (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

O resultado da amplificação de ácido nucléico por PCR pode ser facilmente visualizado por eletroforese em gel de agarose. O sucesso da amplificação depende das condições da reação, da pureza dos reagentes utilizados e dos diferentes parâmetros da

reação. Tais parâmetros podem ser testados e otimizados em diferentes reações e devem ficar dentro dos limites a seguir citados, pois acima disso podem provocar o aparecimento de produtos inespecíficos, onde a quantidade de enzima varia em torno de 1,0 a 2,5 U para reações com volumes finais de 25 a 50 μL ou 1 a 4 U para reações para um volume final de 100 μL . A concentração de cada nucleotídeo deve ficar entre 20 e 200 μM (MULLIS e FALLONA, 1987; BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998). Os oligonucleotídeos iniciadores devem estar em uma concentração de 100 a 500 μM , e a concentração de magnésio no tampão em torno de 0,5 a 2,5 mM .

2.5.3 Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento do DNA pode ser feito a partir do DNA mode inserido em plasmídeo, ou em produto de PCR. Segundo a EMBRAPA (2006), podem ser utilizados os kits de seqüenciamento da *Applied Biosystems ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Kit versão 3.1), ou o Kit *DYEnamic[™] ET dye terminator MegaBACE[™]* (Amersham Biosciences), para sua realização. A cultura para o crescimento bacteriano e minipreparação plasmidial pode ser realizado em formato de placa de 96 poços ou em amostras individuais para cada isolado, dependendo do número de amostras a serem trabalhadas. O procedimento baseia-se no crescimento bacteriano em meio de cultura líquido LB ou Circle Grow, lise alcalina e purificação com sistema de filtragem Millipore para as placas de 96 poços mediante centrifugação, ou outros meios de purificação do DNA plasmidial ou de PCR (EMBRAPA, 2006). O procedimento de purificação da reação de seqüenciamento antes da análise eletroforética é realizado seguindo as recomendações especificadas para o kit de seqüenciamento do ABI e baseia-se essencialmente em precipitação do DNA com etanol e remoção dos nucleotídeos não incorporados pela centrifugação e lavagem do *pellet* de DNA (EMBRAPA, 2006). Devidamente secos os *pellets* são submetidos à eletroforese no ABI 377 em placas, ou em ABI 3700, com tubos capilares, dependendo do número de amostras a seqüenciar. Este último consegue leitura para entre 500 e 700 amostras, enquanto que em placas, o ABI 377 tem capacidade geralmente para 50 amostras. Na eletroforese com gel o tempo de corrida é de até 20 horas, tempo este no qual, se medem os comprimentos de ondas, por ocasião da passagem de um feixe de luz emitido através do gel, dados estes que são registrados ao

nível de programas computacionais, gerando “eletroforetogramas”, também chamado de cromatograma. O eletroforetograma apresenta cores pré-estabelecidas para cada um dos quatro nucleotídeos encontrados no DNA ou RNA. No caso do DNA, a adenina é corada em verde, a guanina em preto, a citosina em azul e por último, a timina é corada em vermelho (EMBRAPA, 1996). A seqüência dessas bases pode ser vista também de uma segunda forma, ou seja, pela utilização das letras iniciais de cada uma das bases, ao se mudar o tipo de linguagem computacional. Um dos programas utilizados para realização deste trabalho, é o Bioedit 5.0.6 que permite, além de outras tarefas, a edição das seqüências, a correção de “*gaps*”, como se verá em seguida ao tratarmos do tema de análise de distância (EMBRAPA, 2006).

2.5.4 Análise de Distância

A análise de distância requer várias etapas, para obter-se uma árvore filogenética final que possa representar sua história evolutiva (CRUZ, 2001). É necessário construir esta árvore e avaliá-la (HERSHKOVITZ e LEIPE, 1998).

Antes do desenvolvimento deste processo é necessária, por se tratar de filogenia molecular, que se defina uma molécula que leve em conta as semelhanças entre os microrganismos. A análise filogenética de DNA ou proteína é uma importante ferramenta para estudar a história evolutiva dos microrganismos. Uma vez que a taxa evolutiva das seqüências varia com o gene ou segmento de DNA (WILSON et al., 1977) por estar sobre pressão de seleção, variando entre um gene ou outro, entre diferentes partes do mesmo gene, e entre uma linha e outra de descendentes. Isso significa que seqüências de nucleotídeos podem mudar rápido o suficiente para mostrar variação significativa ao nível intraespecífico (pseudogenes, ou sítios silenciosos de códons), considerando que as seqüências que são cruciais para funções altamente conservadas, permanecerão reconhecíveis. Esta variação de taxas permite compará-las, caso sejam bem escolhidas. Também significa que análises cada vez mais sofisticadas têm que ser desenvolvidas para extrair ao máximo a informação filogenética (YONG, 1992).

A análise filogenética é por outro lado, importante para estudar-se o padrão de famílias multigenes (ATCHLEY e ZHU, 1997), bem como para entender a evolução adaptativa ao nível molecular (JERMANN et al., 1995; WISTOW, 1993). Esta técnica

permite uma visão aprofundada do mecanismo de manutenção de alelos polimórficos em populações (TAKAHATA, 1993). Entretanto, existem duas razões pela qual a filogenia molecular pode falhar: a similaridade entre as seqüências pode não ocorrer devido à ancestralidade de um gene, que pode não ser representativa da história evolutiva do genoma como um todo. A evolução convergente é um problema menor para o genótipo do que para o fenótipo, uma vez que o mapa a partir do genótipo para o fenótipo é redundante. Desta forma, a ação de forças seletivas similares pode causar a mesma capacidade metabólica evoluir independentemente em diferentes organismos, mas é virtualmente certo que as seqüências dos genes responsáveis irão reter diferenças características (YONG, 1992).

Emile Zuckerkandl e Linus Pauling em 1965 introduziram a idéia de que moléculas podem ser usadas como “cronômetros moleculares” (ZUCKERKANDL e PAULING, 1965), abrindo a possibilidade do uso de moléculas de DNA ou proteína como “documentos da história evolutiva” de seres vivos. Uma década mais tarde, Carl Woese e colaboradores identificaram o gene para o RNA ribossomal de 16S, como poderoso marcador filogenético, utilizando-o para propor um terceiro domínio dos seres vivos, o domínio das Arqueobactérias (FOX et al., 1980). O conteúdo informativo das moléculas marcadoras é crítico na análise filogenética e o esforço para reconstruir a história de um gene ou organismo analisando seqüências moleculares particulares está em função do número e caráter das mudanças detectáveis na seqüência. Assim, o conteúdo informativo máximo depende do número de nucleotídeos ou de aminoácidos da molécula e dos estados potenciais assumidos pelos caracteres (4 nucleotídeos e 20 aminoácidos). Portanto, a análise comparativa de moléculas marcadoras permite somente uma primeira aproximação do curso da evolução bacteriana (LUDWIG e SCHLEIFER, 1999).

Diversas ferramentas para alinhar seqüências foram desenvolvidas nos últimos 25 anos, podendo-se dividi-las “grosseiramente” em GLOBAL e LOCAL, que por sua vez são separadas em métodos de alinhamento em PARES, por estudarem duas seqüências e MÚLTIPLO, mais de duas seqüências (ALTSCHUL, 1997; ALTSCHUL et al., 1997). A maioria dos métodos de análise filogenética trabalha a partir de um grupo de seqüências alinhadas pelo método de alinhamento múltiplo, quando se querem estabelecer relações evolutivas de um grupo de organismos. Neste caso, as seqüências são dispostas cada uma numa linha, de modo que cada base seja colocada numa coluna chamada de sítio que

contenha esta mesma base em todas as seqüências, sem que para isso a estrutura primária da molécula seja alterada.

Para isso se aceita o pressuposto de que a semelhança entre as seqüências reflete a hipótese de homologia entre elas. A única alteração permitida é a introdução de espaços denominados falhas (“*gaps*”) que representam deleções de nucleotídeos, durante a evolução. Normalmente como não se tem informações sobre a ancestralidade em relação aos organismos nas análises filogenéticas, é válido pensar que as falhas possam representar inserções nas seqüências que não às possuem. Uma falha é difícil de interpretar em termos evolutivos, não havendo métodos confiáveis que possam usar a informação contida em seus padrões (GOLDMAN, 1997). Entre duas seqüências é possível encontrar diversas possibilidades para o alinhamento e este problema torna-se mais grave no alinhamento múltiplo. O número de comparações aumenta geometricamente em relação ao número de seqüências a serem alinhadas, tornando os cálculos impraticáveis, quando se trabalha com algumas dezenas de seqüências, mesmo em computadores com grande capacidade de análise. Por isso a maior parte dos programas para esta finalidade utiliza um conceito denominado *alinhamento progressivo* (SANKOFF, 1975).

A idéia de alinhamento progressivo depende da existência de um relacionamento filogenético entre as seqüências, para que o alinhamento comece a ser feito entre as seqüências mais próximas e seja “progressivamente” conduzido, até que a seqüência mais distante seja incorporada. Este fato remete a um paradoxo: a análise filogenética de um grupo de seqüências depende do correto alinhamento entre elas e, da mesma forma, para se conseguir o alinhamento confiável é preciso ter um alinhamento prévio das relações filogenéticas entre as seqüências. Na prática, os programas mais usados, como o *Clustal W*, HIGGINS et al. (1994), partem do alinhamento aos pares, montam uma matriz de similaridade entre todos os pares de seqüências e calculam a “árvore filogenética” grosseira para guiar o alinhamento múltiplo propriamente dito. Este método não garante que tenhamos sempre o melhor alinhamento possível, mas torna-se tanto mais confiável quanto maior for o grau de conservação entre as seqüências e é bastante rápido, permitindo o alinhamento de centenas de seqüências em relativamente pouco tempo.

Até o presente momento, dois elementos do modelo de substituição podem ser acessados para dados de nucleotídeos, mas não para dados de aminoácidos ou códons. Um deles é o modelo de substituição entre bases, e o outro a taxa relativa de substituição entre os

diferentes sítios da seqüência. Variáveis mais complexas, como os modelos de substituição sítio-específico ou linhagens-específicas, não podem ser determinados (HERSHKOVITZ e LEIPE, 1998).

Para estabelecer o modelo de substituição entre bases é preciso considerar dois tipos de substituições de bases, quimicamente distintos, que são observados no DNA. A primeira é aquela onde uma base é substituída por outra quimicamente semelhante, ou seja, uma purina sendo substituída por outra purina (ex., A→G) ou uma pirimidina substituída por outra pirimidina (ex. C→T). A este tipo de substituição denomina-se TRANSIÇÃO. O segundo tipo é aquele que ocorre a substituição de bases quimicamente distintas, como uma purina sendo substituída por uma pirimidina (ex., A→C) ou vice-versa. A esse segundo tipo de substituição dá-se o nome de TRANSVERSÃO. A transversão normalmente é menos comum de que a transição (HERSHKOVITZ e LEIPE, 1998).

Na prática, a especificação das taxas relativas de substituições entre resíduos particulares normalmente tem a forma de uma matriz quadrada, com um número de linhas e colunas sendo igual a quatro para as bases do DNA. Estas matrizes podem determinar, os “pesos” que serão aplicados às substituições pelos algoritmos de construção da árvore, como são feito quando se usa o método de Máxima Parcimônia. Neste caso, onde a matriz de “pesos” é aplicada, o método é referido como “Parcimônia Ponderada”. Para os métodos de construção de árvores de distância e Máxima Verossimilhança, o “peso” dado às substituições pode ser derivado dos próprios dados, sendo a matemática envolvida mais complexa (HERSHKOVITZ e LEIPE, 1998).

O segundo elemento, a taxa relativa de substituição total entre diferentes sítios, também afeta os resultados da construção da árvore. O exemplo mais óbvio desta variação é aquela entre as três posições de códon, onde a terceira posição tende a ser a mais variável que as duas primeiras. Por esta razão, em algumas análises feitas a partir de seqüências codificadoras de proteínas, a terceira posição é excluída (HERSHKOVITZ e LEIPE, 1998). Variação entre sítios também é observada no 16S rRNA, entre as posições mais ou menos conservadas (VAN DE PEER et al., 1996). Entretanto, as abordagens a esta questão são matematicamente mais complexas como no modelo não paramétrico (YANG et al., 1996) e no modelo invariante e modelo de distribuição gama (SWOFFORD et al., 1996). Estes modelos ainda não são rotineiramente empregados, mas o modelo de distribuição

gama começa a ganhar força, na medida em que novos algoritmos têm sido desenvolvidos e disponibilizados nos pacotes de programas para análises filogenéticas.

A reconstrução de árvores filogenéticas usando métodos estatísticos foi iniciada independentemente em taxonomia numérica para caracteres morfológicos (SNEAT e SOKAL, 1973) e em genética de populações para os dados de frequência gênica (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1964). Alguns dos métodos estatísticos desenvolvidos para este propósito são ainda usados na análise filogenética de dados moleculares, mas recentemente novos métodos têm sido desenvolvidos. As relações genéticas são tradicionalmente representadas em um diagrama denominado de “árvore”, assim denominado devido à maneira com que os ramos das diferentes linhagens analisadas são arranjados, lembrando os ramos de uma árvore. Embora esta representação não mostre todas as possíveis variações da maneira como os organismos evoluem (ex: são incapazes de mostrar a transferência horizontal da informação genética), ela tem persistido, por ser, freqüentemente, uma aproximação e por ser a maneira mais facilmente tratada computacionalmente (GOLDMAN, 1997).

O estudo de árvores forma uma parte da matemática conhecida como teoria gráfica e, embora haja uma considerável variação nos termos usados, alguns deles são aqui definidos e denominados, para um melhor entendimento das discussões posteriormente apresentadas acerca deste assunto. Segundo NEI et al. (1995) e NEI (1996), consideram-se atualmente a reconstrução de uma árvore filogenética como uma inferência estatística de uma verdadeira árvore filogenética, entendendo-se como “verdadeira” a real história evolutiva do grupo de organismo em estudo. Há dois processos envolvidos nesta inferência: “estimativa” da topologia ou do padrão de ramos de uma árvore e estimativa dos comprimentos dos ramos para uma dada topologia de árvore. Quando a topologia é conhecida, estimativas estatísticas do comprimento dos ramos são relativamente simples. O problema maior reside na estimativa ou reconstrução de uma topologia.

O número de topologias a serem analisadas aumenta rapidamente em relação ao número de organismos ou seqüências sendo comparados. Desta forma, analisando-se quatro organismos, existem apenas três possíveis topologias (considerando-se árvores sem raiz e ramos divididos dicotomicamente); quando este número aumenta para dez organismos, o número de topologias possíveis torna-se gigantesco, sendo igual a 2.027.025; se o número de organismos é igual a vinte, o número de topologias possíveis atinge inimagináveis 8×10^{20}

árvores (PENNY, 1991), o que seria impraticável de se calcular até mesmo em computadores de alta capacidade de processamento. Apesar dos fundamentos matemáticos em filogenia molecular não estarem bem estabelecidos, simulações por computador e dados empíricos indicam que os métodos atualmente usados, como *Neighbor-Joining*, Evolução Mínima e Parcimônia produzem árvores filogenéticas razoavelmente boas quando um número suficientemente grande de nucleotídeos é usado. Entretanto, quando a taxa de evolução varia extensivamente de ramo a ramo, muitos métodos podem falhar em recuperar a verdadeira topologia (NEI, 1996).

**CAPÍTULO I – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* DE
MASTITES CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS BOVINA.**

Capítulo I

INTRODUÇÃO

Segundo CULLOR (1992), a mastite é uma doença que ataca em média 15% das vacas leiteiras em todo mundo, com prevalência na ordem de 50%, dados confirmados por GONÇALVES e KOZICKI (1997) e GONÇALVES et al. (1999) e podem ser divididas em clínicas ou ambientais e subclínicas ou contagiosas. As mastites subclínicas são consideradas as de principal impacto econômico, por acometerem o maior número de matrizes produtivas, principalmente as provocadas pelo *S. aureus*, que se apresentam na forma subclínica crônica, mais contagiosa. Na forma subclínica a bactéria não é facilmente controlada por antimicrobianos e a mastite caracterizada por alta contagem de leucócitos (neutrófilos ou polimorfonucleares), no leite (FONSECA, 1996). A invasão e lesão tecidual da glândula mamária por estes microrganismos iniciam uma resposta inflamatória com conseqüente aparecimento de sinais clínicos que incluem mudanças na aparência do leite, em sua composição, altas contagens leucocitárias e grande redução do volume produzido (FERNANDES, 2006a, b). Segundo AXFORD et al. (2000), os prejuízos são da ordem de US\$ 180. 00 por animal doente, além de imensuráveis problemas de saúde pública.

Ao longo dos últimos anos tem se observado o crescimento de infecções provocadas por *Staphylococcus spp.*, tendo como principal agente etiológico o *S. aureus*, os quais caracterizam-se por colonizarem o canal do teto, situando-se em posição estratégica para penetração no úbere, mas não colonizam a pele sadia. Ao penetrarem, no interior do úbere burlam as defesas celulares, são fagocitados por neutrófilos, permanecendo viáveis no interior destes e ao destruí-los, iniciam novas infecções. Estes possuem grande poder invasor dos tecidos com capacidade de encistamento, formando focos encapsulados profundos e de difícil acesso a antibióticos que não possuam boa dispersão, o que favorece o desenvolvimento de processos crônicos e subclínicos (HARTSTEIN et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990; PREVOST et al., 1991; KOSTEMAN et al., 1992; KAPUR et al., 1995). Estudos biotecnológicos envolvendo desde o isolamento, identificação e diagnóstico da bactéria *S. aureus* vem sendo realizados GONÇAVES e KOZICKI, (1997).

Capítulo I

As técnicas aplicadas visando o isolamento e identificações dos diferentes sorotipos revelaram ser bastante eficientes, assegurando a recuperação apenas de *S. aureus*, uma vez que outros estafilococos podem estar presentes no parênquima secretor de leite bovino, (FERNANDES, 2006b). No presente capítulo foi investigado a presença da bactéria *S. aureus* em úberes portadores de mastite clínica e subclínica, visando posterior estudo genético para a identificação de diferentes biosorotipos e correlaciona-los com as diferentes manifestações clínicas da doença.

Capítulo I

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PROPRIEDADES E ANIMAIS

Matrizes de doze propriedades, com diferentes níveis tecnológicos, foram acompanhadas, todas submetidas à ordenha mecanizada, onde havia casos subclínicos crônicos de mastite. Os animais foram selecionados a partir da verificação de altas contagens de células somáticas (CCS) e de “*California Mastitis Test*” (CMT) (SCHALM e NOORLANDER, 1957). Foram considerados positivos os testes de CMT: reação 1, 2 e 3 cruces (Tabela 1).

TABELA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE O RESULTADO DO “*CALIFORNIA MASTITIS TEST*” - CMT, E A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS – CCS

CMT (Reações)	CCS (nº/mL)
<i>Negativo</i>	
Traços	0 – 200.000
Reação “1” cruz +	150.000 – 500.000
Reação “2” cruces ++	400.000 – 1.500.000
Reação “3” cruces +++	800.000 – 5.000.000
	> 5.000000

Fonte: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

2.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi realizada previamente uma desinfecção do local da coleta com álcool-gel 70% e os três primeiros jatos de leite foram desprezados para evitar contaminação das amostras. Foram coletadas 217 amostras de leite mastítico (ANEXO I), transportadas sob refrigeração, e conservadas a -20° C, até o momento das análises microbiológicas realizadas no laboratório de Microbiologia da UFPR.

Capítulo I

2.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

As amostras de leite mastítico foram semeadas em ágar sangue de carneiro e incubadas a 37° C durante 24 h. Após a incubação, as colônias β-hemolíticas desenvolvidas no ágar sangue, foram identificadas morfológicamente pela coloração de Gram. As colônias com características morfológicas de *Staphylococcus* (cocos Gram-positivos), foram repicadas em ágar Chapman (ágar manitol-NaCl), incubadas a 37° C durante 24 h. Após o crescimento, foram realizadas as seguintes provas bioquímicas para a identificação de *S. aureus*: fermentação do manitol, coagulase em tubo e prova de Voges-Proskauer (VP). Amostras de *S. aureus* β-hemolíticos, manitol, coagulase e V.P. positivos, foram conservadas a 4-8° C, em ágar manitol-NaCl inclinado (KONEMAN et al., 2001).

Capítulo I

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS

Através das análises morfológicas utilizando a coloração de Gram, foi evidenciada nas 217 amostras a presença de *Staphylococcus sp.* em 112 (51,61%), *Streptococcus sp.*, 2 (0,92%), *Micrococcus sp.* 67 (30,87%), Bacilos Gram-positivos, 23 (10,60%) e Leveduras (6,0%). Os resultados obtidos através das provas bioquímicas (fermentação do manitol +, prova da coagulase + e VP +), assim como a β -hemólise, confirmaram a presença de *S. aureus* em 75 amostras (34,61%). Os resultados podem ser visualizados com detalhes na tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE LEITE BOVINO (n = 217)

Nº Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catalase	Coagulase (Tubo)	Manitol Salgado	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
6	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
7	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
8	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
9	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
10	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
11	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
12	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
13	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
14	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
15	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
16	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

segue

continuação

Nº Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catalase	Coagulase (Tubo)	Manitol	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
17	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
18	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
19	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
20	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
21	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	-	+
22	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
23	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
24	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
25	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
26	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
27	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	-	+
28	NV	NC	Bacilos/cocos	+	NV	NV	NV	NV
29	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
30	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
31	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
32 A	NV	-	<i>Bacilos</i>	+	NV	NV	NV	NV
32 B	NV	-	<i>Bacilos</i>	+	NV	NV	NV	NV
33	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
34	α - hemólise	-	<i>Staphylococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
35	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
36	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
37	NV	-	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
38	nv	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
39	β - hemólise	-	?	+	NV	NV	NV	NV
40	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
41	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
42	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
43	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
44	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
45	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
46	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
47	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
48	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV

segue

continuação

Nº Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catalase	Coagulase (Tubo)	Manitol	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
49	β - hemólise		<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
50	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
51	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
52	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
53	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
54	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
55	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
56	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
57	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
58	NV	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
59 A	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	-	+
59 B	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
60	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
61	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
62	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
63	β - Hemólise	+	<i>S. aureus.</i>	+	+	+	+	+
64	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
65	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
66	NV	-	Cocos isolados	-	NV	NV	NV	NV
67	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
68	NV	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
69	NV	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
70	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
71	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
72	β - Hemólise	+	<i>S.aureus</i>	+	+	+	+	+
73	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
74	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
75	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
76	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
77	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
78	β - Hemólise	+	<i>S.aureus</i>	+	+	+	+	+

segue

continuação

Nº Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catalase	Coagulase (Tubo)	Manitol	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
79	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
80	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
81	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
82	NV	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
83	β - Hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	-
84	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
85	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
86	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
87	β - Hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
88	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
89	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
90	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
91	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
92	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+		+	+
93	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
94	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
95	NV	NC	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
96	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
97	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
98	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
99	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
100	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
101	NV	NC	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
102	NV	+	<i>Micrococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
103	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
104	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
105	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
106	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
107	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
108	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
109	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
110	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV

segue

continuação

Nº Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catala se	Coagulase (Tubo)	Manitol	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
111	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
112	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
113	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
114	NV	+	Leveduras	+	NV	NV	NV	NV
115	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
116	β - Hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
117	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
118	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
119	α -hemólise	NC	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
120	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
121	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
121	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
122	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
123	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
121	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
122	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
123	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
124	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
125	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
126	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
127	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
128	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
129	+	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
130	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	-	+
131	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
132	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
133	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	-	+
134	β - hemólise	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
135	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
136	+	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
137	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
138	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+

segue

continuação

Nº Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catalase	Coagulase (Tubo)	Manitol	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
139	+	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
140	β - hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
141	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
142	+	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
143	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
144	NC	NC	NV	NV	NV	NV	NV	NV
145	NC	NC	NV	NV	NV	NV	NV	NV
146	+	-	-	NV	NV	NV	NV	NV
147	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
148	+	-	Micrococcus	+	NV	NV	NV	NV
149	+	-	Micrococcus	+	NV	NV	NV	NV
150	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
151	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
152	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
153	+	+	Cocos isolados	NV	NV	NV	NV	
154	β - hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	-	+
155	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
156	β - hemólise	+	+	+	+	-	+	+
157	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
158	β - Hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
159	β - Hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
160	β - Hemólise	+	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
161	β - Hemólise	-	Micrococcus	+	NV	NV	NV	NV
162	β - Hemólise	-	Micrococcus	+	NV	NV	NV	NV
163	β - Hemólise	+	<i>Staphylococcus</i>	+	-	NV	NV	NV
164	+	-	<i>Streptococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
165	+	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
166	+	-	<i>Streptococcus</i>	+	NV	NV	NV	NV
167	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
168A	NC	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+

segue

continuação

Nº Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catalase	Coagulase (Tubo)	Manitol	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
168B	+	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
168C	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
168D	+	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
169A	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
169B	+	+	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
169C	+	+	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
170	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
170A	+	-	Bacilos	+	NV	NV	NV	NV
170B	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
170C	+	=	<i>Staphylococcus</i>	-	+	-	+	+
171	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
172	+	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
173	+	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
174	+	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
175	+	-	Cocos isolados	+	NV	NV	NV	NV
176	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
177	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
178	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
179	+	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
180	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+
181	+ (ATCC)	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
182	+ (BOV)	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
183	+ (Bf)	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	
184	+ (CCh)	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	
185	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
186	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
187	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
188	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
189	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
190	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
191	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
192	+	+	Micrococcus	+	NV	NV	NV	NV
193	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

segue

conclusão								
Amostra	Culturas		Bactéria Isolada	Gram	Catalase	Coagulase (Tubo)	Manitol	V.P.
	Ágar Sangue	Chapman						
194	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
195	+	-	Micrococcus	NV	NV	NV	NV	NV
196	+	+	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	-	+
197	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
198	+	-	Micrococcus	+	NV	NV	NV	NV
199	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
200	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
201	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
202	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
203	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
204	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
205	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
206	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
207	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
208	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
209	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
210	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
211	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
212	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
213	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
214	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
215	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
216	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
217	β-hemólise	+	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+

Capítulo I

Os microrganismos encontrados neste trabalho corroboram com relatos de pesquisadores (CULLOR, 1992; GONÇALVES e KOZICKI, 1997) os quais relatam que os microrganismos mais freqüentemente encontrados são bactérias Gram-positivas, e dentre elas o *S. aureus*, encontrado na proporção de 34,61%. Outras bactérias como os *Streptococcus sp.* foram isoladas em pequenas quantidades, como relata (FONSECA, 1996), não representando maiores problemas para os casos clínicos analisados. A presença de leveduras na proporção de 6,0% entre os isolados foi um achado pouco usual. Os relatos de pesquisadores, poucos se referem a este microrganismo, (BUZZOLA et al., 2001; FERNANDES, 2006b). Acredita-se que nestes casos onde leveduras estão presentes, bactérias venham infectar o úbere com maior facilidade. O tratamento com antibióticos elimina estas últimas, permanecendo a infecção por leveduras, muito mais resistentes a estes fármacos. É possível que no futuro observe-se uma maior incidência deste tipo de agente em casos de mastite crônica. A baixa incidência de *Streptococcus sp.* encontrada, pode estar ligada a este fato, uma vez que estes não sobrevivem (FERNANDES, 2006a), facilmente no meio ambiente, e são mais susceptíveis à antibióticos. As quantidades encontradas de *Staphylococcus spp.* (17,0%) não identificados como *S. aureus*, por serem coagulase negativos (FERREIRO et al., 1981), mostram que os *Staphylococcus* estão presentes em mais da metade (51,61%) dos casos, levando a cronicidade da doença.

Capítulo I

4 CONCLUSÕES

O isolamento elucidou a ocorrência de diferentes agentes causadores de mastite nas distintas regiões do Estado do Paraná, sendo o *S. aureus* o mais freqüente. A metodologia preconizada por (KONEMAN et al., 2001), foi adequada para o isolamento e manutenção dos isolados de *S. aureus*.

CAPÍTULO II - ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE *Staphylococcus aureus*, ISOLADOS DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA CRÔNICA DE BOVINOS LEITEIROS.

Capítulo II

INTRODUÇÃO

Muitos métodos bioquímicos e moleculares (SILVA et al., 2000) têm sido usados nas investigações da bactéria *S. aureus* em infecções humanas e bovinas. Pesquisadores como HARTSTEIN et al. (1989); WILLIAMS et al. (1990); PREVOST et al. (1991); KOSTEMAN et al. (1992) e KAPUR et al. (1995), verificaram um considerável polimorfismo genético entre as linhagens de *S. aureus*, porém segundo FITZGERALD et al. (2000), poucos são os sorotipos relacionados à mastite bovina.

O objetivo do presente capítulo foi isolar e identificar *S. aureus* de leite de vacas portadoras de mastite clínica e subclínica crônica, apresentando um protocolo de baixo custo e de fácil utilização para extrair o DNA total das amostras isoladas de *S. aureus*, através do método do CTAB.

O uso de marcadores RAPD no estudo de microrganismos patogênicos tem possibilitado a classificação de linhagens de uma espécie, identificação de sorotipos patogênicos e de marcadores ligados a genes de interesse, além de estudos de genética de população e epidemiologia de doenças, (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

Sendo assim, fenótipos moleculares gerados por RAPD podem servir para diagnosticar em diferentes níveis taxonômicos. Considerando-se um determinado iniciador, os produtos de amplificação podem ser classificados em dois grupos, variáveis (polimórficos) e constantes (não polimórficos). Perfis de RAPD de representantes de vários gêneros podem conter bandas comuns a um outro gênero, enquanto outras bandas podem ser exclusivas. Se várias espécies pertencentes a esse gênero forem analisadas e uma das bandas exclusivas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador gênero-específico. Da mesma forma, quando se tem o perfil de RAPD de espécies de um mesmo gênero, algumas bandas poderão ser compartilhadas por algumas espécies, enquanto outras poderão ser exclusivas de uma dada espécie. Se vários indivíduos dessa espécie forem analisados e essa banda estiver presente em todos eles, pode-se concluir que é um marcador espécie-específica (FUNGARO e VIEIRA, 1998). Assim, os marcadores de RAPD podem ser utilizados para diagnóstico molecular.

Capítulo II

Fragmentos polimórficos detectados entre indivíduos de uma população também podem ser utilizados para se determinar identidade clonal, (marcadores clone-específico).

Marcadores moleculares têm esclarecido a variabilidade genética existente entre isolados de *S. aureus* provenientes do úbere bovino e de outras fontes. Dentre eles, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) usado por SILVA et al. (2000); HERMANS et al. (2001), os quais identificaram bandas típicas em determinadas linhagens de *S. aureus*, com alta virulência. Há uma forte associação entre as bandas geradas por RAPD, com os resultados obtidos por meio de outros métodos (FITZGERALD et al., 2000). O estudo destes dados envolve análise de distância (MEYER, 1993), a existência de similaridade entre os sorotipos (ROHLF, 2000), e outras análises de confiabilidade (FELSENSTEIN, 1985; SITNIKOVA et al., 1995; SANDERSON e WOJCIECHOWSKI, 2000). Neste contexto, foram utilizados marcadores RAPD (MYLLYS et al., 1997; PEREIRA et al., 2002; SPOLIDORIO et al., 2003) e analisada a distância gênica entre os grupamentos com grande confiabilidade, visando identificar o polimorfismo genético de isolados de *S. aureus*, provenientes de mastite bovina.

Capítulo II

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Um total de 217 amostras de *S. aureus*, provenientes de 12 populações de bovinos leiteiros distribuídas geograficamente, foram caracterizadas por meios de testes morfológicos e bioquímicos. Inoculadas em Ágar sangue (KONEMAN et al., 2001), verificou-se o grau de hemólise, e a coloração de Gram. Amostras de *S. aureus* β -hemolíticas foram repicadas em Ágar Chapman e transferidas para meios líquidos: manitol, caldo simples e Clark Lubs, realizando-se as provas de coagulase em tubo, e Voges-Proskauer (VP). As amostras coagulase positivas, manitol e V.P. positivas, foram mantidas a 4-8 ° C, em Ágar manitol-NaCl inclinado (n=75).

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Os isolados de *S. aureus*, foram repicados em caldo BHI (infusão de cérebro-coração) e incubados a 37° C durante 45 h, obtendo-se uma cultura com 10⁸ células.

As paredes destas foram lisadas com CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), o qual extrai o DNA total em quantidades aceitáveis e em concentrações menores do que 10⁸. As células foram lavadas com tampão TRIS-EDTA (TE) e centrifugadas. Os “*pellets*” foram ressuspensos com 600 μ L de CTAB, mais 40 μ L de mistura de clorofórmio com álcool isoamílico – CIA (49:1) e incubados em banho-maria a 65°C por 30 min. Transcorrido esse tempo, foram adicionados 800 μ L de CIA, agitados gentilmente por cinco vezes, e centrifugados a 12.000 g por 5 min. A seguir, foram tomados 450 μ L do sobrenadante, aquoso, e transferidos a um outro tubo, adicionados parte igual de CIA, misturado da mesma forma anterior, voltando a centrifugar, por mais 5 min. Após, foram tomados 300 μ L do sobrenadante, transferidos para outro tubo, adicionando 2,5 partes de etanol a 96% gelado, deixado “*over night*” a –20°C. Transcorrido este período foi repetida a operação com etanol 70%, centrifugado a 12.000 g por 20 min, eliminando o sobrenadante, e deixando os tubos para secagem por 10 min, em fluxo laminar. Após secos,

Capítulo II

os “*pellets*” foram ressuspensos com TE e armazenados a temperatura de -20°C . Em substituição ao CTAB, foram testados outros compostos utilizando de protocolos semelhantes ao CTAB: O Sódio Duodecil Sulfato (SDS) (DELLAPORTA et al., 1983; SAMBROOK et al., 2002), foi usado na concentração de 1%, exceto que as células foram incubadas a 60°C por 20 min.

DNAzol (*Life Technologies*) e EZ-DNA (*Biosistem*), reagentes não orgânicos, usados na quantidade de 1,0 mL por amostra, tratando-se de versão modificada do método de Chomczynski, feita por Cox. É composto de guanidina-detergente, que possui a vantagem em hidrolisar o RNA e permitir a precipitação do DNA, com etanol. Atuam entre 10^7 e 10^8 células, permitindo rápida extração.

Nonidet (Agepol) do Sigma, um detergente de alta viscosidade que hidrolisa o RNA e permite extração, na presença de calor e a precipitação do DNA com etanol e também isopropanol. Atua em concentração igual a outros detergentes de guanidina, sendo usado na proporção de 0,5 mL/amostra.

O outro protocolo testado foi o Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), destinado ao isolamento do DNA de fungos. Servem para PCR, análise por RAPD, AFLP, RFLP, microsátélites, Blotting e Real-Time PCR.

Seu protocolo com material específico, é protegido comercialmente: i) colunas para spin; ii) frascos *QIAshredder*; iii) tubos para armazenagem do material; iv) Tampão AP1; v) Tampão AP 2; vi) Tampão AP3 (concentrado); vii) Tampão AW (concentrado); viii) Tampão AE; ix) RNase A (100 mg/mL). Foram adicionados 400 μL do Tampão AP1, mais 4 μL da solução de RNase. Os frascos foram incubados a 65°C por 10 min para lisar as células. Em seguida foram adicionados 130 μL do Tampão AP2 ao lisado, centrifugado por 5 min.

Foram incubadas a 65°C por 10 min para lisar as células e em seguida adicionados mais 130 μL do Tampão AP2 ao lisado, centrifugado por 5 min. O lisado foi transferido ao *QIAshredder* e centrifugado por 2 min, e transferido o sobrenadante a outro tubo. Foram adicionados 1,5 volumes do Tampão AP 3, centrifugado e novamente acrescentado 650 μL do Tampão AP 3 e, após, repetido o passo anterior. Adicionou-se 500 μL do Tampão AW, com nova centrifugação. Transferido para outro tubo, adicionou-se 100 μL do Tampão AE,

Capítulo II

voltando a centrifugar. Repetiu-se o passo anterior, para obter a amostra de DNA. As centrifugações foram sempre a 12.000 g, por 5 minutos.

2.3 RAPD

Para a realização das reações de *RAPD* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: OPJ 5 (5'CTCCATGGGG 3'), OPJ 6 (5' TCGTTCCGCA 3'), 786 (5' GCGATCCCCA 3'), 797 (5' AGCGTCACTG 3'), 798 (5' TGACCCGCC 3'), e o OPA 2 (5' TGCCGAGCTG 3' recomendado por MYLLYS et al. (1997), PEREIRA et al. (2002) e SPOLIDORIO et al. (2003) respectivamente. As reações foram preparadas com um volume de 14,9 µL, contendo: 20ng de DNA purificado e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase, 3 mM l⁻¹ MgCl₂, 50 mM l⁻¹ KCl, 10 mM l⁻¹ Tris-Cl (pH 8,8), 200 µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 mM de iniciador, foram realizadas segundo PEREIRA et al. (2002) e submetidas a 45 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 36°C e 1 min 30 s a 72°C, com 3 min de desnaturação inicial a 94°C e 5 min de extensão final a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, 1,6%, em tampão TRIS - Borato-EDTA, à voltagem de 114 mV.

O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por marcador molecular de 100 pb e incluiu-se em todas as amplificações, controle negativo de duas linhagens referência e um grupo externo (BITTENCOURT, 2000).

A análise do polimorfismo realizada por *RAPD* foi verificada fenéticamente com o método de “Agrupamento” (*UPGMA - Unweighted pair group method with arithmetic mean*) (MEYER, 1993), utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do programa *NTSYS*, versão 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 2000). A consistência dos agrupamentos foi verificada por *bootstrap* (FELSENSTEIN 1986 e 1993), obtido com 10.000 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Apenas os agrupamentos que apresentaram valores de *bootstrap* maior ou igual a 70% foram considerados consistentes.

Para testar a significância dos grupos formados no método de “Agrupamento” foi realizada a AMOVA.

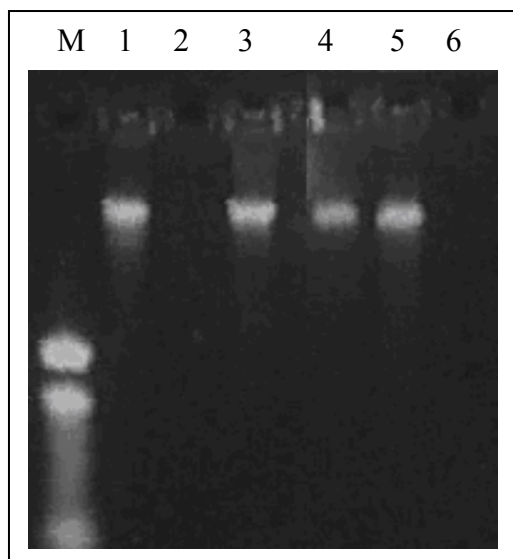
Capítulo II

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram extraídas 77 amostras de DNA de *S. aureus*, sendo 75 provenientes de isoladas de casos de mastite e duas linhagens referência. Os resultados obtidos revelaram ser o método de extração CTAB, bastante eficaz para obtenção de DNA genômico de *S. aureus*, conforme a (Figura 1). Submetidas à espectrofotometria, as amostras apresentaram índice de 1,80, estimando-se em 150 µg de DNA quando extraídas pelo CTAB.

FIGURA 1 - GEL DE AGAROSE NA CONCENTRAÇÃO DE 0,8%, CORADO POR BROMETO DE ETÍDIO MOSTRANDO A QUALIDADE DO DNA TOTAL ISOLADOS DE *S. aureus*, OBTIDO A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DE TAMPÃO DE EXTRAÇÃO CTAB

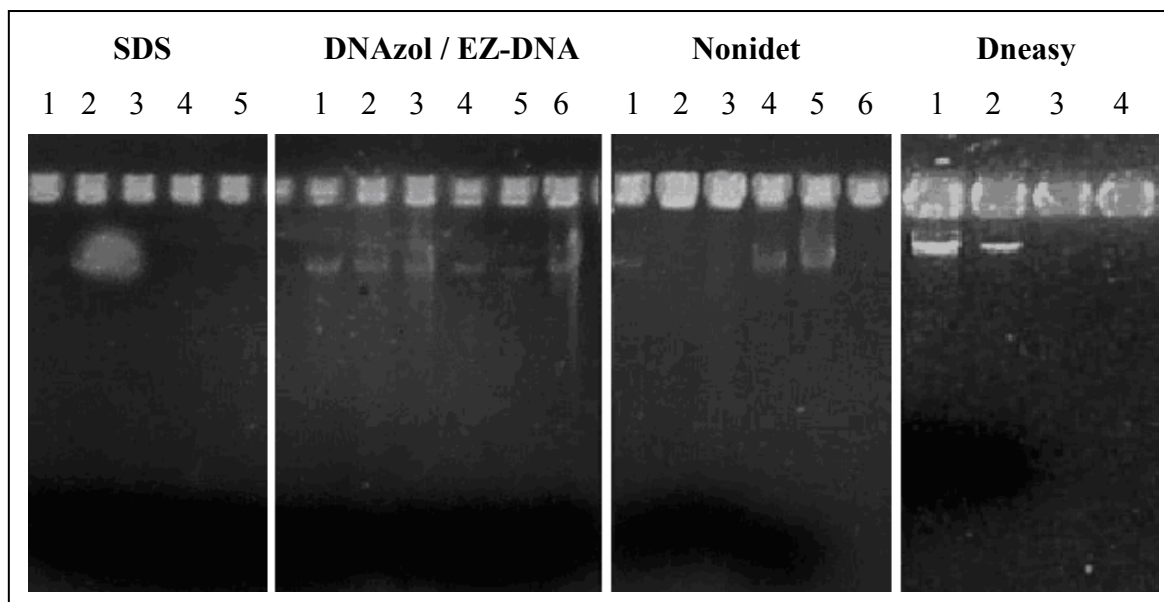


Legenda: M = marcador de peso molecular com 100 pb;
1, 3, 4, 5 = DNA extraído pelo método do CTAB (n=4). 2 e 6 vazios.

Quando comparado com outros métodos utilizados, tais como o método da *Qiagen* (*Dneasy*) (Figura 2) o tampão CTAB apresentou-se como uma alternativa de menor custo e alta eficácia na extração do DNA total de *S. aureus*. Ainda faz-se importante acrescentar que os protocolos utilizados para extração de DNA genômico de células vegetais podem ser eficientes para extrair DNA de cocos Gram-positivos.

Capítulo II

FIGURA 2 - PADRÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE, CORADOS EM BROMETO DE ETÍDIO, COMPARANDO RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DOS PROTOCOLOS



Legenda: SDS (2); DNazol (1, 2 e 3); EZ – DNA (4, 5 e 6); Nonidet (1, 4 e 5) e DNeasy (1 e 2). As demais são linhas vazias

O processo de extração envolveu etapas distintas: lise dos cocos, eliminação de proteínas e polissacarídeos e outros compostos indesejáveis, precipitação do material genético e sua conservação. Destas etapas foi à lise da parede celular a mais complexa, para o que há uma variedade de protocolos. Nas demais etapas, são usados o isopropanol, clorofórmio, álcool isoamílico e etanol. O presente trabalho usou o tampão CTAB, segundo DOYLE e DOYLE (1987). Apenas o método *QIAGEN (Dneasy)* teve protocolo próprio. O caldo BHI, permitiu grande desenvolvimento das bactérias, propiciando 10^8 células em 6,0 mililitros de cultura. As lavagens com TE asseguraram a existência de material genético de *S. aureus* (VIEIRA - DA – MOTA et al., 2001). A concentração usada para as culturas, assim como o tempo de cultivo, permitiu extrair boas quantidades de DNA, fato este explicável pela existência de parede celular comprometida e mais frágil, ao preservar vias bioquímicas vitais à sua sobrevivência (KONEMAN et al., 2001). O método do CTAB foi que se apresentou melhor. Nesse âmbito o método do SDS (DELLAPORTA

Capítulo II

et al., 1983; SAMBROOK et al., 2002) foi ineficaz, prestando-se para lise de paredes celulares de bactérias Gram-negativas (Figura 2).

As tentativas com o nitrogênio líquido (ROMANO, 1998), foram trabalhosas e demoradas, extraíndo quantidades de DNA muito pequenas. Extrações com Guanidina-detergente, princípios dos métodos do DNazol e EZ-DNA, (Figura 2) (PITCHER et al., 1989; PEREIRA et al., 2002), extraíram amostras de DNA muito pequenas e degradadas. O uso de Nonidet, um espalhante adesivo, na proporção de 40 microlitros, revelou-se ineficaz, (Figura 2). É possível que com o aumento dessa proporção, na presença de calor, surjam resultados mais satisfatórios.

O método *QIAGEN (Dneasy)*, mostrou-se eficaz, como se vê na (Figura 2), onde as amostras estão bem demarcadas e o DNA é de grande qualidade, porém com custo muito elevado. Finalizando, o método preconizado por este trabalho e por (DELLAPORTA et al., 1983; DOYLE e DOYLE, 1987; SUMER et al., 2003; DANESHWAR e SHER-ULLAH, 2004), extraiu DNA genômico de boa qualidade, podendo contribuir com o estudo de doenças que envolvam cocos Gram-positivos (HERMANS et al., 2001; MARSOU et al., 2001).

Vários métodos para o isolamento de DNA de células procarióticas têm sido descritos (BEIJI et al., 1986; OWEN e BORMAN, 1987; YACOOB e ZEALEY, 1988, PITCHER et al., 1989). Esses métodos demonstram serem mais eficientes para extrair DNA de bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, por possuir menor quantidade de peptídeoglicanos na parede celular que as Gram-positivas, de parede mais espessa e mais difícil de ser rompida. A extração de DNA cromossomal de bactérias Gram-positivas, provenientes do úbere bovino, foi estudada por BUZZOLA et al. (2001), COUTO et al. (2001). Lisozima e estafilolisina têm sido eficiente na extração de DNA cromossomal de cocos Gram-positivos, MYLLYS et al. (1997); PEREIRA et al. (2002), obtendo amostras de boa qualidade.

Pesquisas realizadas por DELLAPORTA et al. (1983), com SDS e CTAB, e de DOYLE e DOYLE (1987), com CTAB, fundamentaram na utilização do detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

Capítulo II

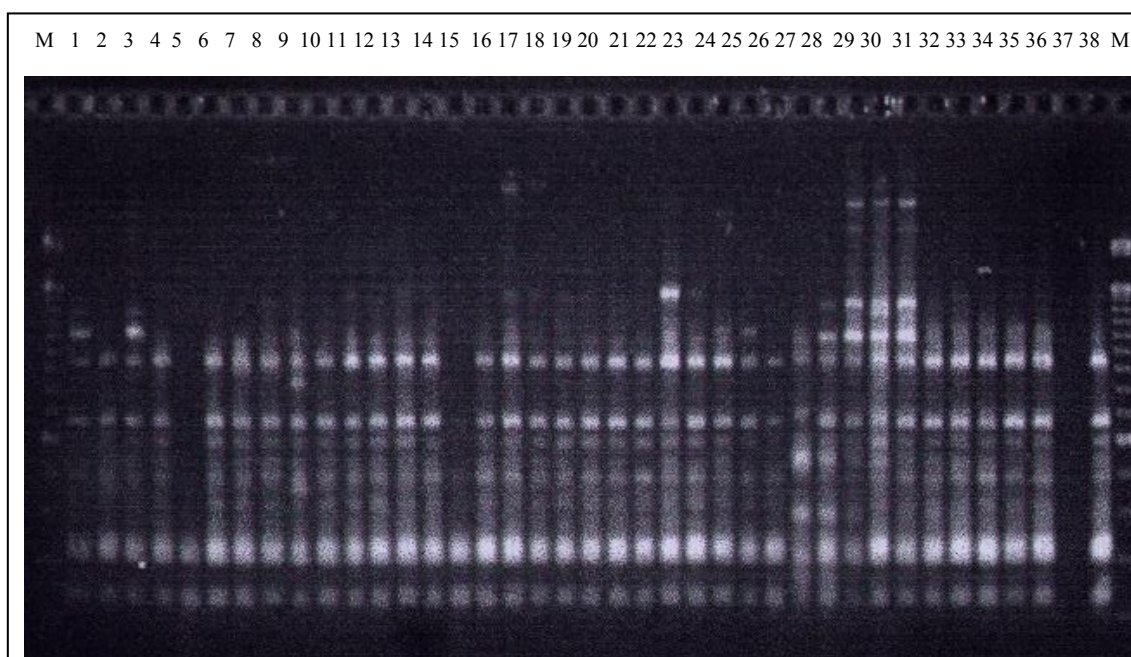
A diversidade de protocolos existentes para extração de DNA, reflete a variabilidade da composição bioquímica encontrada em diferentes células e microrganismos.

Estes diferentes protocolos, procuram solucionar problemas decorrentes de DNAses endógenas, isolamento de polissacarídeos inibidores de enzimas, os quais conferem ao DNA extraído um aspecto gelatinoso e viscoso, ou ainda eliminar substâncias fenólicas decorrentes da oxidação dos compostos quinônicos ou de outras substâncias que possam danificar o material genético, ou até mesmo inibir a ação da *Taq* polimerase.

3.2 RAPD

A partir dos seis oligonucleotídeos iniciadores utilizados obteve-se 108 bandas em todas as amostras, determinadas visualmente. Considerando a procedência dos isolados, verificou-se que duas bandas monomórficas encontradas, correspondiam a amostras de casos clínicos e subclínicos da doença.

FIGURA 3 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DE *S. aureus*, CAUSADORES DE MASTITE BOVINA, POR MEIO DE RAPD

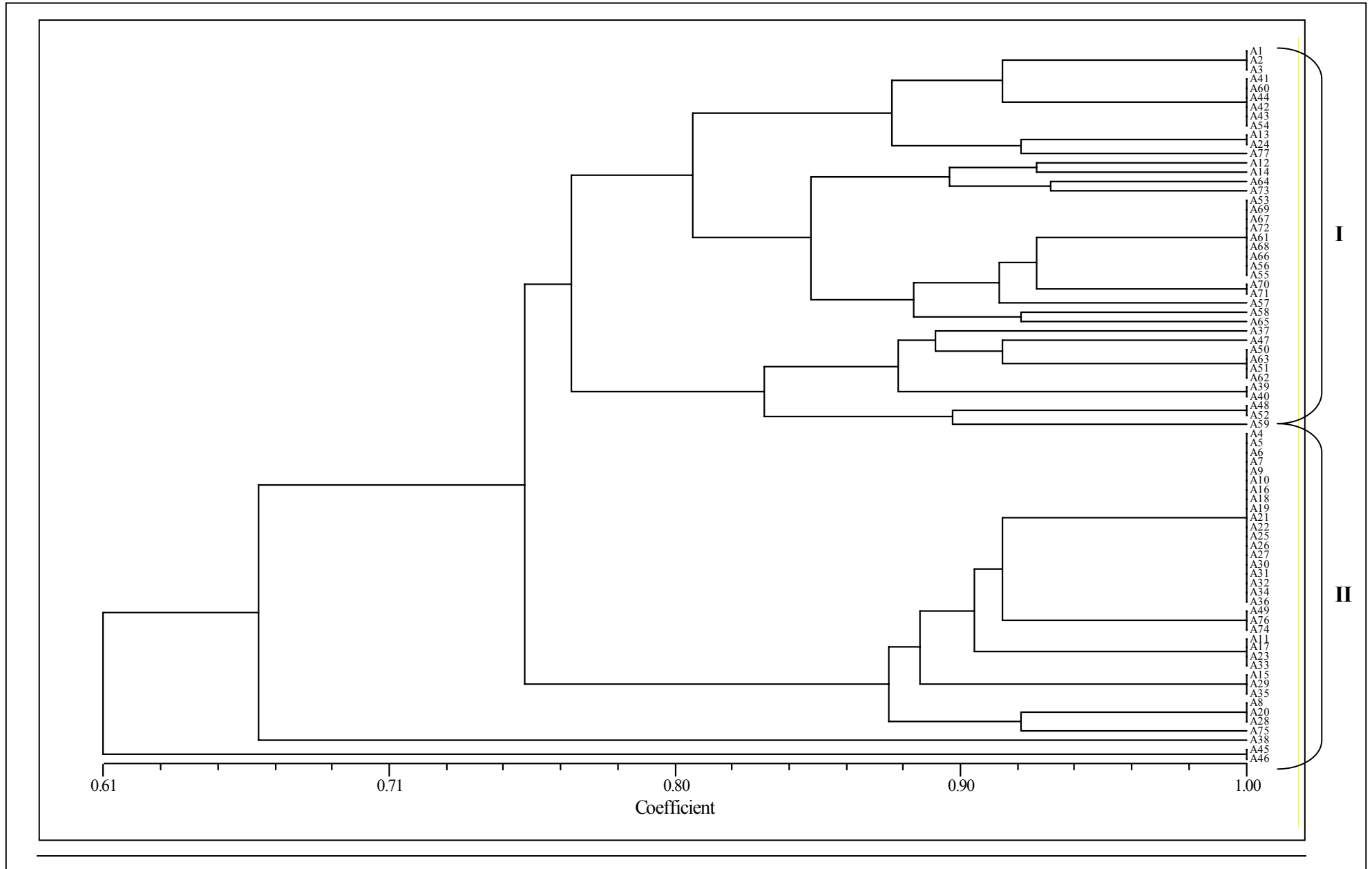


Legenda: M = marcador de peso molecular (100 pb); 1, 2, 3, 13, 14, 24 e 37 correspondem a isolados de casos subclínicos, enquanto que os demais são de casos clínicos

Capítulo II

A árvore obtida por *UPGMA* (Figura 4), mostrou dois grupos, (**I**-clínico e **II**-subclínico) por apresentarem baixa similaridade em relação aos demais, além do utilizado como grupo externo.

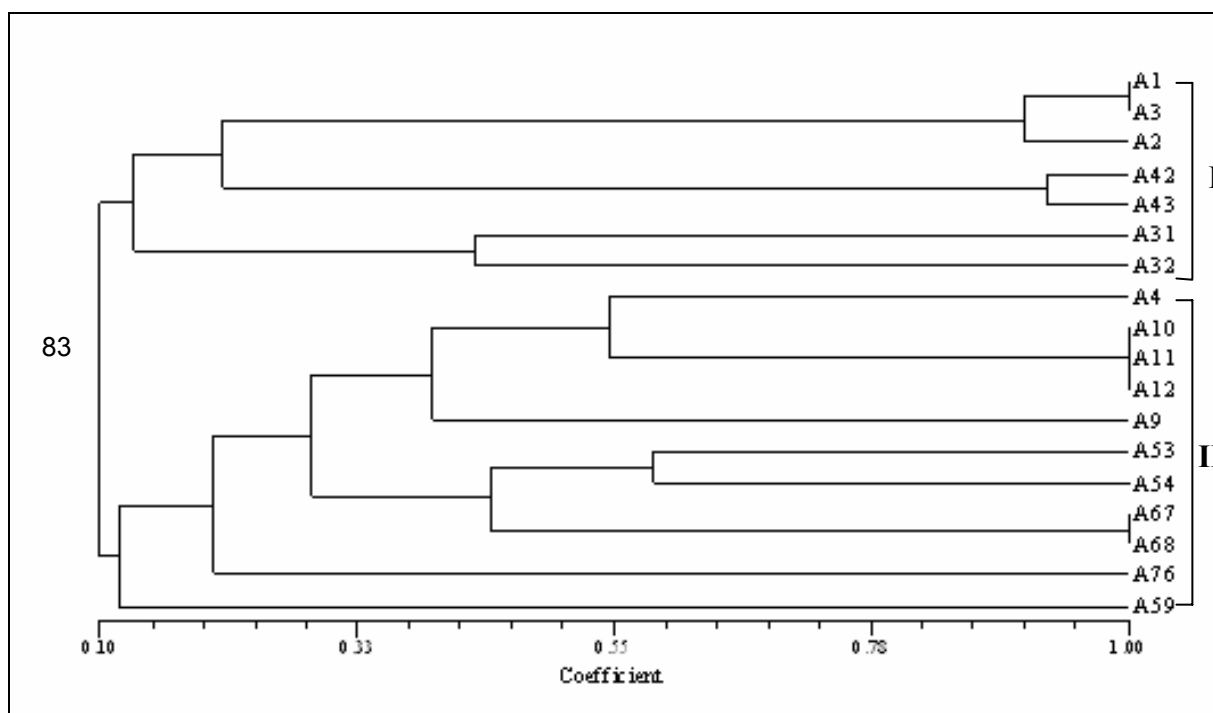
FIGURA 4 - ÁRVORE DE DOIS GRUPOS DE *S. aureus*, DISSEMINADOS EM 12 POPULAÇÕES DE BOVINOS LEITEIROS, RESSALTANDO A ALTA SIMILARIDADE ENTRE ALGUNS DELES, PORÉM COM *BOOTSTRAP* MUITO BAIXOS (N = 78)



Capítulo II

No entanto, a maioria dos agrupamentos teve um baixo valor de *bootstrap* sugerindo que, provavelmente, existissem isolados feneticamente intermediários aos grupos. Para contornar este fato, e baseado em relatos de HILLIS e BULL, (1993) e SITNIKOVA et al. (1995), tomaram-se os dados das amostras com melhor *bootstrap*, e realizou-se novos *RAPD*, utilizando os iniciadores OPJ 6 e OPA 02, construindo uma nova árvore baseada igualmente no algoritmo *UPGMA* e no coeficiente de Jaccard. Os valores de *bootstrap* foram mais consistentes, e mais bem sustentados pela AMOVA, e podem ser visualizados na (Figura 5).

FIGURA 5 - FORMAÇÃO DE DOIS GRUPOS DE *S. aureus*, DISTRIBUÍDOS EM 12 POPULAÇÕES DE BOVINOS LEITEIROS, RESSALTANDO A BAIXA SIMILARIDADE ENTRE OS GRUPOS, PORÉM COM NÍVEIS DE CONFIANÇA BASTANTE ALTOS E COM SIGNIFICÂNCIA DE $p < 0,001$ ($n = 18$)

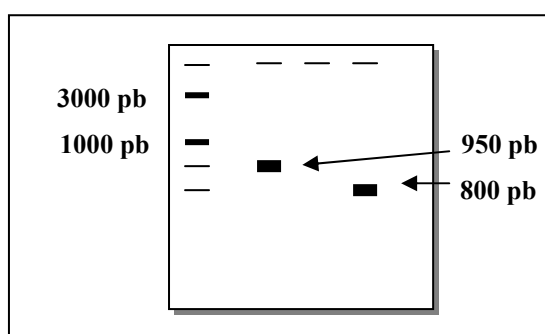


De acordo com a figura 5 verificou-se a presença dos grupos identificados a partir da análise apresentada (Figura 4). O agrupamento I reuniu os isolados 1, 2, 3, 31, 32, 42 e 43, enquanto que o II agrupou os isolados 4, 9, 10, 11, 12, 53, 54, 59, 67, 68 e 76. A partir destes perfis de *RAPD*, verificaram-se duas bandas monomórficas caracterizando cada grupo

Capítulo II

grupo expresso (Figura 5), as quais foram excisadas e visualizadas em gel de agarose 1,6%, como se observa na Figura 6.

FIGURA 6 - POSICIONAMENTO DAS BANDAS MONOMÓRFICAS VERIFICADAS E EXCISADAS DO GEL DE AGAROSE, PARA CADA UM DOS GRUPOS DE *S. aureus*



A técnica de *RAPD* foi usada para investigar o polimorfismo genético de isolados de *S. aureus*, proveniente de mastite bovina. A análise com marcadores *RAPD* utilizando o algoritmo *UPGMA* (SNEAT e SOKAL, 1973; NEI et al., 1995; POLLOCK e GOLDENSTEIN, 1995), a análise *bootstrap* e teste de significância AMOVA (FELSENSTEIN, 1986 e 1993), sugeriram a existência de dois grupos formados, com variância de ($p < 0,001$). Os grupos estavam fortemente associados aos quadros subclínicos e clínicos, e a idade do animal.

Verificaram-se nessa análise, associações entre isolados originários da mesma população e subgrupos com alta similaridade (Figura 4). As análises de isolados com maior confiança, sustentou essa associação, visto que os subgrupos com altos valores de confiabilidade (*bootstrap*) (Figura 5), agruparam indivíduos originários dos mesmos rebanhos, apesar de não formarem grupos distintos, em congruência com o *UPGMA* (SANDERSON e WOJCIECHOWSKI, 2000).

Tais resultados (Figura 5) concordam com a literatura (HARTSTEIN et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990; PREVOST et al., 1991; KOSTEMAN et al., 1992; KAPUR et al., 1995, PEREIRA e SIQUEIRA-JR, 1995; VIEIRA DA MOTA et al., 2001 e PEREIRA et al., 2002), a qual sugere que micro-habitats podem agir como fonte de infecção para

Capítulo II

animais de populações locais (FERNANDES, 2006a, b), e que existe uma relação regional entre os diversos isolados relacionados geneticamente.

BRASILEIRO E CARNEIRO, (1998), utilizaram inferências realizadas a partir de marcadores para traçar a origem de infecções estafilocócicas do úbere bovino.

Capítulo II

4 CONCLUSÕES

A variabilidade genética encontrada entre os isolados, sugere uma associação entre genótipo, rebanhos, e manifestação clínica da doença. Estudos futuros potenciais poderiam ser realizados no sentido de comparar essa variabilidade à resistência das linhagens aos antimicrobianos. Por meio dos marcadores RAPD foi possível separar dois grupos genéticos distintos relacionados com diferentes quadros clínicos da doença e desta forma identificar um segmento genômico viável para a elaboração de um “primer” diagnóstico.

CAPÍTULO III - PRODUÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* CAUSADORES DE MASTITES BOVINA, CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS.

Capítulo III

INTRODUÇÃO

Vários métodos de biologia molecular têm sido usados para investigar o *S. aureus* em infecções humanas e de bovinos, (HARTSTEIN et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990; PREVOST et al., 1991; KOSTEMAN et al., 1992 e KAPUR et al., 1995).

Ao colonizar o parênquima secretor, o *S. aureus*, com o passar do tempo vai difundindo e incistando-se, fato que o torna pouco vulnerável à ação de antimicrobianos. Sendo assim, o diagnóstico precoce no úbere de matrizes jovens, significa diminuição do número de futuros descartes de vacas produtivas e perdas na produção de leite.

A identificação desse agente causador de mastite subclínica crônica diretamente do leite de tanque, facilitaria o seu controle em fazendas leiteiras, e na sua seqüência o diagnóstico dos animais portadores. Por outro lado, a identificação de clones de *S. aureus*, possibilita elaborar marcadores moleculares específicos, visando o diagnóstico para uma diversidade de doenças. RAMESH et al. (2002), usando a técnica de PCR, aplicou PCR multiplex, permitindo além do diagnóstico da doença diretamente em matrizes leiteiras, sua identificação em produtos lácteos. Dentro deste contexto, neste trabalho foi utilizada uma seqüência de métodos, como RAPD, clonagem, PCR, seqüenciamento e análise estatística visando identificar o polimorfismo genético, de linhagens responsáveis por diferentes formas da doença em regiões do Estado do Paraná e estabelecer relações entre sorotipos e manifestação clínica ou subclínica da doença.

A identificação de dois subclones, relacionados com diferentes formas de mastite (clínica e subclínica), permitiu obter marcadores específicos, um para cada população bacteriana. Sendo o principal objetivo o desenvolvimento de um método diagnóstico de acordo com os anteriormente relatados (VANNUFFEL et al., 1995 e PINEKTER et al., 2001) contribuindo assim, com futuros estudos sobre esta doença, assim como com a redução de seus prejuízos.

Capítulo III

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO

Para produção de marcadores genéticos visando à identificação dos *Staphylococcus aureus* causadores de mastites bovinas, clínicas e subclínicas foram extraídas bandas previamente selecionadas a partir do estudo da variabilidade genética por meio de marcadores *RAPD* (capítulo II). As bandas polimórficas e monomórficas, correspondentes aos grupos genéticos correlacionados com casos clínicos e subclínicos da doença, foram excisadas do gel de agarose e purificadas por meio do *PurelinkTM Quick Gel Extraction Kit* (*InvitrogenTM Life Technologies*).

2.2 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS

Para a clonagem dos fragmentos foi utilizado os *pGEM[®]* e *pGEM[®]-T Easy Vector Systems* (*Promega Corporation*), e clonados na bactéria *Escherichia coli* TF 10 (SOARES et al., 2001). A visualização dos possíveis pontos de inserção dos fragmentos, foi por restrição com a enzima *EcoRI* (*InvitrogenTM Life Technologies*), e eletroforese em gel de agarose 1,0%.

2.3 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CLONADA

Verificada a inserção dos fragmentos do DNA de *S. aureus*, realizaram-se as reações de amplificação, as quais foram preparadas com o *Kit DYEnamicTM ET dye terminator MegaBACETM* (*Amersham Biosciences*). Os iniciadores usados nas reações foram sintetizados e purificados por (*InvitrogenTM Life Technologies*), em conformidade com MURPHY et al. (2005), CHARBONIER et al. (2005): *pUC/M 13 Forward Sequencing Primer*: 5' CGTTGTAAAACGACGGCAAGT 3' e *pUC/M13 Reverse Sequencing Primer*: 5' TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'. As reações consistiram de 3,0 μL de *mix ET dye terminator*; iniciadores em igual concentração de 5-500 mol l^{-1} ; dNTPS na concentração final de 125 mol l^{-1} ; 50-500 mg l^{-1} de DNA, num volume final de 7,5 μL . As reações amplificaram a 95° C por 2 min, e por 35 ciclos a 95° C por 20 s e em 60° C por

Capítulo III

60° C por 2 min. O produto do PCR foi purificado por acetato de amônia 7,5 mol l⁻¹ e precipitado por etanol em sucessivas centrifugações (MURPHY et al., 2005). Após liofilização em *SpeedVac* a 60° C por 40 min, as amostras foram seqüenciadas por eletroforese em ABI 377 (*Applied Biosystems*). A edição das seqüências nos dois sentidos (HALL, 2001) por meio do Staden Package (STADEN et al., 1998). A seqüência original dos iniciadores e suas posições nos plasmídios foram observadas.

2.4 DESENHO DOS MARCADORES

Os conjuntos de iniciadores para identificação por meio de PCR, para ambas as linhagens foram analisados com o programa *PerlPrimer* (MARSHALL, 2004). Cada conjunto de iniciadores foi idealizado considerando seu comprimento, conteúdo de GC, formação de grampos, auto-anelamento e temperatura de anelamento. Para prevenir ausência pareamento o iniciador foi desenhado com aproximadamente 24 bases.

2.5 PCR-MULTIPLEX

A avaliação dos marcadores e a montagem de uma PCR-multiplex (VANNUFFEL et al., 1995 e PINEKTER et al., 2001) foi realizada de acordo com a T_m de anelamento de cada iniciador, com um volume final de 25,0 µL. As reações foram compostas de 2,5 µL de PCR Tampão *minus*; concentração final Mg, 1X; 1,0 µL, concentração de dNTP's de 0,2 mM; concentração do *mix* de iniciadores de 0,5 µM, 4.0µL; 0,5 µL, *Taq* 2,5 un.; 0,5 µL, de DNA genômico na concentração de 50 ng e 17,5 µL água milli Q. As amplificações foram em 94°C for 45 s para desnaturação e 60°C para o anelamento e extensão, durante 2 min num total de 35 ciclos. Os produtos da PCR-multiplex foram examinados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio.

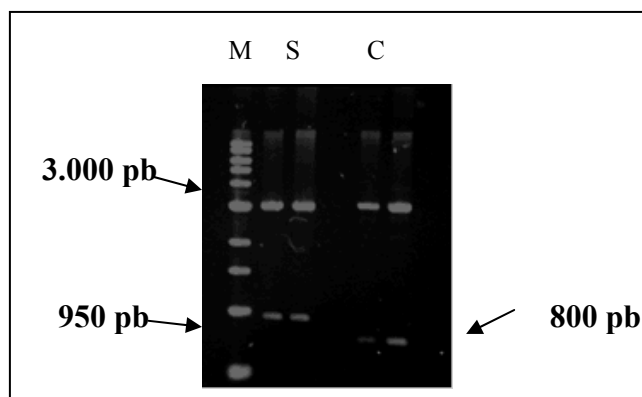
Capítulo III

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DE DNA CLONADOS

O isolamento dos fragmentos de DNA através do *Purelink™ Quick Gel Extration* (*Invitrogen™ Life Technologies*) recuperou 80% dos fragmentos de DNA, livres de outras substâncias. Estes fragmentos foram inseridos e clonados em *Escherichia coli* TF 10 (SOARES et al., 2001), como recomenda a *pGEM® and pGEM®-T Easy Vector Systems* (*Promega Corporation*), com ótimos resultados, mas com baixo número de colônias com o inserto, devido ao comprimento dos fragmentos. Ambos os grupos mostraram bandas monomórficas comparadas ao marcador de 1 kpb (Figura 1).

FIGURA 1 - AGAROSE GEL 1%, MOSTRANDO O MARCADOR DE 1 Kbp E AMOSTRAS SUBCLÍNICA (S) E CLÍNICA (C). OS PLASMÍDIOS *pGEM®-T Easy Vector*, FORAM PREVIAMENTE RESTRINGIDOS COM ENZIMA *EcoR I*.



Estes fragmentos com 800 a 950 pb e o uso do *pGEM® - T Easy Vector*, permitiram estudar estas diferenças. Os componentes adicionados às reações amplificaram efetivamente os plasmídios com inserto dos fragmentos de DNA de *S. aureus*. Os iniciadores ligaram-se nos *sites* do plasmídio *pGEM®-T Easy Vector* de acordo com o fabricante (APÊNDICE A).

O mapa do vetor e pontos de referência foi também observado (*T7 RNA polymerase transcription initiation site*, *SP6 RNA polymerase promoter*: 139-158 *SP6 RNA polymerase transcription initiation site*: 141 *puc/M13 Reverse Sequencing Primer binding site*: 176-197 e *pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site*: 2949-2972). As reações de SOARES et al. (2001), obtiveram duas seqüências com 731 pb para a amostra subclínica e 739 pb para amostra clínica (ANEXO III). A partir destas seqüências foram desenhados iniciadores para as amostras subclínicas e clínicas, baseados no programa *PerlPrimer* (MARSHALL, 2004) de acordo com o item 2.4 da metodologia. As seqüências dos iniciadores para as amostras subclínicas, foram editadas com 686 bases (16-702): *Forward*: 5' CCAAACCTGGTAATTGAAGGAC 3' (Tm: 59,78°C) e *Reverse*: 5' ACAATGTTGAAACTCAGACGTC 3' (Tm: 61,41°C), ambos com 22 bases. Para as amostras clínicas com 393 bases editadas (36-429): *Forward*: 5' TTGATCTGGATACGATGGAAAGG 3' (24 bases e Tm: 62,48°C) e *Reverse*: 5' TTAAGTATAAGCTTCACGCCGAG 3' (23 bases e Tm: 62,72 °C).

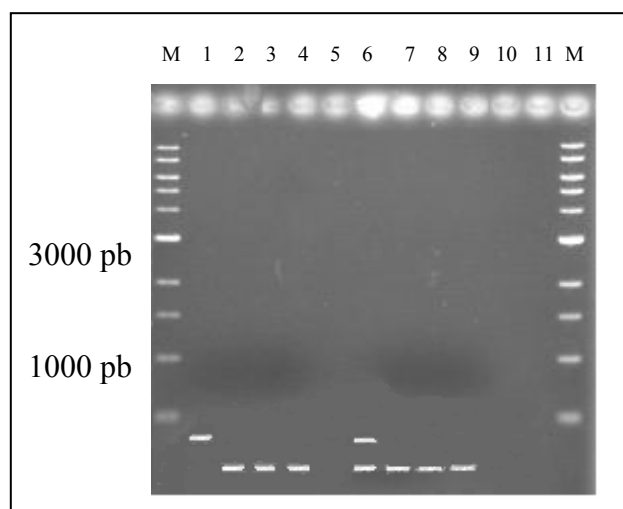
3.2 REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E PCR MULTIPLEX

Os iniciadores foram sintetizados por *InvitrogenTM*, objetivando uma PCR-Multiplex (VANNUFFEL et al., 1995; PINEKTER et al., 2001). A PCR-Multiplex foi composta de DNA genômico das amostras subclínicas e clínicas, amostras procedentes de dois novos casos clínicos de mastite, amostras subclínicas e clínicas coletadas de tanque de resfriamento do leite (KIM et al., 2001); linhagens referência (ATCC 25923 e ATCC 6538); grupo externo (*S. mutans*) e *E. coli*. Os resultados visualizados em gel de agarose (Figura 2), mostraram amplificação das amostras do DNA genômico de *S. aureus* (amostras do trabalho, novos casos, linhagens referência e amostras de tanque de leite). O DNA genômico do grupo externo e de *E. coli* não amplificaram, mostrando eficiência das reações para todas as amostras de DNA testadas. Na linha 6, as bandas sugeriram a presença dos dois grupos de *S. aureus* (KIM et al., 2001). A existência de casos subclínicos e clínicos mostrou por outro lado, que alguns isolados são mais virulentos que outros (CHEN et al., 2003; CORT et al., 2005 e DESZO et al., 2004 e 2005).

Capítulo III

Estes grupos eram semelhantes morfológicamente e por dados bioquímicos, mas diferentes na composição de seus nucleotídeos.

FIGURA 2 - PCR-MULTIPLIX EM GEL DE AGAROSE ONDE SE VÊ AMPLIFICAÇÕES DO DNA GENOMICO DE *S. aureus*. Linhas: 1=clínica; 2=clínica; 3 e 4=amostras de novos casos clínicos; 5=vazia; 6 subclínica e clínica em tanque de leite; 7= clínica em tanque de leite; 8=ATCC 25923; 9=ATCC 6538; 10=*S. mutans*; 11=*E. coli*



Capítulo III

4 CONCLUSÕES

As seqüências delineadas permitem o diagnóstico de mastite subclínica, numa fase da vida da vaca quando o *S. aureus* não está ainda “incistado”, e por isso, mais vulnerável à antibioticoterapia, favorecendo a cura.

O PCR-multiplex idealizado neste trabalho permitirá realizar este diagnóstico de mastite clínica e subclínica, pois se revelou eficaz para acusar a presença da amostra subclínica no leite e em outras secreções do úbere, assim como em nível de tanque de leite.

Adicionalmente, os dados clínicos dos animais, revelaram estreita relação com a idade da vaca, e o número de partições. A razão destes fatos merece estudos futuros.

AGRADECIMENTOS

Os autores da pesquisa agradecem ao Dr. Humberto França Madeira (PUCPR), Dr. Emanuel M. Souza e Sr. Valter Baura (Dep. Bioquímica-UFPR), por sua assistência técnica. Agradecem a PUCPR e UFPR, pelo suporte financeiro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As etiologias da mastite podem ser as mais variadas envolvendo fatores nutricionais, anatômicos e outros, todos eles ligados ao ambiente. Mas, indiscutivelmente, o fator predisponente principal está relacionado às deficiências do manejo em geral, e mais intimamente ligado ao sistema de ordenha e a quem o opera.

Diante deste quadro, a realização periódica de exames laboratoriais do leite poderá fornecer dados valiosos e, se bem aplicados, podem, com medidas simples de correção de manejo, evitar as recidivas. Aliado a isso, os resultados de antibiograma, mesmo sendo conhecidos quando o tratamento já foi realizado, fornece todos os subsídios para a decisão sobre que produto continuar usando ou que deva ser descartado na propriedade.

O uso criterioso de antibiótico intramamário de largo poder bactericida, com excepcional desempenho em testes de sensibilidade bacteriana e alta eficácia em mastites clínicas e ambientais, associado à prevenção de novas infecções durante o período seco, mais as correções de manejo que o isolamento bacteriano venha a sugerir, podem reduzir sensivelmente os prejuízos causados pelas constantes recidivas de mastites em vacas de boa produção. Neste âmbito, a interação do agente etiológico, principalmente o *S. aureus*, com o ambiente resultará em fenótipos diferentes da bactéria que podem alterar o quadro nefasto à pecuária leiteira. Sabendo disso, é lógico concluir que: o meio ambiente é o fator mais controlável, incluindo-se aqui, o manejo geral dos rebanhos, devendo os técnicos da área ensinar ao produtor de leite a melhor forma de adequá-lo a produção leiteira; já o melhoramento genético desses rebanhos resolverá as questões de resistência à doença, e de produção, no âmbito da quantidade e da qualidade; porém, a genética dos microrganismos, como a do *S. aureus*, contribuirá, e muito, com a produção de fármacos e com o conhecimento desse problema.

Desta forma, a presente pesquisa vem se somar a esse conjunto de medidas, pela elucidação do polimorfismo genético encontrado, pelo conhecimento de aspectos da resistência bacteriana, de minúcias ligadas à seqüência de nucleotídeos, ou pela criação de métodos diagnósticos, imediatamente aplicáveis a esse contexto.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. Phylogenetic estimation. In BISHOP, m.j.; RAWLINGS, C. J. (eds). **Dna and protein sequence analysis – a practical apporoach**. New York, IRL Press, 1997, p.279-312.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database searchprograms. **Nucleic. Acid Res.** Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

ATCHLEY, R.; ZHU, J. Developmental quantitative genetics conditional epigenetic variability and growth in mice. **Gen.**, v.147, p.765-776, 1997.

AXFORD, R. F. E.; BISHOP, S. C.; NICHOLAS, F. W.; OWEN, J.B. **Breeding Diseases, Resistant in Farm Animals**. 2nd Edition, CAB International, Wallingford, UK, p.3-21, 2000.

BEIJI, J.; WAHLUND, T.M.; WOESE, C.R. CASTENHOLZ, R.W.; MADIGAN, M.T. A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum*. **Arch. of Microbiol.**, v.156, p.81-90, 1986.

BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade Genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós- Graduação em Agronomia-Universidade Federal do Paraná, Cutitiba, 2000, 58 p.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA-Cenargen, Brasília, 309p., 1998.

BUZZOLA, F. R.; QUELLE, L.; GOMEZ, M. I.; CATALANO, M.; STEELE-MOORE, L.; BERG, D.; GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; SORDELLI, D.O. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. **Epidemiol. and Infect.**, v.126, p.445-452, 2001.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. F. Analysis of human evolution. In: GENETICS TODAY, 11th, 1964. **Proc. Int. Congr. Genet.** The Hague, The Netherlands: Pergamon, 1964, p. 923-933.

CHARBONIER, Y.; GETTLER, B.; FRANÇOIS, P.; BENTO, M.; RENZONI, A.; VAUDAUX, P.; SCHLEGEL, W.; SCHERENZEL, J. A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genotyping, deletion mapping and gene expression analysis on *Staphylococcus aureus*. **BMC Genomics**, v.95, n.6, doi: 10.1186/1471-2164-6-95, 2005.

CHEN, J.; ANDERSON, J. B.; DeWEESE-SCOTT., C; FEDOROVA., N. D.; GEER, L. Y.; HE, S.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; JACOBS, A. R.; LANCZYCKY, C. J.; LIEBERT, C. A.; LIU, C.; MADEJ, T.; MARCHLER-BAUER, A.; MARTCHLER, G. H.; MAZUMDER, R.; NIKOSKAYA, A. N.; RAO, B. S.; PACHENKO, A. R.; SHOEMAKER, B. A.; SIMONYAN, V.; SONG, J. S.; THIESSEN, P. A.; VASUDEVAN, S.; WANG, Y.; YAMASHITA, R. A.; YIN, J. J.; BRYANT, S. H. MMDB: Entrez's 3 D-structure databases, **Nucl. Acids Res.**, v.31, n.1, p.474-477, 2003.

COLLINS, M. D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the genus *Actinomices*, as *Actinomices pyogenes* com. nov. **J. Gen. Microbiol.**, v.128, n.4, p.901-903, 1982.

CORT, J. R.; MONTELIONE, G.T.; KENEDY, M. A.; Nmr solution of a Gcn5-Like putative N – Acetyltransferase from *Staphylococcus aureus*. neSG, ZR31, PDB 1r57, 2005.

COSTA, E. O.; GANDRA, C. R.; PIRES, M. F.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Micopathol.**, v.124, n.1, p.13-17, 1993.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANEBLE, E. T.; SÁ, R.; SILVA, J. A.; GARINO, J. F. Evaluation Of Dry Cow Treatment On Bovine Mastitis: Cure Rate And New Infection Rate. Nap-Gama/Fmvz-Usp, Poster Presentations, XIX WBC, **Anais**, Edinburgh, p.193-195, 1996.

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGLIA, M.; SANCHES, I. S.; de LENCASTRE, H. Identification of clinical *staphylococcal* isolates from humans internal transcribed Spacer pcr. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.9, p.3099-103, 2001.

CRUZ, L. M. **Caracterização e análise filogenética molecular, de novos isolados fixadores de nitrogênio.** Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFPR, Curitiba, 2001, 171p.

CULLOR, J. S. Mastitis in dairy cows. Does it hinder reproductive performance? **Vet. Med.**, 8, 830-835, 1992.

DANESHWAR, P.; SHER-ULLAH, S. K. Genomic Extration from *Victoria Amazonica*. **Plant Mol. Biol. Rep.**, n.22, p. 195-196, 2004.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v.1, p.19-21, 1983.

DESZO, E. L.; STEENBERGEN, S. M.; FREEDBERGER, D. I. e VIMR, E. R. Escherichia coli K1 polysialic acid O-acetyltransferase gene, neuO, and the mechanism of capsule form variation involving a mobile contingency locus. **Veterinary Pathobiology**, Illinois, 2004.

DESZO, E.L.; STEENBERGEN, S.M.; FREEDBERGER, D. I.; VIMR, E. R. Escherichia coli K1 polysialic acid O-acetyltransferase gene, neuO, and the mechanism of capsule form variation involving a mobile contingency locus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.102, n.15, p.5564-5569, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, v.19, p.11-15, 1987.

EMBRAPA-CNPGL, **Método de Secagem de Vacas**, Extraído da Pasta do Produtor de leite Coronel Pacheco, MG, 1996. Disponível em www.EMBRAPA/pesquisas/gp/html. Acesso em 1º/10/2006.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction, **Sci.**, v.252, p.1643-1651, 1991.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approaching using Bootstrap. **Evol.**, n.39, p.783-791, 1985.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. DNAPARS - DNA Parsimony Program. Seattle Distributed by the author. **Department of Genetics, University of Washington** (1986 - 1993).

FERNANDES, D.(a). Vaca seca: Onde começa o lucro com leite. **Atualização Técnica 37**, Div. Agropec. Pfizer, 2006. Disponível em www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizações 5. asp. Acesso em 25/09/2006.

FERNANDES, D.(b). Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: Sua real importância e aplicação prática. **Atualização Técnica 33**, Div. Agropec. Pfizer, 2006. Disponível em www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizações5.asp. Acesso em 25/09/2006.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Editora Embrapa**, 3ª Edição, pág. 40-53, 1998.

FERREIRO, L.; CLEMENTE DOS SANTOS, E.; DA SILVA, N. Occurrence and Etiology of Bovine Mastitis in the "Zona da Mata" Region of Minas Gerais State, Brazil. **Arq. Esc. Vet.**, v.33, n.1, p.31-37, 1981.

FIGUEIREDO, J. B. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa. Belo Horizonte. **Anais**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, XI, p.176-94, 1995.

FITZGERALD, J. R.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMYTH, C. J. Molecular population and virulence analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. **J. of Appl. Microbiol.**, n.88, p.1028-1037, 2000.

FONSECA, L. F. L. Princípios básicos sobre funcionamento, dimensionamento, manutenção e avaliação dos sistemas de ordenha. São Paulo. **Anais**. 2º Encontro de Pesquisadores em Mastites Bovinas do Estado de São Paulo, 1996, p.11-27.

FOX, G. E.; STACKEBRANDT, E.; HESPELL, R. B.; GIBSON, J.; MANILOFF, J.; DYER, T. A.; WOLFE, R. S.; BALCH, W. E.; TANNER, R. S.; MAGRUN, L. J.; ZABLEN, L. B.; BLAKEMORE, R.; GUPTA, R.; BONEN, L.; LEWIS, B. J.; STHAL, D. A.; LUERHRSEN, K. R.; CHEN, K. N.; WOESE, C. R. The phylogeny of prokariotes. **Sci.**, Eashington, v.209, p.457-463, 1980.

FUNGARO, M. H.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, Cap. 8, p.205-227, 1998.

GENBANK N. H. I. **International Nucleotide Sequence Database Collaboration**. Nucleic Acids Research, v.32, n.1, p.23-26, 2004.

GOLDMAN, N. Phylogenetic estimation. In: BISHOP, M. J.; RAWLINGS, C. J. (Eds.). **DNA and protein sequence analysis – a practical approach**. New York: IRL Press, 1997, p.279-312.

GONÇALVES, D.; KOZICKI, L. E. Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows, with and without placental retention and mastitis. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.34, n.6, p.371-382, 1997.

GONÇALVES, D.; KOZEMJAKIN, A. D.; BACILA, M.; OLIVEIRA, B. H.; BAGGIO, J. V. N.; FERREIRA, A. J. M.; ANDRADE, U. V. C.; BRANDALISE, F. Uso intramamário de clorhexidina em bovinos. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v.54, n.311, p.3-8 1999.

HALL, T. A. BioEdit 4.8. Raleigh,. 1 arquivo (11,5M); Disponiible in <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windown 95/98/NT. Access july 2006, 1997-2001.

HARTSTEIN, A. I.; MORTHLAND, V. H.; ENG, S. Restriction enzymes analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *S. aureus* blood culture isolates. **J. of Clin. Microbiol.**, n. 27, p.1874-1879, 1989.

HERMANS, K.; De HERDT, P.; BAELE, M.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F. Sequence analyses of a RAPD band differentiating high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains form rabbits. **Vet. Microbiol.**, v.82, n.1, p.61-7, 2001.

HERSHKOVITZ, M. A.; LEIPE, D. D. Phylogenetic analysis. In: BAXEEVANIS, A. D.; QUELLETTE, B. F. F. (Eds). **Bioinformatics – a practical guide to the analysis of genes and proteins**. New York: John Wiley e Sons, 1998, p.189-230.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J. D.; HIGGIN S, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressivemultiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gaps penalties and weigh matrix choic. **Nucl. Acid. Res.**, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of bootstrapping as a methode for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Syst. Biol.**, n. 42, p.17-48, 1993.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; LAY THEIN, S. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nat.**, n.314, p. 67-73, 1985.

JERMANN, R. M.; OPITZ, J. G.; STACKHOUSE, J.; BENNER, S. A. Resconstructing the evolutionary history of the artiodactyls ribonuclease superfamily. **Nat.**, London, v. 374, p.57-59, 1995.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREEN, R. S. Molecular population genetic analyses of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **J. of Clin. Microbiol.**, n.33, p.376-380, 1995.

KIM, C. H.; KHAN, M.; MORIN, D. E.; HURLEY, W. L.; TRIPATHY, M.; KEHRLI JR., M.; OLUOCHT, A. O., KAKOMA, I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc Gene in the milk. **J. Dairy Sci.**, v.84, p.74-83, 2001

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; EINN, W. C. **Diagnostic Microbiology**, 5th Ed. Lippincott Company, Philadelphia, p.539-576, 2001.

KOSTEMAN, J. R.; EDLING, T. D.; LIPUMA, J. J.; STULL, T. L. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain Reaction ribotyping. **J. of Clin. Microbiol.**, n.30, p.2004-2087, 1992.

LIPMAN, L. J. A.; NIJS, A.; LAM, J. G. M.; ROST, J. A.; DIJK, L. V.; SCHUKKEN, Y. H.; GAASTRA, W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. **Vet. Microbiol.**, n.48, p.51-55, 1996.

LISBOA, C. S.; PIANTA, C. Redução da mastite através do tratamento duplo no período seco. **Anais**. Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, XIV, Acapulco, México, 1994, p.32.

LITT, M.; LUTTY, J. A. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Theoric. Gen. Appl. Gen.**, v.93, n.1, p.190-198, 1989.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogeny of bacterial beyond the 16 S r RNA standart. **ASM News**, Washington, v.65, n.11, p.752-757, 1999.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer designs for standard, bisulphate and real-time PCR. Bioinformatics Advance Access published on October 12, DOI 10.1093 / bioinformatics / bth254, 2004.

MARSOU, R.; BES, M.; BRUN, Y.; BOUDOUMA, M.; IDRISSE, H.; MEUGNIER, H.; FRENEY, J.; ETIENNE, J. Molecular techniques open up new vistas for typing of coagulase-negative *staphylococci*, **Pathol. Biol.**, v.49, n.3, p.203-15, 2001.

MEYER, D. **Árvores evolutivas humanas**: Uma discussão sobre inferência filogenética. Série Monografias, n.3, 1993.

- MORRISON, J. R.; TILLOTSON, G. S. Identification of *Actinomices (Corynebacterium) pyogenes* with the AI 20 *Strep. System*. **J. Clin. Microbiol.**, v.26, n.9, p.1865-1866, 1988.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci. Am.**, p.56-65, 1990.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. A polymerase catalyzed chain reaction. In: WU, R (Eds.). **Recombinant DNA – Part F**. San Diego: Academic Press, 1987, p.335-350.
- MURPHY, K. M., BERG, K. D.; EHLEMAN, J.R. Sequencing of Genomic DNA by Combined Amplification and Cycle Sequencing reaction. **Clin. Chem.**, v.51, n.1, p.35-39, 2005.
- MYLLYS, V.; RIDELL, J.; BJÖRKROTH, J.; BIESE, I.; PYÖRÄLÄ, S. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Vet. Microbiol.**, n.51, p.245-251, 1997.
- NATZKE, R. P. Elements of Mastitis Control. **J. of Dairy Sci.**, v.64, p.1431-42, 1971.
- NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). **BLAST**. Disponível em: <http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> Acesso em setembro de 2006.
- NEI, M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. **Annu. Ver. Gen.**, Palo Alto, v.30, p.371-403, 1996.
- NEI, M.; TAKEZAKI, N; SITNIKOVA, T. Assessing molecular phylogenies. **Sci.**, Washington, v. 267, p. 253-255, 1995.
- OWEN, R. J.; BORMAN, P. A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis. **Nucl. Acid. Res.**, v. 15, n.8, p.3631, 1987.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. and Appl. Gen.**, v.85, n.8, p.985-983, 1991.
- PENNER, G. A.; CHONG, J.; LÉVESQUE-LEMAY, M.; MOLNAR, S. J.; FEDAK, G. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene *Pg3*. **Theor. and Appl. Gen.**, v.85, n.6, p.702-705, 1993.
- PENNY, D. From Macromoleculares to trees. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds). **Nucleic Acid technics in bacterial systematics**. New York: John Wiley e Sons. Ltd, 1991, p.281-324.
- PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JR. Antimicrobial drug resistance in *S. aureus* isolated from cattle in Brazil. **Lett. in Appl. Microbiol.**, n.20, p.391-395, 1995.

PEREIRA, M. S. V.; LEAL, N. C.; LEAL, T. C. A.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, M. P.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. **Lett. in Appl. Microbiol.**, n.35, p. 32-36, 2002.

PINEKTER, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal Causes of Bovine Mastitis. **J. Dairy Sci.**, v.84, p.1140-11248, 2001.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial DNA with guanidium thiocyanate. **Lett. in Appl. Microbiol.**, n.8, p.151-156, 1989.

POLLASTRI, J. R. **Marcadores Moleculares.** Disponível em: www.ufv/dgb/trab2002/GMOL/GMOL004.htm, acesso em 25 de setembro de 2006.

POLLOCK, D. D.; GOLDENSTEIN, D. B. A comparison of two methods for Constructing evolutionary distances from a weighted contribution of transition and transversion differences. **Mol. Biol. Evol.**, n.12, p.713-717, 1995.

PREVOST, G.; POTTECHER, B.; DALHET, M. Pulsed-field gel Electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a intensive care unit. **J. of Hosp. Infect.**, n.17, p.255-259, 1991

QUINN, P. J. **Clinical Veterinary Microbiology**, Mosby - Year: London, 1994.

RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B. P.; CHANDRASHEKAR, A.; VARADARAJ, M. C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *yersinia enterocolitica* in milk samples. **Mol. and Cell. Prob.**, n.16, p.307-314, 2002.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system** – Version 2.1. New York, Applied Biostatistic Inc., 44 p., 2000

ROMANO, E. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In_ **Manual de Transformação Genética de Plantas**, EMBRAPA, Brasília, p.163-177, 1998.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Sci.**, Washington, v.239, p.487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** New York: **Cold Spring Harbor Lab. Press**, 2002.

SANDERSON, M. J.; WOJCIECHOWSKI, M. F. Improved bootstrap confidence Limits in large scale phylogenies, with an example from neo-astragalus (Leguminosae), **Sist. Biol.**, n. 49, p. 671-685, 2000.

SANKOFF, D. Minimal mutation trees of sequences. **SIAM. J. Appl. Math.**, v.28, n.1, p. 35-42, 1975.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, p.130- 199, 1957.

SILVA, V. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, D. G. M. Biochemical characteristics of typical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Braz. J. of Microbiol.**, n.31, p.103-106, 2000.

SINGER, M. S.; BERG*, L. M.; MCEVOY, C.; BERLIN, R. F.; BARGATZE, E. C. BUTCHER. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. **Nat.**, n. 366, p. 695-618, 1993.

SITNIKOVA, T.; RHZETSKI, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Mol. Bio. Evol.**, n.12, p.319-333, 1995.

SLIGHTOM, J. L.; DRONG, R. F.; CHEE, P. P. Polymerase chain reaction: gene detection, inverse PCR, and genetic engineering. In: GELVIN, S. B; SCHILPEROORT, R. A. (Eds.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1995. Section F4, p.1-24.

SNEAT, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**, San Francisco: W.F. Freeman, San Francisco, USA, 1973.

SOARES, M. J. S.; TEIXEIRA, L. A.; NUNES, M. R.; CARVALHO, M. C. S.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; FIGUEIREDO, A. M. S. Analysis of different molecular methods for typing methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. **J. Med. Microbiol.**, v.50, p.732-742, 2001.

SPOLIDORIO, D. M. P.; HOFLING, J. F.; PIZZOLITO, A. C.; ROSA, E. A.; NEGRINI, T. C.; SPOLIDORIO, L. C. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, n.3, p.213 -217, 2003.

STADEN, R; BEAL K. F; BONFIELD, J. K. **The Staden Package**. In Computer Methods in Molecular Biology. Edited by: Misener S, Krawetz S. Totowa, NJ 07512, the Humana Press Inc., v.132, p.115 -1130, 1998.

SUMER, A; DANESHWAR, P; SHER-ULLAH, S.J. Isolation of DNA for RAPD Analysis from Dry Leaf Material of Some *Hesperis* L. Specimens. **Plant Molecular Biol. Rep.**, v.21, p.461-462, 2003.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic inference. In: HILLIS D. M; MORITZ, C; MABLE, B. K. (Eds.). **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, p.407-514, 1996.

SWOFFORD, D.L. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods) – Version 4, **Sunderland**, Massachusetts, 1998.

- TAKAHATA, N. Allelic genealogy and human evolution. **Mol. Biol. Evol.**, Lawrence, v. 10, p. 2-22, 1993.
- VAN DE PEER, Y.; CHAPPELLE, S.; DE WACHER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucl. Acid. Res.**, Oxford, v.24, n.17, p.3381-3391, 1996.
- VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDNE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEL, M.; WANTERS, G.; GALA, J. L. Specific Detection of Methicilin-Resistant *Staphylococcus Species* by Multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.11, p.2864-2867, 1995.
- VEIGA, V. M. DE O.; GOMES, A. T.; REIS, E. S.; COSTA, L. R. Custo de Um Programa Básico de Controle de Mastite Bovina Em Condições Brasileiras de Criação. Embrapa/Cnpq, **Anais. XV Panvet**, Campo Grande, MS, p.247, 1996.
- VIEIRA-DA-MOTA, O.; FOLLY, M. M.; SAKYIAMA, C. C. H. Detection of different *S. aureus* Strains in bovine milk from subclinical mastitis, using PCR and routine techniques. **Braz. J. of Microbiol.**, n.32, p.27-31, 2001.
- VOS, P.; BECKER, J.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Mol. Gen. Gen.**, v.249, n.1, p.65-73, 1995.
- WANG, H.; QI, M.; CUTLER, J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucl. Acid. Res.**, v.21, p.4153-4154, 1993.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers **Nucl. Acid. Res.** London, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. DNA polymorphisms amplified by binary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid. Res.**, n.18, p. 6531-6535, 1990.
- WILSON, A. C.; CARLSON, S. S.; WHITE, T. J. Biochemical evolution. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.46, p.573-639, 1977.
- YACCOB, R.; ZEALEY, G. A one-step procedure for the purification of high molecular weight bacterial chromosomal DNA. **Nucl. Acid. Res.**, v.16, n.4, p.1639, 1988.
- YANG, W. M.; YNOUYE, C. J.; ZENG, Y.; BEARSS, D.; SETO, E. Transcriptional repression by YY1 mediated by interaction with mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.93, p.12845-12850, 1996.
- YONG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman e Hall, p.43-86, 1992.
- ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in New York: Academic Press, p.97-166, 1965.

ANEXOS

ANEXO I - RELAÇÃO DE ANIMAIS – PROCEDÊNCIA – RESULTADOS DO TESTE “CMT”

Amostra	Vaca	Propriedade	CMT	Quarto do Úbere				Bactéria Isolada
				AE	PE	AD	PD	
1	Vani	Dr. Nélio	++		X			NC
2	Vani		++				X	NC
3	Vani		++			X		NC
4	Vini		+++			X		NC
5	Vini		+++				X	<i>Micrococcus</i>
6	Fortaleza		++			X		NC
7	Apucarana		++			X		<i>S. aureus</i>
8	Apucarana		++				X	NC
9	Apucarana		++		X			NC
10	Wiersma		+++	X				NC
11	Wiersma		+++		X			NC
12	Wiersma		+++			X		NC
13	Wiersma		+++				X	NC
14	Uaci		+				X	NC
15	Angélica		+++				X	NC
16	Xangai		++	X				NC
17	Xangai		++			X		<i>Micrococcus</i>
18	Xangai		++				X	NC
19	Xuminã		+				X	<i>Micrococcus</i>
20	Utilitária		++				X	<i>Micrococcus</i>
21	Utanga		++				X	<i>Staphylococcus</i>
22	Volupia		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
23	Volupia		+++		X			Levedura
24	Suzana		+++	X				Levedura
25	Elza		+++	X				Levedura
26	Xilóca		++			X		Levedura
27	Eterna		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
28	Eterna		+++		X			Cocos isolados
29	Xeen		++			X		NC
30	Xeen		++		X			NC
31	Miúda	Edgar Berleze	+++	X				NC
32 A	Miúda		+++		X			<i>Bacilos</i>
32 B	Miúda		+++			X		<i>Bacilos</i>
33	Miúda		+++				X	NC
34	Velha		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
35	Cisne		+++		X			<i>Bacilos</i>
36	Pretinha		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
37	Pintada		+++			X		<i>Micrococcus</i>
38	Pintada		+++				X	<i>Micrococcus</i>
39	Renata		++=			X		?
40	Renata		++	X				NC
41	Bolinha	Celso Schulis	+++	X				<i>Bacilos</i>
42	Bolinha		+++			X		NC
43	Bolinha		+++			X		?

Amostra	Vaca	Propriedade	CMT	Quarto do Úbere				Bactéria Isolada
				AE	PE	AD	PD	
44	Bolinha		+++			X		?
45	Hortência		++	X				<i>Micrococcus</i>
46	-		++		X			<i>Micrococcus</i>
47	-		++				X	<i>Micrococcus</i>
48	Filó		+++	X				Bacilos
49	Filó		+++		X			<i>S. aureus</i>
50	Lalinha	João Grochowski	++				X	<i>Staphylococcus</i>
51	Sereia		+	X				<i>S. aureus</i>
52	Suly		++	X				<i>S. aureus</i>
53	Matka		+++				X	NC
54	Sereia		+++		X			<i>S. aureus</i>
55	Yanka		+	X				<i>S. aureus</i>
56	Zazá		++				X	<i>S. aureus</i>
57	Nevenka		+++	X				NC
58	Nevenka		+++			X		Cocos isolados
59 A	Diva	Ilsan Piovesan	++	X				<i>Staphylococcus</i>
59 B	Diva		++		X			Bacilos
60	Diva		+++				X	Bacilos
61	Yanka		++				X	Bacilos
62	Yanka		++	X				Bacilos
63	Bete		++			X		<i>S. aureus</i>
64	China		++		X			Bacilos
65	China		++			X		Bacilos
66	China		++				X	Cocos isolados
67	Talia	Ivo Piovesan	++	X				<i>Micrococcus</i>
68	Talia		+++			X		Cocos isolados
69	Chocolate		+++				X	Cocos isolados
70	Ramini		+++	X				<i>S. aureus</i>
71	Ramini		+++		X			Bacilos
72	Ramini		+++			X		<i>S. aureus</i>
73	Ramini		+++				X	<i>Micrococcus</i>
74	Baixinha		++		X			<i>Micrococcus</i>
75	Baixinha		++				X	<i>S. aureus</i>
76	Baixinha		+++			X		<i>Micrococcus</i>
77	Brenda		++			X		Bacilos
78	Fonte	João Baggio	+++		X			<i>S. aureus</i>
79	Fonte		+++				X	<i>Micrococcus</i>
80	Agar		++		X			<i>S. aureus</i>
81	Doce		++		X			<i>Micrococcus</i>
82	Dolly		+++		X			Bacilos
83	Dolly		+++				X	<i>Staphylococcus</i>
84	Duna		+++		X			<i>S. aureus</i>
85	Divina		+++	X				<i>S. aureus</i>
86	Divina		+++		X			<i>S. aureus</i>
87	Escura		+++	X				<i>Staphylococcus</i>

Amostra	Vaca	Propriedade	CMT	Quarto do Úbere				Bactéria Isolada
				AE	PE	AD	PD	
88	Escura		+++			X		<i>S. aureus</i>
89	Escura		+++		X			<i>S. aureus</i>
90	Escura		+++				X	<i>S. aureus</i>
91	Deca		++	X				<i>S. aureus</i>
92	Formosa		+++		X			<i>S. aureus</i>
93	Dorminhoca		+++			X		<i>S. aureus</i>
94	Dorminhoca		+++		X			<i>S. aureus</i>
95	Dorminhóca		+++			X		Bacilos
96	Fita		++		X			<i>Micrococcus</i>
97	Glória		+++			X		<i>Micrococcus</i>
98	Fenda		+++		X			<i>Micrococcus</i>
99	Espuma		+++			X		<i>S. aureus</i>
100	Xuminã	Faz. S. Cecília	+++				X	<i>Micrococcus</i>
101	Xereta		+++	X				<i>Micrococcus</i>
102	Xereta		+++				X	<i>Micrococcus</i>
103	Fortaleza		++		X			Leveduras
104	Gladis		+++	X				Leveduras
105	Gladis		+++		X			NC
106	Gladis		+++				X	NC
107	Brigite		+++	X				Leveduras
108	Brigite		+++		X			Leveduras
109	Brigite		+++			X		Leveduras
110	Brigite		+++				X	Leveduras
111	Elza		+++	X				Leveduras
112	Elza		+++		X			NC
113	Elza		+++			X		Leveduras
114	Elza		+++				X	Leveduras
115	Uliete		++		X			NC
116	Apucarana		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
117	Apucarana		+++		X			<i>S. aureus</i>
118	Apucarana		+++			X		NC
119	Apucarana		+++				X	Bacilos
120	Valentina		++		X			NC
121	Abelha		+++	X				<i>S. aureus</i>
122	Castro	Faz. Pé da Serra	+++	X				<i>S. aureus</i>
123	Castro		+++		X			<i>S. aureus</i>
124	Castro		+++			X		<i>S. aureus</i>
125	Castro		+++				X	<i>S. aureus</i>
126	Castro		+++				X	<i>S. aureus</i>
127	Vaca	Eduardo Frari	+++			X		<i>S. aureus</i>
128	Vascaína	Faz. S. Luzia	+	X				NC
129	América		++		X			Cocos isolados
130	Diana		++	X				<i>Staphylococcus</i>
131	Colie		++			X		<i>Staphylococcus</i>
132	Colie		+				X	<i>Staphylococcus</i>

Amostra	Vaca	Propriedade	CMT	Quarto do Úbere				Bactéria Isolada
				AE	PE	AD	PD	
133	Cris		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
134	Atlântica		+++	X				Bacilos
135	Atlântica		+++		X			<i>S.aureus</i>
136	Atlântica		++				X	Cocos isolados
137	Atlântica		+			X		<i>Saphylococcus</i>
138	Baitaca		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
139	Bibelô		++				X	Cocos isolados
140	Dama		+				X	<i>S. aureus</i>
141	Cegonha		+++		X			<i>Staphylococcus</i>
142	Cegonha		+++				X	<i>S. aureus</i>
143	Beleza	Verde)	+++	X				<i>Staphylococcus</i>
144	Beleza		++		X			NC
145	Beleza		+++				X	NC
146	Burguesa		+++	X				NC
147	Burguesa		+++		X			<i>Staphylococcus</i>
148	Burguesa		++				X	<i>Micrococcus</i>
149	Burguesa		++			X		<i>Micrococcus</i>
150	Avaré		+++				X	NC
151	Avaré		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
152	Avaré		+++	X				NC
153	Avaré		+++		X			Bacilos
154	Ametista		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
155	Ametista		+++				X	NC
156	Ametista		+++		X			<i>Staphylococcus</i>
157	Ametista		+++			X		<i>S. aureus</i>
158	Almíscar		+++		X			<i>S. aureus</i>
159	Batista		++	X				<i>Staphylococcus</i>
160	Ermínia		+++	X				Cocos isolados
161	Ermínia		+++		X			<i>Micrococcus</i>
162	Ermínia		+++			X		<i>Micrococcus</i>
163	Ermínia		+++				X	<i>Staphylococcus</i>
164	Vampira		+++	X				<i>Streptococcus</i>
165	Vampira		+++		X			Bacilos
166	Vampira		+++			X		<i>Streptococcus</i>
167	Vampira		+++				X	NC
168A	Areta		+++		X			<i>Staphylococcus</i>
168B	Areta		+++			X		Bacilos
168C	Areta		+++				X	<i>Staphylococcus</i>
168D	Areta		+++	X				Bacilos
169A	Esperta		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
169B	Esperta		+++			X		Bacilos
169C	Esperta		+++				X	Cocos isolados
170	Catita	(verde)	+++	X				NC

Amostra	Vaca	Propriedade	CMT	Quarto do Úbere				Bactéria Isolada
				AE	PE	AD	PD	
170A	Catita		+++		X			<i>Staphylococcus</i>
170B	Catita		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
170C	Catita		+++				X	<i>Staphylococcus</i>
171	Bragança		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
172	Vernisage		+++	X				<i>S. aureus</i>
173	Foca		+++				X	<i>S. aureus</i>
174	Bitola		+++		X			Cocos isolados
175	Carmen		+++			X		Cocos isolados
176	Carmen		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
177	Diná		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
178	Foca		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
179	Vaca I		+++	X				<i>S. aureus</i>
180	Vaca II		+++				X	<i>Staphylococcus</i>
181	ATCC	Elza Ciffoni	+++	X				<i>S.aureus</i>
182	Bovino		+++		X			<i>S.aureus</i>
183	Búfalo		+++			X		<i>Staphylococcus</i>
184	Cabra		+++				X	<i>Staphylococcus</i>
185	Angaíba 27	Faz. G. Azul	+++	X				<i>S. aureus</i>
186	Angaíba 27		+++		X			<i>S. aureus</i>
187	Bety		+++			X		<i>S. aureus</i>
188	Luíza		+++				X	<i>S. aureus</i>
189	Luíza		+++	X				<i>S. aureus</i>
190	Geadá		+++	X				<i>S. aureus</i>
191	Odessa		+++	X				<i>S. aureus</i>
192	Berta		+++	X				<i>Micrococcus</i>
193	Elaine		+++		X			NC
194	Elaine		+++				X	<i>S. aureus</i>
195	Samantha		++	X				<i>Micrococcus</i>
196	Uraqueçaba		+++	X				<i>Staphylococcus</i>
197	Uraqueçaba		+++		X			<i>S. aureus</i>
198	Uraqueçaba		+++				X	<i>Micrococcus</i>
199	Gabi		++		X			NC
200	Lidiane		+++		X			<i>S. aureus</i>
201	Lidiane		+++				X	NC
202	DNA	Castro	+++	X				<i>S. aureus</i>
203	DNA	Castro	+++		X			<i>S. aureus</i>
204	DNA	Castro	+++			X		<i>S. aureus</i>
205	DNA	Castro	+++				X	<i>S. aureus</i>
206	DNA	Castro	+++	X				<i>S. aureus</i>

Amostra	Vaca	Propriedade	CMT	Quarto do Úbere				Bactéria Isolada
				AE	PE	AD	PD	
207	771 – (1)	Lab M.Henrietti	+++	X				<i>S. aureus</i>
208	474 –(2)		+++				X	<i>S. aureus</i>
209	C8-(3)		+++				X	<i>S. aureus</i>
210	176-(11)		+++	X				<i>S. aureus</i>
211	12-1(2)		+++		X			<i>S. aureus</i>
212	771-14		+++			X		<i>S. aureus</i>
213	404-(15)		+++	X				<i>S. aureus</i>
214	46-(17)		+++				X	<i>S. aureus</i>
215	394-(18)		+++		X			<i>S. aureus</i>
216	176-(4)		+++	X				<i>S. aureus</i>
217	462-(19)		+++	X				<i>S. aureus</i>

Legenda:

CMT: *Caifornia Mastitis Test*.

AE: quarto anterior esquerdo, do úbere.

AD: quarto anterior direito, do úbere.

PE: quarto posterior esquerdo, do úbere.

PD: quarto posterior direito, do úbere.

ANEXO II - CONCENTRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DILUÍDOS DE DNA ISOLADOS DE *S. aureu.*

AMOSTRA	Nº EXTRAÇÃO	CONC. (ng)	DILUIÇÃO DNA:H ₂ O	AM.	Nº EXTRAÇÃO	CONC. (ng)	DILUIÇÃO DNA:H ₂ O
1	7	100	1:10	40	173	10	Não dil.
2	7-1	100	1:10	41	179	500	1:50
3	49	1000	1:100	42	181	500	1:100
4	51	1000	1:100	43	182	500	1:50
5	52	500	1:50	44	185	1000	1:100
6	54	500	1:50	45	186	100	1:10
7	55	100	1:10	46	186-1	100	1:10
8	56	500	1:50	47	187	500	1:50
9	63	100	1:10	48	188	100	1:10
10	70	2000	1:200	49	189	100	1:10
11	72	1000	1:100	50	190	100	1:10
12	75	1000	1:100	51	191	500	1:50
13	78	100	1:10	52	194	1000	1:100
14	80	1000	1:100	5.3	197	500	1:50
15	84	500	1:50	54	200	1000	1:100
16	85	200	1:20	55	202	200	1:20
17	86	100	1:10	56	203	1000	1:100
18	88	2000	1:200	57	203-1	1000	1:100
19	89	1000	1:100	58	203-2	1000	1:100
20	90	200	1:20	59	204	500	1:50
21	91	500	1:50	60	205	2000	1:200
22	92	100	1:10	61	206	1500	1:150
23	93	1000	1:100	62	207	200	1:20
24	94	100	1:10	63	208	100	1:10
24	99	1000	1:100	64	209	100	1:10
26	117	500	1:50	65	210	500	1:50
27	121	150	1:15	66	211	1000	1:100
28	122	1000	1:100	67	212	200	1:20
29	123	500	1:50	68	212-1	10	Não dil.
30	124	500	1:50	69	212-2	500	1:50
31	125	500	1:50	70	212-3	500	1:50
32	126	500	1:50	71	213	500	1:50
33	127	500	1:50	72	214	1000	1:100
34	135	500	1:50	73	215	1000	1:100
35	140	500	1:50	74	216	200	1:20
36	142	1000	1:100	75	217	500	1:50
37	157	500	1:50	76	LR 1	1000	1:100
38	158	50	1:5	77	LR 2	1000	1:100
39	172	50	1:5	78	<i>Out Group</i>	500	1:50

ANEXO III – SEQÜÊNCIAS DAS AMOSTRAS SUBCLÍNICAS E CLÍNICAS

SUBCLÍNICA

GCNCGANNCATATAGGGGTTCCGCAGGCATTGAGATTCGCACATCGGATGCGC
 ATGCACTGATTGATCTGGATACGATGGAAAGGTGTAACGCTCCTGATGGAGTA
 TACATCGGCCACCACGTGTGGGTTTCGAAAAATGCGTTCATCCAAAAAGGCAC
 TACAATCGGGGACGACAACGTTTTAGGTTATGGCTCCATGGCGAAAGGAGACT
 TAGACGTAACAAATGCGATATTAGTTGGAACCCCCGCAAAGGCGGTGCAAAA
 CCGGCGCGTGACGTGGTCGAGACAAGGTGACCTCAAGAGCATTGACGTTGATC
 GATTGAATGATTGGCAATCTCTGCCAGAGTTATGACGCGTAATCAAAAGGAAT
 TACAATTGTTGCCCCGATCGTTTCTCATTTCGAAAAAGCTATTTACAGGGGA
 AATACCGGCTCGGCGTGAAGCTTATACTTAACGCGGGTTATGTGATCGGGAAA
 TTGACAAATGCGAAAACCTTAAGTCGACTTACACTGCGTGGCTTGATTTTATCG
 GCTGAGCGCGTGAACGACGTCCCTGCCTTGGAAGCCCTGCTTCTTAAGTACTC
 GCGAAGCTATCCCGACTCATGGAAGATCCTCGAGAAGTTCGCCAAAACCTGGG
 AACTTACGTCCGATCATGAGATCATGACGGCCCCGTATATCGACTTCGAGGT
 ACGCGAGTTGATTCGGGCCGACACCTTACGTGCGGAACGAAATC

CLÍNICA

TATAGGGGTTCCGCATAGGTGTGCAGATGTACCAAACCTTGGTAATTGAAGGAC
 AAAATTTGTTGAATACGAACGTTAACGAATGGCAGGCTCTGAGATTTGACCTT
 GTATAACTTGAGTAGAGACGATCTGATTGTTAGCTAGATAATAGGTAAGCATT
 TTACATTAACACCTCTGTTGACGCCCGGCTCAATTTTGTAGAAGCATTAGTCTA
 CGTGATGCGCCCAGGGCGTCACGGCATGGGTCGACGACTCTGTTTCGCATCCAT
 TGGGGCTAACCTTTCACCGATCACAAGCGGCGACCTTTGATACGCCGGATAGC
 GATGGGATTATAATTATTGTAGCCACTGAAGCGTCACAAAATTGTGACCTGGC
 GTATCTTGAGGGCGTGAGCAAAGGGCGTGCTGGGCGTGATATTGTAGGGCGC
 GCCAAGCTTTGCAGTCTTGGCGAATGATGTCAACGTGCCACTCTTAGGTCACG
 TCTTTCGTTGGAATTTGCACTGAGATGGGCCATCGCCTTGACATCGTTCTCTGA
 AAGTGCCGGTAACAGACCATGAAGCCAGACTTGAGCGAGAGATGAGGCTGAG
 ATTGTTCCCTCGTATCTGACTGCACGGCGATTTCTATTTCAATAGGATGGACATG
 AACTGCTATAGGGGTTGGGAGAACCAAGAACACTGCAATAAAGTAAAGCAG
 ACTCAAGACGTCTGAGTTTCAACATTGTATATGCGTGCGGAACGAAATC

ANEXO IV – TRABALHOS PUBLICADOS

Isolamento, identificação e extração de DNA Genômico de *Staphylococcus aureus* de mastites clínicas e subclínicas bovina, pelo método do CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio)

Autores: Gonçalves, D.¹; Higuti, I. H.², Vicente, V. A.²; Bittencourt, J. V. M.³, Neiva, I. F.¹, Andersen, E.⁴ e Gonçalves, C. H. M.⁴.

Abstract

A total of 217 milk samples were collected, proceeding from cow-herds with chronic sub-clinical mastitis, through the California Mastitis Test diagnosis - CMT, aiming the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* causing losses to milking. The samples were cultured in blood and Chapman agar at 37°C for 24 hours. The identification was for morphological and biochemical characteristics: Gram stain, catalase, coagulase, manitol fermentation and VP probe. 31.3% of the samples are *Staphylococcus aureus*, showing the great importance to milking. For the extraction of genetical DNA, we use same buffers: SDS, DNazol (Life Technologies), EZ-DNA (Biosistem), Nonidet (Sigma), Dneasy (Qiagen), and the modified CTAB (cetiltrimetilamonium bromide). Samples of *S. aureus* were cultured in BHI medium, washed, extracted and purified. After the techniques applications, we note that the modified CTAB show the best results. In this method, after the cellular lysis the genetic material were purified with chloroform-isoamyl alcohol (CIA), ethyl alcohol 96 and 70%. The CTAB method is applicable to the genomic DNA extraction of Gram positive bacteria with excellent DNA samples.

Resumo

Foram coletadas 217 amostras de leite bovino, provenientes de vacas leiteiras portadoras de mastite subclínica crônica diagnosticadas pela reação ao “California Mastitis Test” - CMT, com o objetivo de isolar e identificar o *Staphylococcus aureus*, importante microrganismo causador de mastite bovina, responsável por causar enormes prejuízos à atividade leiteira. As amostras coletadas foram semeadas em ágar sangue e em ágar Chapman (ágar manitol-sal) e incubadas a 37° C por 24h e a identificação realizada através das características morfológicas e bioquímicas de *S. aureus*: cocos Gram-positivos, catalase, coagulase em tubo, fermentação do manitol e prova de Voges-Proskauer, todos positivos. Das 217 amostras, 68 (31,3%), foram identificadas como *S. aureus*, mostrando a importância desta bactéria à pecuária leiteira. O DNA genômico do *S.aureus* foi extraído, através de métodos contendo diferentes compostos químicos de extração como: SDS; DNazol (Life Technologies); EZ-DNA (Biosistem); Nonidet (Sigma); Dneasy (Qiagen) e Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) modificado. O método utilizando CTAB-modificado foi o que apresentou melhor resultado. Após a lise das células o material genético extraído foi purificado utilizando clorofórmio-álcool isoamílico (CIA), álcool etílico 96% e 70%. O método revelou-se aplicável à extração do DNA genômico de bactérias Gram-positivas, possibilitando a obtenção de excelentes amostras de DNA.

Palavras chaves: *Staphylococcus aureus*; isolamento; extração de DNA; mastite.

¹ Doutorado em Processos Biotecnológico e Professor da PUC-PR.

² Professores do Departamento de Patologia Básica-UFPR.

³ Engenheira Agrônoma do Laboratório de Melhoramento Florestal – UFPR.

⁴ Bolsistas da UTP e PUC-PR

INTRODUÇÃO

No âmbito da produção e industrialização do leite, um dos fatores que mais reduz a qualidade e a produção leiteira é a mastite. Segundo Cullor (1992), a mastite é uma doença que ataca em média 15% das vacas leiteiras em todo mundo, com prevalência na ordem de 50%, dados confirmados por Gonçalves e Kozicki, (1997). Podemos dividi-la em mastites clínicas ou ambientais e em subclínicas ou contagiosas. Destas, as segundas são as mais importantes, por acometerem o maior número de matrizes produtivas, principalmente as provocadas pelo *S. aureus*, que se apresentam na forma subclínica crônica, a mais contagiosa. Na forma subclínica, não são facilmente atacadas por antimicrobianos. A mastite por estas bactérias é caracterizada por alta contagem de leucócitos (neutrófilos ou polimorfonucleares), no leite. A invasão e lesão tecidual da glândula mamária por estes microrganismos iniciam uma resposta inflamatória com conseqüente aparecimento de sinais clínicos que incluem mudanças na aparência do leite, em sua composição, altas contagens leucocitárias e grande redução do volume produzido, se revestindo de grande importância econômica, e segundo dados de Axford, (2000) que estuda a resistência à doença, causa prejuízos da ordem de US\$ 180 por animal, além de imensuráveis problemas de saúde pública.

A diversidade de protocolos existentes para extração de DNA, reflete a variabilidade da composição bioquímica encontrada em diferentes células, plantas e microrganismos. Estes diferentes protocolos, procuram solucionar problemas decorrentes de DNAses endógenas, isolamento de polissacarídeos inibidores de enzimas, os quais conferem ao DNA extraído um aspecto gelatinoso e viscoso, de substâncias fenólicas, que conferem tom marrom devido a oxidação dos compostos quinônicos ou de outras substâncias que possam danificar o material genético, ou inibir a ação da *Taq* polimerase

Vários métodos para o isolamento de DNA de células procarióticas têm sido descritos (BEJI et al., 1986; WEEKS et al., 1986; DAWSON et al., 1987; LEWINGTON et al., 1987; OWEN e BORMAN, 1987; YACOOB e ZEALEY, 1988, PITCHER et al., 1989), todos com custos elevados. Esses métodos demonstram serem mais eficientes para extrair DNA de bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, por possui menor

quantidade de peptídeoglicanos na parede celular que as Gram-positivas, de parede mais espessa e mais difícil de ser rompida.

A extração de DNA cromossomal de bactérias Gram-positivas, provenientes do úbere bovino, foi estudada por Buzzola et al. (2001), Couto et al. (2001).

A lisozima e a estafilolisina, tem sido eficiente na extração de DNA cromossomal de cocos Gram-positivos, Myllys et al. (1997); Pereira et al. (2002), obtendo amostras de grande qualidade, porém com custo elevado.

Trabalhos realizados por Dellaporta et al. (1983), com SDS e CTAB, e de Doyle e Doyle, (1987), com CTAB, fundamentou na utilização do detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), envolvendo melhor relação custo-benefício.

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar *S. aureus* de leite de vacas portadoras de mastite subclínica crônica e apresentar um protocolo de baixo custo e de fácil utilização para extrair o DNA total das amostras isoladas de *S. aureus*, através do método do CTAB, e compará-lo com outros compostos utilizados para lisar a parede celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Propriedades e Animais selecionados

Foram acompanhadas matrizes de doze propriedades localizadas na região metropolitana de Curitiba, com diferentes níveis tecnológicos, todas com ordenha mecanizada, onde havia casos subclínicos crônicos de mastite.

Os animais foram selecionados a partir da verificação de altas contagens de células somáticas (CCS) e de “California Mastitis Test” (CMT) (SCHALM e NOORLANDER, 1975). Foram considerados positivos os testes de CMT: traços, reação 1, 2 e 3, Tabela I.

TABELA I - COMPARAÇÃO DO CMT E CCS

CMT (Reações)	CCS (n°)
Negativo	
Traços	0 – 200.000
Reação “1”	150.000 – 500.000
Reação “2”	400.000 – 1.500.000
Reação “3”	800.000 – 5.000.000
	> 5.000000

Fonte: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

Coleta e identificação das amostras

Foi realizada previamente uma desinfecção do local da coleta com álcool-gel 70% e os três primeiros jatos de leite foram desprezados para evitar contaminação das amostras. Foram coletadas 217 amostras de leite mastítico e transportadas sob refrigeração, e conservadas a -20°C , até o momento da realização dos exames microbiológicos no laboratório de Microbiologia da UFPR.

Isolamento e Identificação

As amostras de leite mastítico foram semeadas em ágar sangue de carneiro e incubadas a 37°C durante 24h. Após a incubação, as colônias β -hemolíticas desenvolvidas no ágar sangue, foram identificadas morfológicamente pela coloração de Gram. As colônias com características morfológicas de *Staphylococcus* (cocos Gram-positivos), foram repicadas em ágar Chapman (ágar manitol-sal), incubadas a 37°C durante 24 h. Após o crescimento, foram realizadas as provas bioquímicas para a identificação de *S.aureus*: fermentação do manitol, coagulase em tubo e prova de Voges-Proskauer (VP). Amostras de *S. aureus* β -hemolíticos, manitol, coagulase e V.P. positivos, foram conservadas a $4-8^{\circ}\text{C}$, em ágar manitol salgado inclinado (KONEMAN et al., 2001).

Extração de DNA

Os isolados de *S. aureus*, foram repicados no caldo BHI (infusão de cérebro-coração) e incubados a 37°C durante 45h, obtendo-se uma cultura com 10^8 células. As paredes das células foram lisadas com CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), o qual extrai o DNA total em quantidades aceitáveis de células (cultura com 10^8 células), em

concentrações menores, não é detectável. As células foram lavadas com tampão TRIS-EDTA (TE) e centrifugadas. Os “pellets” foram ressuspensos com 600 µL de CTAB, mais 40 µL de mistura de clorofórmio com álcool isoamílico – CIA (49:1) e incubados em banho-maria a 65°C por 30 min. Transcorrido esse tempo, foram adicionados 800 µL de CIA, agitados gentilmente por cinco vezes, e centrifugados a 14.000 rpm por 5 min. A seguir, foram tomados 450 µL do sobrenadante, transferidos a um outro tubo, adicionados parte igual de CIA, misturado da mesma forma anterior, voltando a centrifugar, por mais 5 min. Após, foram tomados 300 µL do sobrenadante, transferido para outro tubo, adicionado 2,5 partes de etanol a 96% frio, deixado “over night” a –20°C.

Transcorrido este período foi repetido a operação com etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 20 min, eliminado o sobrenadante, e deixado os tubos para secagem por 10 min, em fluxo laminar. Após secos, os “pellets” foram ressuspensos com TE e armazenados a temperatura de –20°C.

Em substituição ao CTAB, foram testados outros compostos utilizando de protocolos semelhantes ao CTAB: O Sódio Duodecil Sulfato (SDS) (Dellaporta et al., 1983; Sambrook et al., 2002), foi usado na concentração de 1%, exceto que as células foram incubadas a 60° C por 20 min.

DNAzol (Life Technologies) e EZ-DNA (Biosistem), são reagentes não orgânicos, usados na quantidade de 01 mL por amostra, se tratando de versão modificada do método Chomczynski, feita por Cox, é composto de guanidina-detergente, que possui a vantagem em hidrolisar o RNA e permitir a precipitação do DNA, com etanol. Atuam entre 107 e 108 células, permitindo rápida extração.

Nonidet (Agepol) da Sigma é um detergente de alta viscosidade que hidrolisa o RNA, e permite extração na presença de calor, e a precipitação do DNA com etanol e também isopropanol. Atua em concentração igual a outros detergentes de guanidina, e usado na proporção de 0,5 mL/amostra.

O segundo protocolo testado foi o Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), destinado ao isolamento DNA de fungos. Serve para PCR, análise por RAPD, AFLP, RFLP, microsátélites, Blotting, Real-Time PCR, apresentando protocolo e material próprio e protegido comercialmente, composto de: i) colunas para spin; ii) QIAshredder; iii) tubos para armazenagem do material; iv) Buffer AP1; v) Buffer AP 2; vi) Buffer AP3 (concentrado); vii) Buffer AW (concentrado); viii) Buffer AE; ix) Rnase A (100 mg/mL).

O protocolo utilizado foi: Foram adicionados 400 µL do Buffer AP1, mais 4 µL da solução de RNase. Os frascos foram incubados a 65°C por 10 min para lisar as células. Em seguida foram adicionados 130 µL do Buffer AP2 ao lisado, centrifugado por 5 min.

O lisado foi transferido ao QIAshredder e centrifugado por 2 min, transferido o sobrenadante à outro tubo. Foram adicionados 1,5 volumes do Buffer AP 3, centrifugado e acrescentado 650µL do Buffer AP 3, e após repetido o passo anterior.

Foram colocados 500 µL do Buffer AW, com nova centrifugação. Transferido a outro tubo, adicionado 100 µL do Buffer AE, voltando a centrifugar. Repetido o passo anterior, para obter a amostra de DNA. As centrifugações foram sempre a 12000 rpm.

RESULTADOS

Foi verificado, através da análise das características morfológicas (coloração de Gram) das colônias desenvolvidas no ágar sangue, a presença de *Staphylococcus sp.*, 112/217 (51,61%), *Streptococcus sp.*, 2/217 (0,92%), *Micrococcus sp.* 67/217 (30,87%), Bacilos Gram-positivos, 23/217 (10,60%) e Leveduras (6,0%) e *S. aureus*, identificados pelas provas bioquímicas de fermentação do manitol, prova da coagulase e VP, no leite mastítico, Tabela II.

TABELA II - MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LEITE COLETADO DE CASOS DE MASTITE BOVINA (N=217)

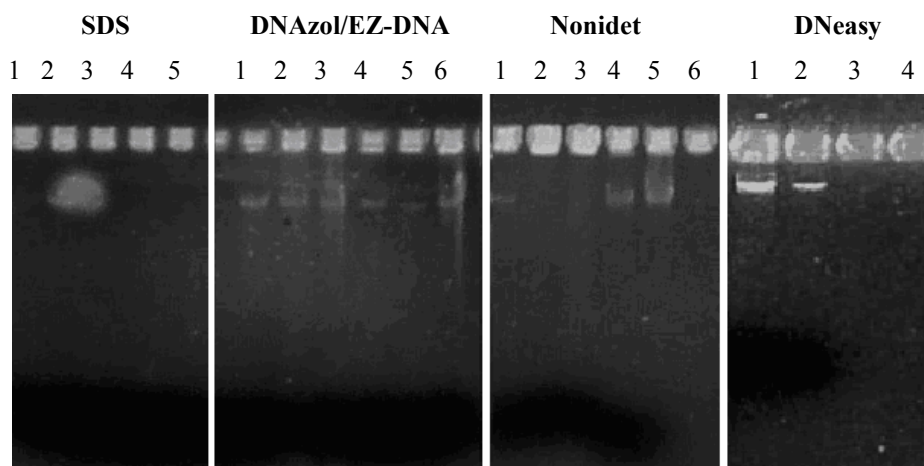
Microrganismo isolados	Nº amostras encontradas	% Total
<i>Staphylococcus aureus</i>	75	34,61
<i>Staphylococcus spp.</i>	37	17,00
<i>Micrococcus</i>	67	30,90
<i>Bacilos Gram-negativos</i>	23	10,50
<i>Leveduras</i>	13	6,00
<i>Streptococcus spp.</i>	2	0,92

Extração de DNA

Foram extraídas 77 amostras de DNA de *S. aureus*, sendo 75 provenientes de isoladas de casos de mastite e duas linhagens referência. Os resultados obtidos revelaram ser o método de extração CTAB-modificado, bastante eficaz para obtenção de DNA total de *S. aureus*, conforme a Figura 1f. Submetidos à espectrofotometria, as amostras apresentaram índice de 1,08, estimando-se em 150 µg de DNA quando extraídas pelo

CTAB. O método da Qiagen mostrou-se igualmente eficiente, como pode se ver Figura 1e. Esse resultado mostra que os protocolos utilizados para extração de DNA total de células vegetais podem ser eficientes para extração de DNA de cocos Gram-positivos.

Fig. 1 - Fotos em gel de agarose, corados em brometo de etídio, comparando resultados obtidos com o uso dos protocolos.



Legenda: SDS (2); DNAzol (1, 2 e 3); EZ – DNA (4, 5 e 6); Nonidet (1, 4 e 5) e DNeasy (1 e 2). As demais são linhas vazias.

DISCUSSÃO

A mastite é uma doença complexa, resultante da interação agente e meio ambiente, incluindo determinantes humanos, e do hospedeiro. Os microrganismos encontrados neste trabalho corroboram com relatos de outros pesquisadores (GONÇALVES e KOZICKI; CULLOR, 1992). Entre os mais comuns, estava o *Staphylococcus aureus*, presente em 34,61% dos casos estudados.

As técnicas selecionadas isolaram o *S. aureus* com grande eficácia, uma vez que outros estafilococos podem estar presentes no parênquima secretor de leite bovino, assegurando assim, a extração do DNA genômico apenas desta bactéria.

O processo de extração envolveu etapas distintas: lise dos cocos, eliminação de proteínas e polissacarídeos e outros compostos indesejáveis, precipitação do material genético e sua conservação. Destas etapas foi à lise da parede celular a mais complexa, para o que há uma variedade em protocolos. Nas demais etapas, o uso de isopropanol, clorofórmio, álcool isoamílico e etanol, é uma unanimidade.

O presente trabalho testou compostos químicos promotores de lise da parede celular, segundo DOYLE e DOYLE, (1987). Apenas o método QIAGEN teve protocolo próprio.

O caldo BHI, permitiu grande desenvolvimento das bactérias, propiciando 10^8 células em seis mililitros de cultura. As lavagens com TE asseguraram a existência de material genético de *S. aureus* (VIEIRA - DA - MOTA et al., 2001). A concentração usada para as culturas, assim como o tempo de cultivo, permitiu extrair boas quantidades de DNA, fato este explicável pela existência de parede celular comprometida e mais frágil, ao preservar vias bioquímicas vitais à sua sobrevivência (QUINN, 1994; KONEMAN et al., 2002).

O método do CTAB foi que apresentou melhor relação custo-benefício, Figura 1g. Nesse âmbito o método do SDS (DELLAPORTA et al., 1983; SAMBROOK et al., 2002) foi ineficaz, prestando-se para lise de paredes celulares de bactérias Gram-negativas, Figura 1a.

As tentativas com o nitrogênio líquido (Romano, 1998), foram trabalhosas e demoradas, extraíndo quantidades de DNA muito pequenas, como se pode ver na Figura 1b.

Extrações com Guanidina-detergente, princípios dos métodos do DNazol e EZ-DNA, Figuras 1c e 1d (PITCHER et al., 1989; PEREIRA et al., 2002), extraíram amostras de DNA muito pequenas e degradadas.

O uso de Nonidet, um espalhante adesivo, na proporção de 40 microlitros, revelou-se ineficaz, Figura 1e. É possível que aumentando essa proporção, na presença de calor, surjam resultados mais satisfatórios.

O método QIAGEN, mostrou-se eficaz, como se pode ver na Figura 1f, onde as amostras estão bem demarcadas e o DNA é de grande qualidade, porém com custo muito elevado.

Finalizando, o método preconizado por este trabalho e por (DELLAPORTA et al., 1983; DOYLE e DOYLE, 1987; SUMER et a., 2003; DANESHWAR e SHER-ULLAH, 2004), conservou a característica de economicidade, extraíndo DNA genômico de boa qualidade, podendo contribuir com o estudo de doenças que envolvam cocos Gram-positivos (HERMANS et al., MARSOU et al., 2001).

REFERÊNCIAS

- AXFORD, R. F. E; BISHOP, S.C; NICHOLAS, F. W; OWEN, J.B. **Breeding Diseases, Resistant In Farm Animals.** 2nd Edition, CAB International, Wallingford, UK, p. 3-21, 2000.
- BUZZOLA, F.R; QUELLE, L; GOMEZ, M. I; CATALANO, M; STEELE-MOORE, L; BERG, D; GENTILINI, E; DENAMIEL, G; SORDELLI, D.O. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. **Epidemiol. Infect.** , v. 126, n.3., p. 445-52, 2001.
- COUTO, I; PEREIRA, S; MIRAGLIA, M; SANCHES, I. S; de LENCASTRE, H. Identification of clinical *staphylococcal* isolates from humans internal transcribed Spacer pcr., **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3099-103, 2001.
- CULLOR, J. S. Mastitis in dairy cows. Does it hinder reproductive performance? Vet. Med. Lenexa, n.8, p. 830-835, 1992. Espacer pcr., **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3099-103, 2001.
- DANESHWAR, P; SHER-ULLAH, S. K. Genomic Extration from *Victoria Amazonica*. **Plant Mol. Biol. Rep.**, n. 22, p. 195-196, 2004.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: Versión II. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue . **Phytochem. Bull.**, v. 19, p. 11-15, 1987
- FONSECA, L. F. L. Vacina garante maior prevenção à mastite. **Revista Balde Branco.** São Paulo, mês de janeiro, p. 19-23, 2001.
- GONÇALVES, D; KOZICKI, L. E. Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows, with and without placental retention and mastitis. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 34, n.6, p.371-382, 1997.
- GONÇALVES, D; KOZEMJAKIN, A. D; BACILA, M; OLIVEIRA, B. H; BAGGIO, J. V. N; FERREIRA, A. J. M; ANDRADE, U. V. C; BRANDALISE, F. Uso intramamário de clorhexidina em bovinos. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes** , v. 54, n. 311, p. 3-8, 1999.
- HERMANS, K.; De HERDT, P; BAELE, M; DEVRIESE, L. A; HAESBROUCK, F. Sequence analyses of a RAPD band differentiating high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains form rabbits. **Vet. Microbiol.**, v. 82, n.1, p. 61-7, 2001.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; EINN, W.C. **Diagnostic Microbiology**, 5th Ed. Lippincott Company, philadelphia, p. 539-576, 1997.

MARSOU, R; BES, M; BRUN, Y; BOUDOUMA, M; IDRISSE, H; MEUGNIER, H; FRENEY, J; ETIENNE, J. Molecular techniques open up new vistas for typing of coagulase-negative *staphylococci*., **Pathol. Biol.**, v. 49, n. 3, p. 203-15, 2001.

MYLLYS, V; RIDELL, J; BJÖRKROTH, J; BIESE, I; PYÖRÄLÄ, S. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Vet. Microbiol.**, n. 51, p. 245-251, 1997.

PEREIRA, M. S. V; LEAL, N. C; LEAL, T. C. A; SOBREIRA, M; ALMEIDA, M. P; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. **Lett. in Appl. Microbiol.**, n. 35, p. 32-36, 2002.

PITCHER, D.G. *et al* , Rapid extraction of bacterial DNA with guanidium thiocyanate., **Lett. in Appl. Microbiol.**, n. 8, p. 151-156, 1989.

QUINN, P. J. Clinical veterinary microbiology. **Mosby-Year**:London, 1994.

ROMANO, E. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In_ **Manual de Transformação Genética de Plantas**, EMBRAPA, Brasília, p. 163-177, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Lab. Press**, 2002.

SÜMER *et al*. Isolation of DNA for RAPD Analysis From Dry Leaf Material of Some *Hesperis L.* Specimens. **Plant Mol. Biol. Rep.**, n. 21, p. 461-462, 2003.

VIEIRA-DA-MOTA, O; FOLLY.M.M; SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *S. aureus* Strains in bovine milk from subclinical mastitis, using PCR and routine techniques. **Braz. J. of Microbiol.**, v. 32, n. 1, 2001.

Análise molecular por meio de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em populações de *Staphylococcus aureus*, causadoras de infecções intramamárias em bovinos

Autores: Gonçalves, D.¹; Vicente, V. A.²; Higuti, I. H.²; Bittencourt, J. V. M.³; Neiva, I. F.¹; Pie, M.⁴; Andersen, E.⁵ e Gonçalves, C. H. M.⁵.

Abstract

Staphylococcus aureus isolates, from bovine mastitis (n = 75) and characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD). The isolates were collected from 75 quarters in lactation during the acute phase of infection. The aim of these studies was compare the *S. aureus* isolates genetic polymorphism. The genetic material amplified was extract from coccus by cetyltrimetil ammonium bromide, purified by chloroform and isoamilic alcohol and preserved witch Tris-EDTA (TE). We use two reference strains, one out group and a total of six primers till de conclusions of the work. The results demonstrate significant heterogeneity of de strains studied about the precedence and epidemiology by the molecular systematic methods and the large dissemination of some clones in different⁵ animal populations. In the other hand the molecular methods used was effective to contribute witch futures studies monitoring the microorganism.

Resumo

Amostras isoladas de *Staphylococcus aureus* (n = 75) de mastite bovina, foram caracterizadas por meio de *Randon Ampliefied Polymorphic DNA (RAPD)*. Os isolados eram coletados de 75 quartos em lactação, durante a fase aguda da infecção com objetivo de verificar a variabilidade genética das amostras. Para extração de DNA usou-se Brometo de cetyltrimetilamônio (CTAB), e o DNA extraído foi purificado por clorofórmio e álcool isoamílico, e conservado em TRIS-EDTA (TE). Para o estudo da variabilidade genética foram utilizados os isolados, duas linhagens referência, um *Streptococcus sp.* como grupo externo, e um total de seis *primers* até a conclusão dos trabalhos. Os resultados demonstraram 108 marcadores revelando significante variabilidade entre as linhagens estudadas considerando-se sua procedência e os dados clínicos, em diferentes populações animais.

Palavras chaves: *Staphylococcus aureus*; polimorfismo genético; RAPD; mastite bovina.

¹ Doutorando em Processos Biotecnológico e Professor da PUC-PR.

² Professores do Departamento de Patologia Básica-UFPR.

³ Eng. Agrônoma do Laboratório de Melhoramento Florestal - UFPR.

⁴ Departamento de Zoologia – UFPR.

⁵ Bolsistas da PUC-PR.

Introdução

Staphylococcus aureus é uma das causas de mastite bovina, com importância econômica (MYLLES et al., 1997). Segundo Cullor (1992), esta doença ataca em média 15% das vacas leiteiras em todo mundo, com prevalência na ordem de 50%, dados confirmados por GONÇALVES e KOZICKI (1997). Muitos métodos bioquímicos e moleculares têm sido usados nas investigações da bactéria em infecções humanas e bovinas (HARTSTEIN et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990, PREVOST et al., 1991, KOSTEMAN et al., 1992 e KAPUR et al., 1995).

Na presente pesquisa usou-se o método de *RAPD*, que permitiu estudar o polimorfismo genético dessa importante bactéria, investigando sua diversidade e dispersão geográfica.

Material e Métodos

Isolamento das bactérias

Um total de 217 amostras de *S. aureus*, provenientes de dez populações de bovinos leiteiros distribuídas geograficamente, foram caracterizadas por meios de testes morfológicos e bioquímicos. Inoculadas em Agar sangue de carneiro, Koneman et al. (2001), verificou-se o grau de hemólise, e a coloração de Gram. Amostras de *S. aureus* β -hemolíticos foram repicadas em *Agar Chapman* e transferidas para meios líquidos: manitol, caldo simples e *Clark Lubis*, realizando-se as provas de coagulase em tubo, e *Voges-Proskauer* (VP). As amostras coagulase positivas, manitol e V.P. positivas, foram mantidas a 4-8 °C, em Agar manitol salgado inclinado (n=75).

Extração de DNA

Isolados destas colônias foram transferidas para caldo BHI (infusão de coração-cérebro), a 37°C por 45 horas, de onde um volume de 6,0 mL, com aproximadamente 10⁸ células foi centrifugado, e o pellet lavado com TRIS-EDTA (TE). O composto CTAB foi usado para extrair o DNA total (DELLAPORTA et al., 1983; DOYLE e DOYLE, 1987; MYLLYS et al., 1997; PEREIRA et al., 2002). Os pellets de DNA, cuja integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram armazenados em TE, a temperatura de – 20°C.

Análise molecular - RAPD

Utilizaram-se os *primers*: OPJ 5 (5'CTCCATGGGG 3'); OPJ 6 (5'TCGTTCCGCA 3'); Primer 786 (5' GCGATCCCCA 3'); Primer 797 (5' AGCGTCACTG 3') e Primer 798 (5' TGACCCGCC 3'), baseado em trabalhos de Myllys et al. (1997) e Pereira et al. (2002) e OPA 2 (5' TGCCGAGCTG 3').

As reações com volume de 14,9 µL, contendo: 20ng de DNA purificado e 1,0 de *Taq* DNA polimerase, 3 mM l⁻¹ MgCl₂, 50 mM l⁻¹ KCl, 10 mM l⁻¹ Tris-Cl (pH 8,8), 200 µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 mM de primer, foram realizadas segundo Pereira et al. (2002) e submetidas a 45 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 36°C e 1 min 30 s a 72°C, com 3 min de desnaturação inicial a 94°C e 5 min de extensão final a 72°C.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, 1,6%, em TRIS - Borato-EDTA buffer, a voltagem de 114 mV. O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por marcador molecular de 100 pb. Incluiu-se em todas as aplicações, controle negativo de duas linhagens referência e um grupo externo.

Análise do polimorfismo

A análise do polimorfismo realizada por *RAPD* foi verificada feneticamente com o método de “Agrupamento” (*UPGMA - Unweighted pair group method with arithmetic mean*) (MEYER, 1993), utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do programa *NTSYS*, versão 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 2000).

A consistência dos agrupamentos foi verificada pelo *bootstrap* (FELSENSTEIN 1986 e 1993), utilizando o *Software Winboot*–Filipinas.

No método *UPGMA*, o suporte de *bootstrap* foi obtido com 10.000 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Apenas os agrupamentos que apresentaram valores de *bootstrap* maior ou igual a 70% foram considerados consistentes.

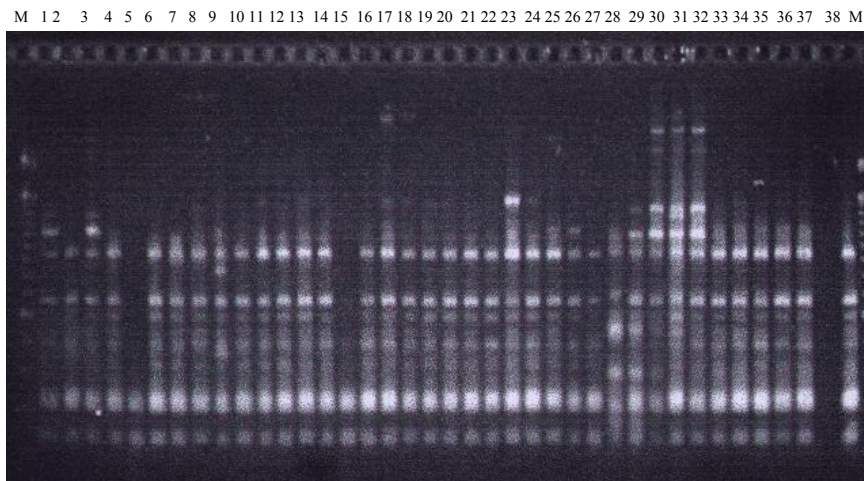
Para testar a significância dos grupos formados no método de “Agrupamento” foi realizada AMOVA utilizando o programa *dyerlab. bio.vcu.edu* – USA.

Resultados

RAPD

Os seis *primers* utilizados geraram 108 bandas determinadas visualmente, e ao considerar os dados clínicos, verificou-se que duas bandas monomórficas, correspondiam a casos clínicos e subclínicos.

Fig. 1 - Padrão de amplificação das amostras de dna de *S. aureus*, mostrando as amostras de número 1 a 38 e marcadores de 100 pb



O dendrograma obtido por *UPGMA* (Figura 2), ratificou esses grupos, por apresentarem baixa similaridade em relação aos demais, além do utilizado como grupo externo. No entanto, a maioria dos agrupamentos teve um baixo valor de *bootstrap* sugerindo que, provavelmente, existissem isolados fenéticamente intermediários aos grupos.

Fig. 2 - Dendrograma mostrando a formação de árvore com dois grupos de *S. aureus*, disseminados em dez populações de bovinos leiteiros, ressaltando a alta similaridade entre alguns deles, porém com *bootstrap* muito baixos ($n = 78$)

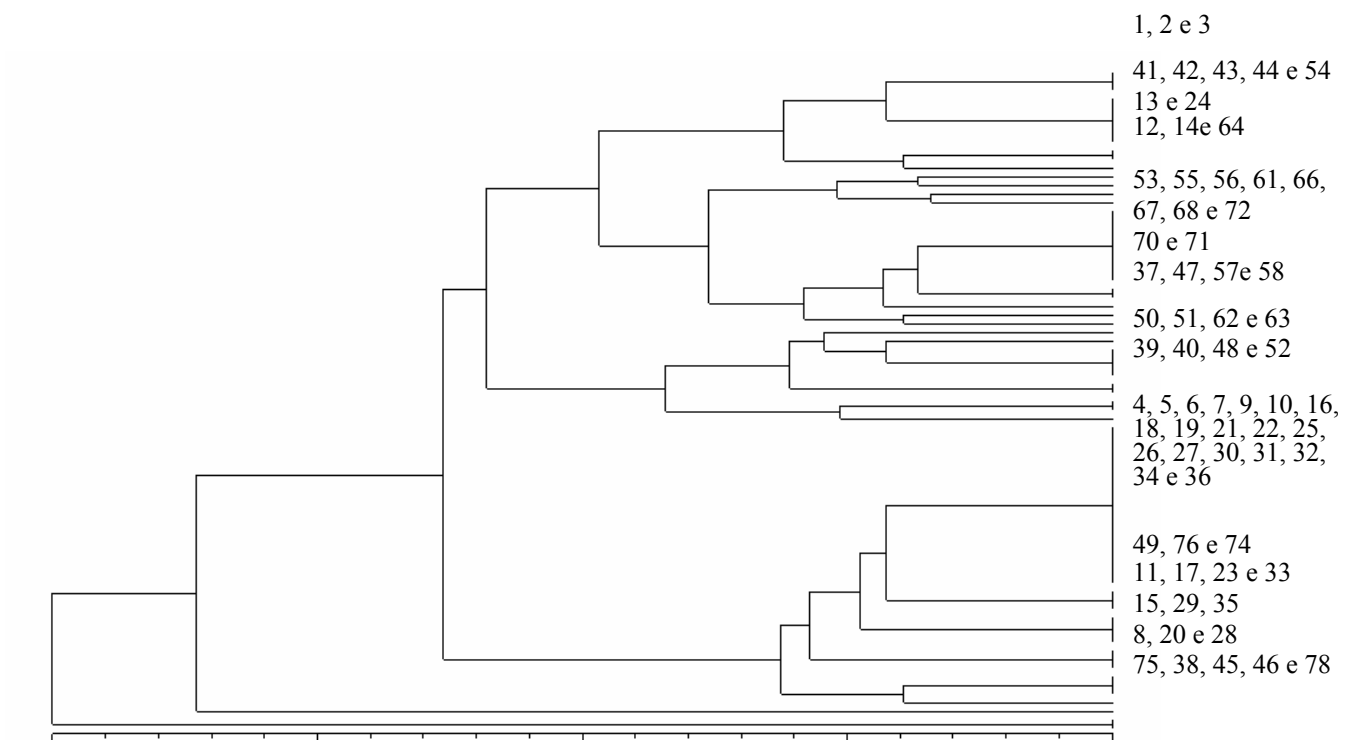
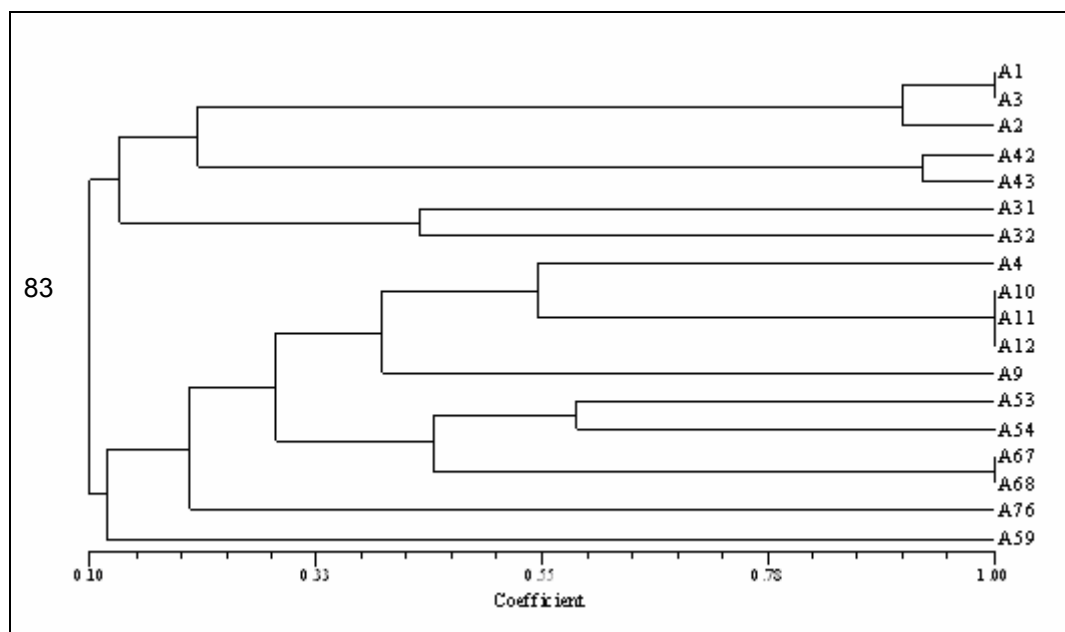


Fig. 3 - Dendrograma mostrando a formação de árvore com dois grupos de *S. aureus*, disseminados em dez populações de bovinos leiteiros, ressaltando a baixa similaridade entre amostras de casos subclínicos e de fase aguda, porém com *bootstrap* muito altos, e significância de $p < 0,001$ ($n = 18$)



Discussão

Neste trabalho a técnica de *RAPD* foi usada para investigar o polimorfismo genético de 75 amostras de *S. aureus*, proveniente de mastite bovina.

A análise com marcadores *RAPD* utilizando o algoritmo *UPGMA* (SNEAT e SOKAL, 1973; NEI e TAKEZAKI 1994; POLLOCK e GOLDENSTEIN, 1995), a análise *bootstrap* e o teste de significância *AMOVA* (FELSENSTEIN 1986 e 1993), sugerem a distinção entre dois grupos formados, pois a variância observada entre eles, foi ($p < 0,001$). Observaram-se grupos associados fortemente aos quadros subclínicos e de fase aguda da doença, e a idade do animal. Verificaram-se nessa análise, associações entre isolados originários da mesma população, subgrupos estes com similaridade de 100% (Figura 2).

As análises de isolados com maior confiança, sustentou essa associação, visto que os subgrupos com altos valores de confiabilidade (*bootstrap*) (Figura 3), agruparam indivíduos originários dos mesmos rebanhos, apesar de não formarem grupos distintos, em congruência com o *UPGMA* (SANDERSON e WOJCIECHOWSKI, 2000). Tais resultados concordaram com a literatura (HARTSTEIN et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990;

PREVOST et al., 1991; KOSTEMAN et al., 1992; KAPUR et al., 1995, PEREIRA e SIQUEIRA-JUNIOR, 1995 e PEREIRA et al., 2002), a qual sugere que micro-habitats podem agir como fonte de infecção para animais de populações locais e que existe uma relação regional entre os diversos isolados relacionados geneticamente. A grande variabilidade genética encontrada entre os isolados estudados, sugere uma associação entre genótipo e os rebanhos e forma de apresentação da doença. As análises realizadas, reforçam os dados obtidos por *UPGMA* (Figuras 2 e 3), pois sugeriu que as linhagens 1, 2, 3, 42 e 43 eram muito diferentes das demais, agrupando-se, à parte. Portanto, a *RAPD*, constitui-se em valiosa técnica, aliada aos estudos de significância dos seus dados, para traçar a origem de infecções estafilocócicas do úbere bovino, e estudar-se sua epidemiologia molecular. O presente trabalho sugere a realização de estudos futuros para comparar essa variabilidade genética à resistência das linhagens, ao contrário do relatado por PEREIRA E SIQUEIRA JÚNIOR (1995).

Referências

- BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós- Graduação em Agronomia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 58 p., 2000.
- CULLOR, J. S. Mastitis in dairy cows. Does it hinder reproductive performance? *Vet. Med.* Lenexa, n.8, p. 830-835, 1992. *Spacer pcr., J.Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 9, p. 3099-103, 2001.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: versão II. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using Bootstrap. **Evol.**, n. 39, p. 783-791, 1985.
- GONÇALVES, D.; KOZICKI, L. E. Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows, with and without placental retention and mastitis. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 34, n.6, p.371-382, 1997.
- HARTSTEIN, A. I.; MORTHLAND, V. H.; ENG, S. et al. Restriction enzymes analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *S. aureus* blood culture isolates. **J. of Clin. Microbiol.**, n. 27, p.1874-1879, 1989.
- HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Syst. Biol.**, n. 42, p. 17-48, 1993.
- KAPUR, V; SISCHO, W.M; GREEN, R. S. et al. Molecular population genetic Analyses of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **J. of Clin. Microbiol.**, n. 33, p.376-380, 1995.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; EINN, W. C. Diagnostic Microbiology, 5th Ed. **Lippincott Company**, Philadelphia, p. 539-576, 2001.

KOSTEMAN, J.R; EDLING, T.D; LIPUMA, J.J; STULL, T.L. Molecular Epidemiology of *pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain Reaction ribotyping. **J. of Clin. Microbiol.**, n. 30, p. 2004-2087, 1992.

MEYER, D. **Árvores evolutivas humanas**: Uma discussão sobre inferência filogenética. Série Monografias, n.3, 1993.

MYLLYS, V; RIDELL, J; BJÖRKROTH, J; BIESE, I; PYÖRÄLÄ, S. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Vet. Microbiol.**, n. 51, p. 245-251, 1997.

NEI, M.; TAKEZAKI, N.; SITNIKOVA, T. Assessing molecular phylogenies. **Sci.**, n. 267, p. 253-255, 1995.

PEREIRA, M. S. V; LEAL, N. C.; LEAL, T. C. A.; SOBREIRA, M; ALMEIDA, M. P.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. **Lett. in Appl. Microbiol.**, n. 35, p. 32-36, 2002.

PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JR. Antimicrobial drug resistance in *S. aureus* Isolated from cattle in Brazil. **Lett. in Appl. Microbiol.**, n. 20, p. 391-395, 1995.

POLLOCK, D. D.; GOLDSTEIN, D. B. A comparison of two methods for Constructing evolutionary distances from a weighted contribution of transition And transversion differences. **Mol. Biol. Evol.**, n. 12, p. 713-717, 1995.

PREVOST, G.; POTTECHER, B.; DALHET, M. et al. Pulsed-field gel Electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a intensive care unit. **J. of Hosp. Infect.**, n. 17, p. 255-259, 1991.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system – Version 2.1. New York, **Applied Biostatistic Inc.**, 44 p, 2000.

SANDERSON, M. J.; WOJCIECHOWSKI, M.F. Improved bootstrap confidence Limits in large scale phylogenies, with an example from neo-astragalus (Leguminosae), **Sist. Biol.** N. 49, p. 671-685, 2000.

SITNIKOVA, T.; RHZETSKI, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of hylogenetic trees. **Mol. Bio. Evol.**, n. 12, p.319-333, 1995.

SNEAT, P. H. A.; SOKAL, R. R. Numerical Taxonomy, **W.F. Freeman**, San Francisco, USA, 1973.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by binary primers are useful as gene tic markers. **Nucl. Acids Res.**, n. 18, p. 6531-6535, 1990.

Fast identification of Brazilian clones of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis based on molecular approaches.

Authors: Gonçalves, D.¹, Schuehli, G.S.⁴, Vicente, V.A.², Gabriel, J.E.³, Faoro, H.⁵.

Abstract

Aims: Investigate genetic polymorphism among two strains of *Staphylococcus aureus* causing bovine sub clinical and in acute phase mastitis and development of a molecular marker for fast detection of each strain.

Methods and Results: RAPD genomic DNA fragments of *Staph. aureus* corresponding to sub clinical bovine mastitis strain and acute phase mastitis strain were submitted to insertion in pGEMTM vector and cloned by TF 10 clones of *Escherichia coli*. AmpliSeq reactions were submit to automated sequencing on an ABI 377 (Applied Biosystems) showing significant differences between the DNA isolates and permit design PCR markers.

Conclusions, and Significance and impact of the Study: Generated markers will allow the precocious diagnosis of sub clinical mastitis in cows and its flocks by means of PCR of milk tank. In the other hand will identify bacteria more aggressive and more resistant.

1. Processos Biotecnológicos - UFPR; 2. Depto. de Patologia Básica - UFPR; 3. Lab. de Genômica - PUCPR; 4. Depto. de Zoologia – UFPR; 5. Depto. de Bioquímica –UFPR.

Correspondent author: Dicezar Gonçalves

Fone: 55 41 32 56 93 61 – Fax 55 41 32 99 43 63

e-mail adress: Dicezar.zmv@uol.com.br

Key words: *Staphylococcus aureus*; genetic polymorphism; bovine mastitis; sequence.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus causing bovine mastitis have a great economic importance (Myllys *et al.*, 1997). According Cullor (1992), the disease exist in 15% of cows herds in the world with a 50% of prevalence (Gonçalves and Kozicki, 1997). Several biochemical and molecular methods are used in the investigation of *Staph. aureus* in human and bovine infections (Hartstein *et al.*, 1989., Williams *et al.*, 1990, Prevost *et al.*, 1991, Kosteman *et al.*, 1992 and Kapur *et al.*, 1995). In the present study we use a sequence of the methods: RAPD, cloning, PCR, sequencing and statistical analysis, to observe the genetic polymorphism, diversity and some other genetic polymorphism allowing the identification of strains causing different disease forms in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

A total of 75 clinical isolates of *Staph. aureus* were collected of the bovine udder between 240 different infections. In accordance with Gonçalves and Kozicki (1997) approximately one third part of these infections is attributed to the bacterium. The used materials and methods in work had allowed to isolate with security only microorganism in study (Koneman, 2001) being extracted genomic DNA of quality, for analysis of molecular systematic, and has left of its genome could identify it.

Bacterial samples and DNA isolation

Samples had been stored in salty agar manitol in temperature of 4 °C and had transferred to broth BHI 37°C for 43 hours, for attainment of the samples of genomic DNA.

Genomic DNA was isolated by CTAB (cetyltrimetilamonium bromide) (Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle and Doyle, 1987; Sumer, 2003; Daneshwar, 2004).

Genetically variability and polymorphism analysis

Study by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) using primers: OPJ 5 (5'CTCCATGGGG 3'); OPJ 6 (5' TCGTTCCGCA 3') (Myllys *et al.*, 1997) Primer 786 (5' GCGATCCCCA 3'); Primer 797 (5' AGCGTCACTG 3') and Primer 798 (5' TGACCCGCC 3') (Pereira *et al.*, 2002) and OPA 2 (5' TGCCGAGCTG 3') (Spolidorio *et al.*, 2003).

Reactions were according to Pereira *et al.* (2002). A final volume of 14,9 µL contend: 20ng de purified DNA and 1.0 of *Taq* DNA polymerase, 3 mM 1⁻¹ MgCl₂, 50 mM 1⁻¹

KCl, 10 mM l^{-1} Tris-HCl (pH 8,8), 200 μ M de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) and 0,5 mM of primer, had been submitted to 45 cycles of 30 s in 94°C, 30 s in 36°C e 1 min 30 s in 72°C, 3 min of initial denaturation in 94 °C e 5 min of final extension in 72°C, in termocyclator PT100,(Perkin Elmer).

The amplifications products were submitted to electrophoresis in agarose gel 1.6%, in TBE buffer at 114 mV and the size of DNA fragments was determined.

Two reference control and one out-group were also included. The polymorphism analysis was verified under phenetical methods applying UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Meyer, 1995) using the similarity coefficient of Jaccard in the program NTSYS, version 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 2000). The support values of the groups were computed by bootstrap (Felsenstein, 1986 and 1993), obtaining two groups (Hillis *et al*, 1993 and Sitnikova *et al* 1995).

Isolation of the genomic DNA fragments

The polymorphic and monomorphic bands, corresponding to both: sub clinical and acute phase of disease were cut and purified by the Purelink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen™ Life Technologies).

Fragment Cloning

Fragments were prepared according pGEM® and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Corporation), and cloning in the *Escherichia coli* TF 10 (Soares *et al*, 2001).

For a clearer visualization of the possible insertion points in the plasmids, they were submitted to an electrophoresis in agarose gel, 1.0% after restriction witch EcoRI enzyme (Invitrogen™ Life Technologies),

AmpliSeq Reactions

All reactions were prepared witch the Kit DYEnamic™ ET dye terminator MegaBACE™ (Amersham Biosciences). Primers used in reactions, were synthesized and purified by (Invitrogen™ Life Technologies), according Murphy et al. (2005): pUC/M 13 Forward Sequencing Primer: 5' CGTTGTAAAACGACGGCAAGT 3' and pUC/M13 Reverse Sequencing Primer: 5' TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'. Reactions consist of 3.0 μ L of mix ET dye terminator; two primers in equal concentration 5-500 mol l^{-1} ; dNTPS in a final concentration of 125 mol l^{-1} ; 50-500 mg l^{-1} of DNA in an final vol 7.5 μ L. All reactions were cycled at 95°C for 2 min followed by 35 cycles at 95°C for 20 s and 60°C for 2 min. PCR product was purified by ammonium acetate 7.5 mol l^{-1} and

precipitated by ethanol in successive centrifugations (Murphy et al., 2005). After liophilization in SpeedVac at 60°C for 40 min samples were sequenced by electrophoresis in an ABI 377 (Applied Biosystems).

Sequences edition

Reverse and forward sequences files were assembled and edited using the Staden Package (Staden *et al.* 1998). The plasmid positions and original primers sequences were trimmed.

Markers primer design

The new primers sets for identification of both strains under normal PCR were analyzed with PerlPrimer (Marshall, 2004). The primers set were chosen analyzing their size, GC content, hairpin formation, self-priming and annealing temperature. To prevent mispairing the primer were designed to include more than 24 bases.

Markers evaluation and protocol development

A multiplex PCR (Vannuffel *et al.*, 1995 and Pinekter *et.al.*, 2001) was mounted in accordance with the T_m of annealing of each primer with a final volume of 25 µL. The reactions was composed of 2.5 µL of PCR Buffer minus; final Mg concentration, 1X; 1.0 µL, dNTP's concentration of 0.2 mM; primers mix concentration 0.5 µM, 4.0µL; 0.5 µL, *Taq* 2.5 units; 0.5 µL, genomic DNA concentration 50 ng and 17.5 µL of Milli Q water. The amplifications were in 94°C for 45s for denaturation and 60°C for annealing and extension, during 2 min in a total of 35 cycles. The multiplex PCR products had been examined in 1% agarose gel stained for etidium bromide.

RESULTS

Bacterial samples and DNA isolation

In this work, was bacterial isolation corresponding to 31.25% of the total cases (75/240) (Koneman *et al.*, 2001). Extraction of genomic DNA (Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle and Doyle, 1987; Sumer, 2003., Daneshwar, 2004) shows that CTAB method is very effective to several molecular biological procedures. In the other hand the data randomization combining to phenetical analysis (Meyer, 1995 and Rohlf, 2000, Felsenstein, 1986 and 1993), showing two groups.

Isolation of the genomic DNA fragments and plasmids insert

Purelink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen™ Life Technologies) gets 80% of DNA fragments free of others substances. This fragments were insert and cloning in *Escherichia coli* TF 10 clones (Soares *et al.*, 2001), according pGEM® and pGEM®-T Easy Vector

Systems (Promega Corporation), with optimal results but small number of colonies with inserts due to the size of templates. Both groups showed DNA monomorphic bands when compared by 1Kbp marker (fig. 1).

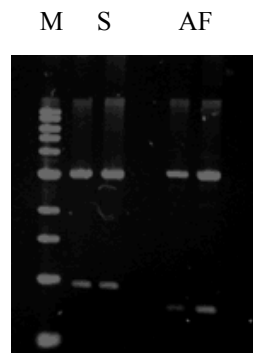


Fig. 1 Agarose gel 1%, showing 1 Kbp marker and Subclinic samples (S) and acute phase sample (AF). Plasmids pGEM[®]-T Easy Vector, was previously digested by de Eco R I enzyme. Plasmids were 3015 bp and the inserts 950 - 800 bp (n=2).

AmpliSeq Reactions

Reactions compounds amplified the sequences effectively. Primers bound in Plasmid pGEM[®]-T Easy Vector sites according the manufacturer. Vector circle map and the reference sequence points was observed (T7 RNA polymerase transcription initiation site, SP6 RNA polymerase promoter: 139-158, SP6 RNA polymerase transcription initiation site: 141, puc/M13 Reverse Sequencing Primer binding site: 176-197 and pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site: 2949-2972).

Sequences edition

It allowed to draw primers to sub clinic samples (686 edited bases (16-702): Forward: 5' CCAAACCTTGGTAATTGAAGGAC 3' (Tm: 59.78°C) and Reverse: 5'

ACAATGTTGAAACTCAGACGTC 3' (Tm: 61, 41°C), both with 22 bases and

acute phase sample (393 edited bases (36-429): Forward: 5'

TTGATCTGGATACGATGGAAAGG 3' (24 bases and Tm: 62.48°C) and Reverse: 5'

TTAAGTATAAGCTTCACGCCGAG 3' (23 bases and Tm: 62.72 °C).

Primers were synthesized by Invitrogen[™], to an Multiplex PCR (Vannuffel *et al*, 1995; Pinекter *et al*, 2001).

Multiplex PCR

Multiplex PCR was composed of genomic DNA: sub clinic sample; acute phase sample; samples proceeding of new illness cases; milk samples harvested in milk-tank (Kim *et al*, 2001); ancestry's reference (ATCC 25923 e ATCC 6538); *Strep.mutans* and *E.coli*. Gotten results can be visualized in fig. 2.

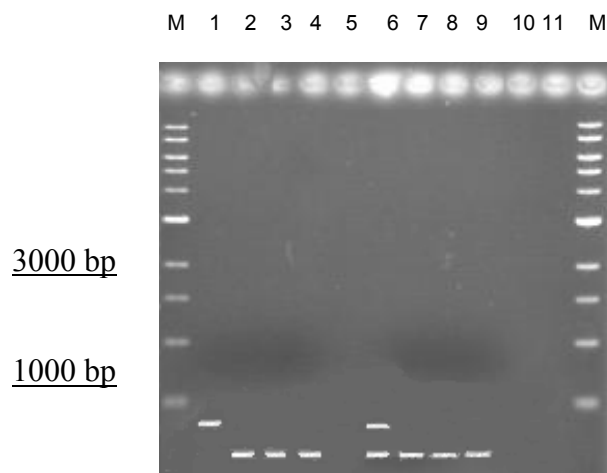


Fig. 2 Multiplex PCR results in 1% agarose gel showing amplifications of genomic DNA. Lanes: 1=sub clinic; 2=acute phase; 3 and 4= samples proceeding of new illness cases; 5=empty lane; 6 and 7=milk tank; 8=ATCC 25923; 9=ATCC 6538; 10=*Strep. mutans*; 11=*E.coli*.

Results show amplification of *Staph. aureus* genomic DNA samples ahead of primers synthesized. *Strep. mutans* and *E. coli* genomic DNA samples had not amplified, showing efficiency of reaction for these tested samples fact ratified in the lane 6 (bands suggesting presence of both *Staph. aureus* groups in milk-tank (Kim *et al*,(2001).

DISCUSSION

In this report we demonstrated methods to effectively combine genomic DNA isolation (Myllys *et al*, 1997 and Pereira *et al*, 2002), studies of polymorphisms (Felsenstein, 1986 and 1993; Hillis *et al*, 1993 and Sitnikova *et al* 1995) and standard sequencing reagents (Soares *et al*,2001). The genomic DNA quality is fundamental to precede these techniques. Initially DNA extraction by CTAB a common practice to vegetal and fungi

(Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle and Doyle, 1987; Sumer, 2003; Daneshwar, 2004) was very efficient as use of enzymes (Pereira *et al.*, 2002), but the animal data cases were equally important in these discussion. The existence of sub clinic and in acute phase cases shows that some isolates were more virulent than others. This fact are according with observations of randomized amplifications and carry out an equal existence of two bacterial groups supported for UPGMA method (Meyer, 1995) using the similarity coefficient of Jaccard (Rohlf, 2000). These bacterial groups were equals considering morphological and biochemical aspects, but the molecular nucleotides structure was different.

The random isolation of characteristic monomorphic bands permit show important differences. These templates with 800-950 bp and the employment of pGEM[®] - T Easy Vector in ligation and transformation permit cloning these differences. Sequence reactions were useful (Soares *et al.*, 2001), and permits obtain two different sequences, characterizing the samples (Charbonnier *et al.*, 2005).

The study of these sequences in BLAST (GenBank NHI, 2004) showed *Staph. aureus* causing acute phase mastitis possess equal gene sequence of protein polysialic acid O-acetil-tranferase (Dezso *et al.*, 2001 and 2005) and this fact clarified the bigger bacterial aggressiveness in mastitis acute phase. Polysialic acid O-acetil-tranferase is an enzyme related to bacterial antibiotics resistance, related to microorganism membrane radicals responsible for complement setting and related to capsules architecture conferring bigger resistance for these isolates. (Koneman *et al.*, 2001 and Dezso *et al.*, 2001 and 2005).

Although, “*a priori*” the protein is present in others prokaryotes. However, recent studies had disclosed its presence in cloranfenicol-Resistant and Methicillin-Resistant *Staph. aureus* (Cort *et al.*, 2003). More recently it was isolated of RF 122 *Staph. aureus* genomic DNA sample (GenBank- gi|494830019|ref|YP- 040243 e gi|82750467|ref|YP-416208) and its nucleotide structure (Chen *et al.*, 2003) is similar to sequence gotten in this work.

However, the precocious diagnosis of illness in very young matrices is very important. Sequences gotten in this work allow such fact. The multiplex PCR mounted for this diagnosis, revealing efficient to accuse bacterial presence in milk.

Additionally, clinical data showed positive relationship with the age and number of parturitions. The reasons of this fact need futures studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Mr Humberto França Madeira (PUCPR), Mr Emanuel M. Souza and Mr Valter Baura (Dep. Bioquímica-UFPR), for their technical assistance. They thank the Brazilian University PUCPR, for financial support.

REFERENCES

- Cullor, J.S. (1992) Mastitis in dairy cows. Does it hinder reproductive performance? *Vet. Med.*, 8, 830-835.
- Charbonner, Y., Gettler, B., Françós, P., Bento, M., Renzon, A., Pierre, V., Schlegel, W., Schrenzel, J (2005) A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genotyping, deletion mapping and gene expression analysis on *Staphylococcus aureus*. *Genomics*, 6, 95, 1-12.
- Chen, J., Anderson, J.B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N.D., Geer, L.Y., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Lanczynski, C.J., Lebert, C.A., Lu, C., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Marchler, G.H., Mazumder, R., Nikolskaya, N., Rao, B.S., Panchenko, A.R., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song, J.S., Thiessen, P., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Bryant, S.H. (2003) MMDB: Entrez's 3D-structure database. *Nucleic. Acids. Res.*, 31, 1, 474-477.
- Cort, J.R. Montelione, G.T., Kenedy, M.A. (2003) Nmr Solution Structure Of A Gcn5-like Putative N-Acetyltransferase From *Staphylococcus aureus*. Northeast Structural Genomics Consortium, Target Zr31, 2003/10/9.
- Daneshwar, P. and Sher-Ullah, S.J. (2004) Genomic Extraction From *Victoria amazonica*. *Plant Molecular Biol Rep*, 22, 195-196.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biol Rep.*, 1, 19-21.
- Deszo, E.L., Steenbergen, S.M., Freedberg, D.I., Vimr, E.R. (2005) *Escherichia coli* K1 polysialic acid- O-acetyltransferase gene, neuO, and the mechanism of capsule form variation involving a mobile contingency locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 15, 5564-5569.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin*, 19, 11-15.

Felsenstein, J. (1986 – 1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. DNAPARS - DNA Parsimony Program. Seattle Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington.

Genbank NHI. (2004). [International Nucleotide Sequence Database Collaboration. *Nucleic Acids Research*, 32\(1\): 23-26.](#)

Gonçalves, D. and Kozicki, L .E. (1997) Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows, with and without placental retention and mastitis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 34, 6, 371-382.

Hall, T.A. BioEdit 4.8. Raleigh (1997-2001). 1 arquivo (11,5M); Disponiible in <
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. Access July 2006.

Hartstein, A.I., Morthland, V.H. and Eng,S. (1989) Restriction enzymes analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *S. aureus* blood culture isolates. *J Clin Microbial*, 27, 1874-1879.

Haubold, B., Perstorff, N., Moller, F., Wiehe, T. (2005) Genome comparison without alignment using shortest unique substrings. *Bioinform*, 6,123, 1-11

Hillis, D.M and Bull, J.J (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42, 17-48.

Kapur, V., Sischo, W.M. and Green, R.S. (1995) Molecular population genetic Analyses of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol*, 33,376-380.

Kim, C.H., Khan, M., Morin, D.E., Hurley, W.L., Tripathy, M., Kehrli Jr, M., Oluocht, A.O., Kakoma, I (2001) Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc Gene in the milk. *J. Dairy Sci.*, 84, 74-83

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Wn, W.C. (2001) In Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas Colorido. 5. ed. MEDSI, 11-16

Kosteman, J.R; Edling, T.D., LipumaI, J.J. and Stull, T.L. (1992). Molecular Epidemiology of *pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J Clin Microbiol*, 30, 2004-2087.

Marshall, O.J. (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer designs for standard, bisulphate and real-time PCR. *Bioinformatics Advance Access published on October 12, 2004*, DOI 10.1093/bioinformatics/bth254.

Bioinformatics 20: 2471-2472.

- Murphy, K.M., Berg, K.D. and Ehleman, J.R. (2005) Sequencing of Genomic DNA by Combined Amplification and Cycle Sequencing reaction. *Clin Chem*, 51, 1, 35-39.
- Myllys, V., Riddell, J., Bjorkroth, J., Biese, I. and Pyorala, S. (1997) Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet Microbiol*, 51, 245-251.
- Pereira, M.S.V., Leal, N.C., Leal, T.C.A., Sobreira, M., Almeida, A.M.P., Siqueira-Júnior, J.P. and Campos-Tadaki, G.M. (2002) Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. *Lett App Microbiol*, 35, 32-36.
- Pinekter, P., Mansell, P.D., Browning, G.F (2001) Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal Causes of Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci.*, 84, 1140-11248.
- Prevost, G., Pottecher, B. and Dalhet, M. (1991) Pulsed-field gel Electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicilin- Resistant *Staphylococcus aureus* in a intensive care unit. *J Hosp Infect*, 17, 255-259.
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system – Version 2.1. New York, Applied Biostatistics Inc., 44 p.
- Sitnikova, T., Rhzetski, A. and Nei, M. (1995). Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. *Mol. Bio.evol.*, 12, 319-333.
- Soares, M.J.S., Teixeira, L.A., Nunes, M.R., Carvalho, M.C.S., Ferreira-Carvalho, B.T. and Figueiredo, A.M.S. (2001) Analysis of different molecular methods for typing methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. *J. Med Microbiol*, 50, 732-742.
- Spolidorio, D.M.P., Hofling, J.F., Pizzolito, A. C., Rosa, E. A.; Negrini, T. C.; Spolidorio, L. C. (2003) Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. *Braz. J. Microbiol.*, 34(3):213-217.
- Staden, R., Beal. KF, Bonfield, JK (1998): The Staden Package. In *Computer Methods in Molecular Biology. Volume 132*. Edited by: Misener S, Krawetz S. Totowa, NJ 07512, the Humana Press Inc.; 115 -1130.
- Sumer et al. (2003) Isolation of DNA for RAPD Analysis from Dry Leaf Material of Some *Hesperis L.* Specimens. *Plant Molecular Biol Rep.*, 21, 461-462.
- Swofford, D.L. (1998) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods) – Version 4, Sunderland, Massachusetts.

Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedne, H., Vandercam, B., Delmel, M., Wanters, G., Gala, J.L. (1995) Specific Detection of Methicilin-Resistant *Staphylococcus Species* by Multiplex PCR.. *J. Clin. Microbiol.* 33, 11, 2864-2867.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R. and Livak, K.J. (1990) DNA polymorphisms amplified by binary primers are useful as genetic markers. *Nucl Ac Res*, 18, 6531-6535.



EPAMIG - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS

Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes

DECLARAÇÃO DE ACEITE DE TRABALHO

Declaramos para todos os fins que se fizerem necessários e de direito, que recebemos os seguintes trabalhos para publicação na Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Centro Tecnológico da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, intitulados:

1) Isolamento, identificação e extração de DNA Genômico de *Staphylococcus aureus* de mastites clínicas e subclínicas bovina, pelo método do CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio).

Autores: Gonçalves, D.; Higuti, I. H.; Vicente, V. A.; Bittencourt, J.V.M , Neiva, I.F, Andersen, E. e Gonçalves, C.H.M.

2) Análise molecular por meio de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) em populações de *Staphylococcus aureus*, causadoras de infecções intramamárias em bovinos.

Autores: Gonçalves, D.; Vicente, V. A., 2; Higuti, I. H.; Bittencourt, J. V. M., Neiva, I. F., Pie, M.; Andersen, E. e Gonçalves, C. H. M.

Os referidos trabalhos, encaminhado para análise pela Comissão Editorial da Revista do ILCT foram aprovados, e serão enviados para fase de editoração, com data de publicação prevista para o número 353, referente aos meses de novembro/dezembro de 2006 - Volume 61, podendo ainda haver uma ou outra mudança em relação aos números da Revista do ILCT.

Juiz de Fora, 29 de Agosto de 2006

Luiza Carvalhaes Albuquerque

Editora Responsável - Revista do I.L.C.T.

Coordenadora de Transferência e Difusão de Tecnologia do CT/ILCT

APÉNDICE

APÊNDICE A - PLASMÍDIO *pGEM* (Promega Corporation)

FIGURA 1 - MAPA DE UM PLASMÍDIO *pGEM*, COM 3.015 PARES DE BASE, ONDE SE VÊ PONTOS DE RESTRIÇÃO DA *Eco* RI (SETAS), O PAR DE TIMINAS, LOCAL DE INSERÇÃO DOS ISERTOS, E O *lac* Z. A LOCALIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À AMPICILINA, TAMBÉM ESTÁ REPRESENTADO

