

BRUNO GARCIA BOTARO

Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real

São Paulo

2012

BRUNO GARCIA BOTARO

Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2541
FMVZ

Botaro, Bruno Garcia

Deteção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real / Bruno Garcia Botaro. – 2012.
96 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberto Benites.

1. Mastite subclínica contagiosa. 2. PCR quantitativo. 3. Composição do leite. 4. Produção de leite. 5. Amostra do quarto mamário I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação e contagem de agentes causadores de mastite bovina pela reação em cadeia da polimerase", protocolado sob o nº1332/2008, utilizando 300 (trezentos) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum" da referida Comissão.

We certify that the Research "Identification and counting of mastitis causing agents using polymerase chain reaction", protocol number 1332/2008, utilizing 300 (three hundred) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 13 de março de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOTARO, Bruno Garcia

Título: Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____

RESUMO

BOTARO, B. G. Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real. [Detection and counting of bovine mastitis causative *Staphylococcus aureus* in milk samples by real-time polymerase chain reaction method]. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

Os objetivos do presente estudo foram os de verificar a validade do método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detectar e quantificar o *Staphylococcus aureus* em amostras de leite conservadas com bronopol oriundas de quartos mamários bovinos subclínicamente infectados, e de avaliar os efeitos da presença e da quantidade de células da bactéria sobre a contagem de células somáticas (CCS), a composição do leite (lactose, gordura, proteína bruta, proteína verdadeira e caseína), e a produção de leite de quartos mamários bovinos subclínicamente infectados pelo patógeno. Para a quantificação do *S. aureus* e das células somáticas bovinas por meio do qPCR, foi utilizado leite cru bovino para o preparo dos padrões como meio de diluição da inoculação seriada de células somáticas e do *S. aureus* ATCC 29213, e construídas as equações $\log_{10}UFC = 37,86 - 23,54 \log_{10}Ct_{SAU}$ e $\log_{10}CCS = 49,3 - 34,0 \log_{10}Ct_{BMCB}$, com base nos resultados obtidos pelas metodologias de referência para cada procedimento. Para testar a equivalência dessas equações aos respectivos métodos de referência, determinar a sensibilidade e especificidade analíticas e a repetibilidade do método proposto, foram coletadas amostras de leite dos quartos mamários de 60 animais de 2 rebanhos leiteiros da região de Pirassununga dos quais se determinou previamente a ocorrência de casos subclínicos de mastite por *S. aureus*. Dos quartos mamários também foram mensuradas as produções e coletadas amostras de leite para análise de composição, diagnóstico da mastite, e determinação da sensibilidade e especificidade diagnósticas do procedimento de qPCR estabelecido no estudo. Cada amostra foi submetida à análise de composição, CCS, cultura microbiológica, contagem em placas do *S. aureus*, processadas para a extração do DNA genômico bovino e do *S. aureus*, e submetida à reação de qPCR. Para análise da concordância entre os resultados obtidos pelos métodos de referência para o diagnóstico da mastite por *S. aureus* e o de qPCR foi utilizado o teste Kappa. Para avaliação da equivalência das contagens obtidas pelos métodos de referência do *S. aureus* e de células somáticas bovinas, foi utilizado o teste das diferenças de Bland-Altman. Para a identificação do efeito da infecção subclínica pelo *S. aureus* sobre a composição e produção de leite do quarto mamário afetado foi utilizada a análise da variância num delineamento em parcelas

subdivididas em faixas. Para estimar o grau de relação entre as contagens de *S. aureus*, a CCS, produção e composição do leite produzido pelo quarto mamário afetado foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. A correlação entre os resultados de contagem de células somáticas bovinas determinados pelos métodos de rotina e de qPCR para a quantificação de células somáticas apresentou coeficiente $r = - 0,978$ ($P < 0,001$). A correlação entre os resultados da contagem do *S. aureus* ATCC 29213 determinados pelos métodos de rotina e de qPCR para a quantificação do patógeno apresentou coeficiente $r = - 0,989$ ($P < 0,001$). A especificidade analítica do qPCR para a detecção do *S. aureus* em amostras de leite frente a *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, os estafilococos coagulase-negativa, e as espécies coagulase-positiva *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* foi de 100%. O método de qPCR aplicado à detecção de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 em amostras de leite é replicável e apresentou sensibilidade analítica com limite de detecção para a faixa de 10 UFC/mL à $4,2 \times 10^6$ UFC/mL. Em amostras de leite conservadas com bronopol provenientes de quartos mamários subclínicamente infectados, o *S. aureus* pôde ser detectado, mas não pôde ser quantificado pelo método de qPCR. Nessas amostras, a CCS pôde ser determinada de forma equivalente ao método de rotina. A CCS independe da contagem de *S. aureus* viáveis, mas foi observada correlação linear e negativa entre o número total de células do patógeno e a CCS. A mastite subclínica pelo *S. aureus* aumentou a CCS nos quartos mamários, mas não alterou a composição do leite. A doença diminuiu a produção de leite e de gordura dos quartos mamários anteriores acometidos pela infecção, mas não se observou efeito da interação entre o posicionamento da glândula e a infecção sobre a produção de leite. Houve correlação entre as concentrações de lactose ($r = 0,42$; $P = 0,0051$), de gordura ($r = 0,46$; $P = 0,0016$), de produção de gordura ($r = 0,49$; $P = 0,001$), e de leite com produção ajustada para o teor de 3,5% de gordura ($r = 0,41$; $P = 0,006$), e o número de *S. aureus* presentes na amostra de leite.

Palavras-chave: Mastite subclínica contagiosa. PCR quantitativo. Composição do leite. Produção de leite. Amostra do quarto mamário.

ABSTRACT

BOTARO, B. G. **Detection and counting of bovine mastitis causative *Staphylococcus aureus* in milk samples by real-time polymerase chain reaction method.** [Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real]. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

The objectives of this study were to verify the validity of the real-time polymerase chain reaction (qPCR) to detect and quantify *Staphylococcus aureus* in bronopol-preserved milk samples from subclinically infected mammary quarters, and to assess the effects of the presence and amount of the pathogen on the somatic cell count (SCC), the composition of milk and milk yield of bovine mammary quarters subclinically infected by the pathogen. In order to quantify *S. aureus* and bovine somatic cells through qPCR, raw bovine milk was used as a means of serial inoculation media of somatic cells and *S. aureus* ATCC 29213. From that, equations based on the reference methods for each procedure were built, $\log_{10}\text{UFC} = 37,86 - 23,54 \log_{10}\text{Ct}_{\text{SAU}}$ and $\log_{10}\text{CCS} = 49,3 - 34,0 \log_{10}\text{Ct}_{\text{BMCB}}$, respectively. To test their equivalence with the reference methods, determine the analytical sensitivity and specificity, and repeatability of the proposed method, milk was sampled from quarters of 60 animals from two dairy herds in Pirassununga, where subclinical *S. aureus* mastitis cases had been previously diagnosed. Also, quarter milk yield had been measured and samples collected for milk composition analysis, diagnosis of mastitis, sensitivity and specificity of the procedure established in the study had been determined. Each sample was subjected to composition analysis, SCC, microbiological culture, plate counting of *S. aureus*, DNA extraction, and subjected to qPCR reaction. Agreement between results from reference methods and qPCR for the diagnosis of mastitis by *S. aureus* was assessed by Kappa test. Equivalence between *S. aureus*, SCC scores obtained by reference and qPCR was assessed with Bland-Altman procedures. The effect of *S. aureus* subclinical infection on milk composition and milk yield of affected quarters was measured using a strip plot design. To estimate the degree of relationship between the counts of *S. aureus*, SCC, yield and composition of the milk from affected quarters was assessed by the Pearson Correlation. Correlation between SCC determined by routine methods and qPCR was $r = - 0.978$ ($P < 0.001$). Correlation between *S. aureus* ATCC 29213 determined by routine methods and qPCR was $r = - 0.989$ ($P < 0.001$). Analytical specificity of qPCR to detect *S. aureus* in milk samples against *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*

dysgalactiae, *Streptococcus uberis*, coagulase-negative staphylococci and coagulase-positive species, *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius* was 100%. The use of the qPCR to detect *S. aureus* ATCC 29213 in milk samples is replicable. Analytical sensitivity detection limit of the method ranged from 10 CFU/mL to 4.2×10^6 CFU/mL. *S. aureus* could be detected, but not quantified by qPCR in bronopol-conserved milk samples from subclinically infected quarters. In these samples, SCC could be determined by qPCR as it had been done by routine method. SCC was not dependent on *S. aureus* viable cells, but a negative linear correlation between the total number of cells of the pathogen and SCC was observed. *S. aureus* subclinical mastitis increased quarters SCC, but did not change milk composition. The disease decreased quarter milk and fat yield, but no interaction effect was observed between the gland positioning and *S. aureus* subclinical infection on milk production. Correlations between lactose ($r = 0.42$, $P = 0.0051$), fat ($r = 0.46$, $P = 0.0016$), fat yield ($r = 0.49$, $P = 0.001$), and 3.5% fat adjusted milk yield ($r = 0.41$, $P = 0.006$), and the number of *S. aureus* present in the milk sample were observed.

Keywords: Contagious subclinical mastitis. Quantitative PCR. Milk composition. Milk yield. Quarter milk sample.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	MASTITE CONTAGIOSA BOVINA E STAPHYLOCOCCUS AUREUS	13
2.1.1	Epidemiologia da mastite por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.1.2	Mastite por <i>S. aureus</i> e CCS	17
2.1.3	Mastite por <i>S. aureus</i> e alterações da composição do leite	18
2.1.4	Contagem de <i>S. aureus</i> durante a infecção intramamária	19
2.1.5	Mastite por <i>S. aureus</i> e o impacto sobre a produção de leite pelo quarto mamário afetado	19
2.1.6	Diagnóstico da mastite por <i>S. aureus</i> por meio de microbiologia convencional	19
2.1.7	Diagnóstico da mastite por <i>S. aureus</i> por meio de metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase	21
2.2	PCR EM TEMPO REAL NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	22
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE QUANTIFICAÇÃO	25
4.1.1	Preparo dos padrões para quantificação	25
4.1.2	Metodologias para a construção das curvas de quantificação	27
4.1.2.1	Metodologias para detecção e quantificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Método de qPCR)	29
4.1.3	Construção das curvas padrão para as quantificações	31
4.2	COLETA DE AMOSTRAS EM FAZENDAS COMERCIAIS	32
4.2.1	Seleção dos rebanhos e animais para coleta	32
4.2.2	Coleta e preparo das amostras para análise	33
4.3	METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO DO LEITE	33
4.3.1	Determinação dos teores de lactose e gordura	33

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

