

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO FENOGENOTÍPICA DOS
FATORES DE VIRULÊNCIA EM *STAPHYLOCOCCUS*
SPP. ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

Viviane Figueira Marques

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO FENOGENOTÍPICA DOS
FATORES DE VIRULÊNCIA EM *STAPHYLOCOCCUS*
SPP. ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

Viviane Figueira Marques

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

636.2089819

M357c

T

Marques, Viviane Figueira, 1986-
Caracterização fenogenotípica dos
fatores de virulência em Staphylococcus
Spp. Isolados de mastite bovina / Viviane
Figueira Marques - 2012.
64 f.: il.

Orientador: Miliane Figueira Marques.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 46-54.

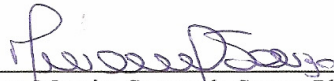
1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Mastite
- Teses. 3. Estafilococos - Teses. I.
Marques, Miliane Figueira, 1970-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

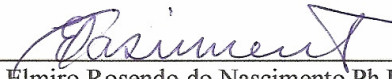
VIVIANE FIGUEIRA MARQUES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

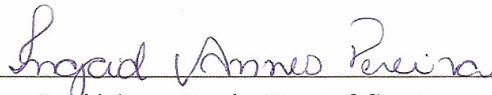
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 06/03/2012.



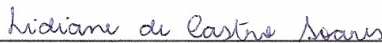
Miliane Moreira Soares de Souza. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)



Elmiro Rosendo do Nascimento Ph.D. UFF



Ingrid Annes Pereira Dsc. FIOCRUZ



Lidiane de Castro Soares Dsc. USS

**Dedico este trabalho a
minha família e aos
amigos que sempre
tiveram palavras de
conforto e incentivo
quando eu precisei.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus presente em todos os momentos da minha vida, que me dá forças para vencer e perseverança para não desistir em meio às dificuldades.

À minha família, meus pais, irmãos e ao meu noivo, por toda a compreensão e carinho que dedicam a mim. Em especial, a minha mãe Cristina M^a F. Marques que me apóia de forma incondicional e ao meu irmão Vinícius G. Marques que foi presença em vários momentos, compartilhando noites em claro e me auxiliando com as formatações deste trabalho. Muito obrigada, sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

À minha orientadora, Miliane Moreira Soares de Souza, que mesmo em meio às dificuldades, foi presente, discutiu cada resultado, se dedicou e apoiou nos momentos mais importantes, tornando possível a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!!!

À minha co-orientadora, Shana de Mattos de Oliveira Coelho, que contribuiu de maneira ativa, com muita garra e dedicação. Muito obrigada, por todas as sugestões e direcionamentos ao longo do desenvolvimento deste projeto.

À professora Irene da Silva Coelho, por todo auxílio dedicado as etapas de extração de DNA e aos PCRs realizados durante este projeto. Obrigada!!

À todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ pela presença, amizade, compreensão e incentivo em todos os momentos. Em especial aos estagiários Greici Bronzato, Anna Rojas e Felipe Dubenczuk que foram presença em etapas muito importantes deste projeto. Obrigada!

Às amigas do LABACVET Tatiane Abreu de Alencar, Elaine Liporage, Dayanne Mello e Bianca Soares que ajudaram e compartilharam comigo momentos cruciais na elaboração deste projeto. Foram mais que colegas de trabalho, foram amigas nos momentos de dificuldade. Obrigada!

Ao Curso de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ, e aos funcionários, pelo apoio em materiais e pelas condições que recebemos para trabalhar e estudar. Em especial ao professor e coordenador José Luis Fernando Luque Alejos sempre disposto a nos ouvir e auxiliar no que precisamos. Obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida. Obrigada!

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por me proporcionar tantos momentos maravilhosos, pelos amigos que fiz e pela excelente formação que recebi.

BIOGRAFIA

Viviane Figueira Marques, filha de Jorge Carlos Marques e Cristina Maria Figueira Marques, nascida em 18 de dezembro de 1986, no bairro de Campo Grande, município Rio do Janeiro-RJ.

Cursou o Ensino Médio e técnico na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, na Fundação Oswaldo Cruz, no município do Rio de Janeiro. Concluiu o curso em dezembro de 2004, recebendo o diploma de Técnico em Laboratório de BIODIAGNÓSTICO em Saúde.

Em julho de 2005 ingressou no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, diplomando-se em julho de 2009 na modalidade de Licenciatura e em janeiro de 2010 no Bacharelado.

Foi aluna de iniciação científica do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro durante o período de agosto de 2008 a fevereiro de 2010, sob orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Período em que foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq).

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível mestrado, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em 2010, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a. Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2011 a fevereiro de 2012.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob orientação da Professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza, em 2011, com início previsto para março de 2012.

RESUMO

MARQUES, Viviane Figueira. **Caracterização fenogenotípica dos fatores de virulência em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.** 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por bactérias, dentre as quais o gênero *Staphylococcus* ocupa um papel importante. Bactérias pertencentes a este gênero são caracterizadas por expressar fatores de virulência que permitem sua persistência e disseminação no hospedeiro. O presente trabalho teve por objetivo avaliar fenogenotipicamente os fatores de virulência de isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de quadro de mastite bovina. Foram analisadas 272 amostras de leite provenientes de 8 propriedades da região Sul-Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. Após identificação, obteve-se um total de 250 *Staphylococcus* spp. Estes foram submetidos às provas fenotípicas de detecção da produção de “slime” em microplaca e em ágar vermelho congo; produção de hemolisinas e sinergismo hemolítico; produção de caseinase e DNase. Posteriormente foram submetidos à técnica de PCR para detecção dos genes de produção de cápsula (*cap5* e *cap8*), fibronectina (*fnbA*, e *fnbB*), “slime” (*icaA* e *icaD*) e hemolisinas (*hla* e *hly*). Do total avaliado, 58% (145/250) foi identificado como *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos e 42% (105/250) como *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos, destes 36,2% (38/105) foram identificados como *S. aureus*, 11,4% (12/105) como *S. intermedius* e 3,8% (4/105) como pertencentes ao *S. intermedius* genogrupo. Apenas 6,4% (16/250) dos isolados foram produtores de α -hemólise, 4,8% (12/250) de β -hemólise e, 1,6% (4/250) de α e β -hemólise. A produção de caseinase foi observada em 66,4% (166/250), e a produção de “slime” avaliada pela técnica da microplaca em 76,8% (192/250) dos isolados, respectivamente. A DNase foi detectada em ECNs (38/145) e *S. aureus* (14/38). A pouca associação entre a detecção genética de *icaA* (38/250) e *icaD* (54/250) e a produção fenotípica de “slime” (192/250), parece indicar que outros marcadores genéticos podem estar envolvidos com a expressão desta característica. Os demais genes detectados com prevalência de 4% (10/250) para *cap5* e para *cap8*, 32,8% (82/250) para *fnbA*, 4,4% (11/250) para *fnbB*, 19,2% (48/250) para *hla* e 18% (45/250) para *hly*. O perfil circulante nas propriedades foi o 1: isolado produtor de “slime” e caseinase. O gene *spaA* foi positivo em todos os *S. aureus*, apresentando amplicons de tamanhos variados, sendo o tamanho prevalente o de 300pb. A amplificação do gene *coa* apresentou nove tipos polimórficos distintos, sendo prevalente o amplicon de 600pb. O gene *agr* foi detectado em todos os *S. aureus*, com amplicon de 200pb. Foi observado que a presença ou ausência dos genes de virulência estudados não estavam relacionadas com os 6 distintos perfis eletroforéticos obtidos através da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., mastite, fatores de virulência

ABSTRACT

MARQUES, Viviane Figueira. **Characterization phenogenotypic of virulence factors of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis.** 64 p. Dissertation (Master's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Mastitis is an inflammation of one or more mammary glands caused mainly by bacteria, among which the genus *Staphylococcus* plays an important role. Bacteria belonging to this genus are known to express virulence factors which allow their persistence and spread in the host. This study aimed to evaluate the phenotypic and genotypic aspects of virulence factors in *Staphylococcus* spp. isolates from bovine mastitis. A total of 272 milk samples from 8 farms in the South-Fluminense region of Rio de Janeiro were analyzed. The samples underwent conventional bacterial identification, yielding 250 *Staphylococcus* spp. isolates. These were tested for the phenotypic detection of slime production by the microplate and Congo Red Agar methods. The hemolysins production, hemolytic synergism, caseinase and DNase production were also evaluated. The isolates were then assayed through the Polymerase Chain Reaction method to detect genes associated with virulence factors such as: capsule (*cap5*, *cap8*), fibronectin (*fnbA*, *fnbB*), slime (*icaA*, *icaD*) and hemolysins (*hla* e *hlb*). Regarding the number of isolates assessed, 58% (145/250) were identified as coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and 42% (105/250) as coagulase-positive *Staphylococcus* spp. The latter comprised 36.2% (38/105) of isolates identified as *S. aureus*, 11.4% (12/105) as *S. intermedius* and 3.8% (4/105) belonging to the *S. intermedius* genogroup. The hemolysin production was not significant, whereas only 6,4% (16/250) produced alfa hemolysis, 4,8% (12/250) produced beta hemolysis and 1,6% (4/250) was able to produce both. Caseinase production was observed in 66.4% (166/250) and slime production assayed through the microplate method was positive in 76,8% (192/250). DNase was detected in coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (38/145) and in *S. aureus* (14/38). Low association between genetic detection of *icaA* (38/250) and *icaD* (54/250) and slime phenotypic expression (192/250) suggest that others genetic markers can be involved in this expression. Regarding gene amplification, the isolates did not show significant correlation between the genetic detection of *icaA* (38/250) and *icaD* (54/250) and slime production (192/250), indicating that other genetic markers may be involved in this trait expression. The frequency of the occurrence of the others studied genes was of 4% (10/250) for *cap5* and *cap8*, 32,8% (82/250) for *fnbA*, 4,4% (11/250) for *fnbB*, 19,2% (48/250) for *hla* and 18% (45/250) for *hlb*. The major circulating strain profile on the farms encompassed slime and caseinase producer strains. The *spaA* gene was found in all of the *S. aureus* isolates, presenting varying amplicons sizes, with 300bp being the prevalent size. The amplification of the *coa* gene showed nine polymorphic variants, with 600bp being the prevalent amplicon. The *agr* gene was also detected in every *S. aureus* isolate, with an amplicon of 200bp. It was noticed that the presence or absence of the virulence genes assayed in this study were not correlated with the 6 distinct electrophoretic profiles obtained by PFGE.

KEY WORD: *Staphylococcus* spp., mastitis, virulence factors

LISTA DE ABREVIACÕES

AIS: moléculas autoindutoras

AMP-c = monofosfato de adenosina cíclico

APGF = Água-Pepto-Glico-Fosfatada

AS= Ágar sangue

BHI = Infuso Cérebro Coração

CCS = Contagem de Células Somáticas

CMT = “California Mastitis Test”

CP5 = cápsula do sorotipo 5

CP8 = cápsula do sorotipo 8

CRF = fator de reação com a coagulase

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNase = desoxirribonuclease

ECP: Estafilococos Coagulase Positivos

ECN: Estafilococos.Coagulase Negativos

PFGE = Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

Fn = fibronectina

FnBPA = proteína ligante de fibronectina A

FnBPB = proteína ligante de fibronectina B

SIG: grupo de *Staphylococcus intermedius*

hs = horas

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

H₂O = água

O₂ = gás oxigênio

KOH = hidróxido de potássio

MH = “Müeller-Hinton”

mL = mililitros

mM = milimolar

MVF: Agar Manitol Vermelho de Fenol

NaCl = cloreto de sódio

PIA/ PNAG = polissacarídeo adesina intercelular (b-1,6-N-acetilglicosamina)

QS: “Quorum Sensing”

RNA = ácido ribonucléico

pb = pares de base

PCR = "Polymerase Chain Reaction" - reação em cadeia de polimerase

rpm = rotação por minuto

SHA = sinergismo hemolítico

VP = "Voges Proskauer"

μg = micrograma

μL = microlitro

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

0DPC = no dia em que foi realizada a coloração

1DPC = um dia após a coloração

7DPC = sete dias após a coloração

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Desenvolvimento de um biofilme	9
Figura 2	Diagrama esquemático do gene <i>spaA</i>	11
Figura 3	Diagrama esquemático do gene <i>coa</i>	12
Figura 4	Diagrama esquemático do gene regulatório <i>agr</i>	13
Figura 5	Gráfico apresentando o percentual de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos a partir de amostras de leite mastítico.	24
Figura 6	Gráfico apresentando o percentual de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos obtidos a partir de leite mastítico.	25
Figura 7	Genes <i>Staph</i> e <i>DNAr</i> de <i>S. aureus</i> , <i>nuc</i> 3 e 4 e <i>pta</i> .	26
Figura 8	Produção de DNase	28
Figura 9	Gene <i>fnbA</i> e <i>fnbB</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina.	29
Figura 10	Gene <i>cap5</i> e <i>cap8</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina.	30
Figura 11	Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina.	32
Figura 12	Genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina.	33
Figura 13	Produção de hemolisinas por <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina.	34
Figura 14	Genes <i>hla</i> e <i>hlb</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina.	36
Figura 15	Gene <i>spaA</i> (região polimórfica) em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina	39
Figura 16	Gene <i>agr</i> (<i>RNAIII</i>) em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina.	41
Figura 17	Perfis obtidos por PFGE	42

ÍNDICE DE QUADROS

		Pág
Quadro 1.	Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivas.	18
Quadro 2.	Classificação da produção de “slime” pelo método da microplaca	19
Quadro 3.	Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação das espécies.	21
Quadro 4.	Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.	22
Quadro 5.	Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> .	22

ÍNDICE DE TABELAS

		Pág
Tabela 1.	Quantidade de amostras de leite de vacas com mastite de diferentes propriedades situadas em cidades do Estado, ou próximas, do Rio de Janeiro.	16
Tabela 2.	Distribuição dos grupos de <i>Staphylococcus</i> spp. identificados por fazenda.	24
Tabela 3.	Distribuição dos fatores de virulência nos <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite mastítico.	27
Tabela 4.	Níveis de produção de “slime” em microplaca de <i>Staphylococcus</i> spp. (n=250) isolados de mastite bovina.	32
Tabela 5.	Produção de “slime” e presença dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=250) isolados de mastite bovina.	33
Tabela 6.	Produção de hemolisinas e presença dos genes <i>hla</i> e <i>hlb</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=250) isolados de mastite bovina.	35
Tabela 7.	Produção de sinergismo hemolítico em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=250) isolados de mastite bovina.	35
Tabela 8.	Produção de hemolisinas e presença dos genes <i>hla</i> e <i>hlb</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=250) isolados de mastite bovina.	37
Tabela 9.	Comparação dos fatores de virulência nas regiões de estudo	37
Tabela 10.	Distribuição dos perfis nas regiões estudadas	39
Tabela 11.	Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene <i>spaA</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> (n=38) isolados de mastite bovina.	40
Tabela 12.	Perfis estabelecidos segundo amplificação do gene <i>coa</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> (n=38) isolados de mastite bovina.	40
Tabela 12.	Perfis encontrados através de PFGE e detecção dos genes de virulência por PCR	43

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Mastite	3
2.2. Gênero <i>Staphylococcus</i>	3
2.3. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.	4
2.3.1. Caseinase	5
2.3.2. Desoxirribonuclease (DNase)	5
2.3.3. Proteína ligante de fibronectina	6
2.3.4. Cápsula	6
2.3.5. Produção de “slime” (genes <i>icaABC</i> e <i>D</i>)	7
2.3.5.1. Formação do Biofilme	8
2.3.6. Propriedades hemolíticas	9
2.3.6.1. Alfa-hemolisina	9
2.3.6.2. Beta-hemolisina	10
2.3.6.3. Delta-hemolisina	10
2.3.6.4. Gama-hemolisina	10
2.3.6.5. Sinergismo hemolítico	10
2.3.7. Proteína A (gene <i>spaA</i>)	11
2.3.8. Coagulase (gene <i>coa</i>)	12
2.4. Sistema de regulação de exoproteínas (Agr)	12
2.5. Métodos de detecção dos genes de virulência em <i>Staphylococcus</i> spp. e a sua importância para a compreensão da patologia	14
2.6. Genotipificação por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Origem das amostras de leite	16
4.2. Isolamento bacteriano	16
4.2.1. Coloração de Gram, Prova do Hidróxido de Potássio (KOH) a 3% e Prova da Catalase	17

4.2.2. Prova da coagulase	17
4.2.3. Resistência à bacitracina	17
4.2.4. Provas de Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução de nitrato	17
4.3. Detecção Fenotípica dos Fatores de Virulência	18
4.3.1. Determinação da produção de Caseinase	18
4.3.2. Determinação da produção de Desoxirribonuclease (DNase)	18
4.3.3. Produção de “slime” em microplaca	19
4.3.4. Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo	19
4.3.5. Produção de hemolisinas e sinergismo hemolítico (SHA)	19
4.4. Detecção genotípica dos fatores de virulência	20
4.4.1. Extração do DNA bacteriano	20
4.4.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR	20
4.4.2.1. Caracterização genotípica das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	21
4.4.2.2. Genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.	21
4.4.2.3. Genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
4.5. Análise estatística	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	24
5.2. Fatores de virulência em <i>Staphylococcus</i> spp.	27
5.2.1. Distribuição geral dos fatores de virulência em <i>Staphylococcus</i> spp.	27
5.2.2. Fatores de virulência avaliados por expressão fenotípica	28
5.2.2.1. Produção de Caseinase	28
5.2.2.2. Produção de Desoxirribonuclease (DNase)	28
5.2.3. Fatores de virulência avaliados por caracterização genotípica	29
5.2.3.1. Amplificação dos genes <i>fnbA</i> e <i>fnbB</i>	29
5.2.3.2. Amplificação dos genes <i>cap5</i> e <i>cap8</i>	30
5.2.4. Fatores de virulência avaliados por caracterização fenogenotípica	31
5.2.4.1. Produção de “slime” e amplificação dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	31
5.2.4.2. Produção de hemolisinas, sinergismo hemolítico e amplificação dos genes <i>hla</i> e <i>hlb</i>	34
5.3. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp. por regiões de estudo	37
5.4. Perfis dos fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp. por regiões de estudo	38
5.5. Caracterização do gene <i>spaA</i> de <i>S. aureus</i>	39

5.6. Caracterização do gene <i>coa</i> em <i>S. aureus</i>	40
5.7. Gene <i>agr (rnaIII)</i> em <i>S. aureus</i>	41
5.8. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de isolados <i>S. aureus</i>	42
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	55
A. Leituras, em absorbância, da produção de “slime” em microplaca obtidas em diferentes momentos	56
B. Perfis obtidos através de análise fenotípica dos fatores de virulência detectados	61

1. INTRODUÇÃO

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, a qual frequentemente tem origem bacteriana. A mastite bovina é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (RIBEIRO, 2003). Por ser uma doença altamente prejudicial aos rebanhos leiteiros, muitos estudos sobre essa doença são feitos, e programas de manejo tentam melhorar a saúde da glândula mamária (ZAFALLON, 2007).

As espécies de *Staphylococcus* spp. têm papel importante na etiologia das infecções intramamárias do gado leiteiro (FREITAS et al., 2005). Destas, os *Staphylococcus aureus*, destacam-se entre os agentes etiológicos prevalentes neste tipo de infecção (ZAFALLON et al., 2008), porém, os estafilococos coagulase-negativos têm emergido como microrganismos causadores de mastite, sendo responsáveis pela perda da qualidade do leite o que gera prejuízos econômicos ao produtor e a indústria leiteira (PYORALA & TAPONEN, 2009).

Os *Staphylococcus* spp podem produzir uma série de fatores de virulência que contribuem para patogenicidade do microrganismo, garantindo assim êxito em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro (SILVA ET AL., 2007). Entre estes fatores está a produção de “slime”, um mucopolissacarídeo extracelular, que parece ajudar na aderência e colonização do microrganismo ao epitélio glandular mamário. A habilidade dos *S. aureus* aderirem à superfície do epitélio tem sido associado à produção de biofilmes, que são descritos como aglomerações de células embebidas em matriz heterogênea extracelular, resultando em estruturas tridimensionais com características fisiológicas específicas (CERCA et al., 2007; GAD et al., 2009).

Outro mecanismo de adesão conhecido é aquele promovido por proteínas ligantes ancoradas na matriz microbiana. Os *Staphylococcus* spp. produzem duas proteínas associadas com a parede celular que se ligam a fibronectina, chamadas de FnBPA e FnBPB. Acredita-se que esta capacidade de adesão dos *Staphylococcus* spp. seja essencial para a colonização e estabelecimento de infecções (BUCK et al., 2010; EL-SAYED et al., 2006).

Alguns microrganismos se apresentam envoltos por uma camada polissacarídea extracelular, a cápsula, presente em microrganismos causadores de doenças invasivas, que aumentam a virulência microbiana, tornando a bactéria resistente à fagocitose e outras defesas do organismo. Existem 11 sorotipos de cápsulas descritas e as mais estudadas em infecções animais são as cápsulas do sorotipo 5 e 8. (O'RIORDAM & LEE, 2004).

Além disto, algumas espécies produzem hemolisinas que são diferentes entre si de acordo com ação lítica sobre os eritrócitos (alfa, beta, gama e delta). As do tipo beta e alfa são as mais importantes na patogênese das infecções intramamárias sendo que a beta toxina é uma esfingomielase Mg^{2+} - dependente que degrada a esfingomielina presente na membrana celular (LINEHAN et al., 2003, PARK et al., 2004). Elas podem apresentar um efeito hemolítico sinérgico (SHA), no qual as cepas podem ter uma ação sinérgica com outros microrganismos aumentando o potencial patogênico (DEMO, 1996).

Outra exoproteína que também pode estar envolvida no estabelecimento da infecção, é a desoxirribonuclease (DNase) que catalisa a hidrólise de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA. A detecção da atividade DNase é importante para distinguir estafilococos patogênicos de não patogênicos da microbiota, sendo tão importante quanto à coagulase para a patogênese do estafilococo (CITAK et al., 2003).

O desenvolvimento das mastites pode estar também associado à colonização por microrganismos produtores de caseinase. A caseína é a mais importante proteína do leite, incapaz de penetrar na membrana celular dos microrganismos, a não ser que haja a sua hidrólise pela caseinase. Logo é possível que esta enzima esteja relacionada ao início e

desenvolvimento processos inflamatórios envolvendo bactérias causadoras de mastite (ZAFALON et al., 2008).

Os estafilococos apresentam uma proteína denominada “proteína A” que tem a propriedade de combinar-se ao fragmento Fc da imunoglobulina G, bloqueando a via alternativa de ativação do complemento e da subsequente opsonização e fagocitose (GÓMEZ et al., 2007). Além desta proteína, estas bactérias apresentam a coagulase que é um importante fator de virulência, pois tem a capacidade de coagular a fibrina que se deposita ao redor da bactéria oferecendo-lhe proteção (GOH et al., 1992 *in* KARAHAN & CETINKAYA, 2007). A expressão destas proteínas extracelulares está sujeita à regulação coordenada de vários loci gênicos, onde o mais estudado é o regulador *agr* que envolve cinco genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *hld*). O sistema *agr* atua como regulador positivo de proteínas secretoras (α e β hemolisinas, proteases, DNAses e estafiloquinases) e pode reprimir a transcrição dos genes que codificam a proteína A, coagulase e outras proteínas associadas à parede (NOVICK; JIANG, 2003).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar fenogenotipicamente os fatores de virulência de isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de quadro de mastite bovina de ambientes de produção leiteira na região Sul-Fluminense do estado do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite

Mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, e sua etiologia pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais, destacando-se as de origem bacteriana (FREITAS et al, 2005). Independente da causa é caracterizada por uma série de alterações físicas e químicas do leite bem como modificações patológicas no tecido glandular (BENEDETTE et al, 2008). As mastites podem ser classificadas quanto à forma de transmissão, em contagiosa e ambiental, e quanto à forma de manifestação, em clínica e subclínica.

A mastite contagiosa é causada por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele das tetas, caracterizando-se por baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, sendo os patógenos mais comumente relacionados os *Staphylococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp (BENEDETTE et al, 2008).

Já a ambiental, é associada a agentes, tais como: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. e *Enterobacter* spp., presentes preferencialmente no habitat normal dos animais, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Esse tipo de mastite caracteriza-se pela alta incidência de casos clínicos (BENEDETTE et al, 2008).

Na mastite clínica existem sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, e/ou aparecimento de grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite. Estes podem ser verificados através do exame físico do úbere por inspeção e palpação, além de coleta dos primeiros jatos de leite para realização de teste da caneca telada para detecção de alterações no aspecto do leite (CUNHA, 2006).

Na forma subclínica, ao contrário, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere. Neste caso, o diagnóstico pode ser realizado através da contagem de células somáticas (CCS) no leite, estas são compostas por dois tipos de células principais: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue. Contudo o teste mais usual para este diagnóstico é o *California Mastitis Test* (CMT). O CMT é um teste qualitativo que indica a presença de células somáticas em maior ou menor grau no leite. Este consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, adicionando-se um detergente aniônico neutro, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucléico (DNA) e formando uma massa de aspecto gelatinoso. De acordo com a intensidade da reação pode ser classificada em: negativa (0), leve (+), moderada (++) e intensa (+++). Ambos os testes, devem ser confirmados através de diagnóstico microbiológico (RIBEIRO, 2003).

Segundo Zafallon et al. (2008), *Staphylococcus aureus* é o principal microrganismo isolado nos casos de mastite bovina. Este tem a capacidade de causar infecções de longa duração, geralmente crônicas com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite.

2.2. Gênero *Staphylococcus*

Os estafilococos (gr. staphyle, uva) são membros da família *Staphylococcaceae* e classificados como cocos Gram-positivos, podendo ocorrer na forma de células isoladas, em pares, tétrades, cadeias curtas, e predominantemente em forma de cachos de uva. São imóveis, podendo ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Todos são catalase-positivos, característica que os diferenciam dos estreptococos que são catalase-negativos. A catalase é uma enzima

que converte o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e gás oxigênio (O₂) (KONEMAN et al., 2008).

O gênero *Staphylococcus* spp. é subdividido em dois grupos, *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, com base na capacidade de produção da coagulase. A coagulase estafilocócica 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 e promovendo uma rápida aglutinação das células bacterianas (KONEMAN et al., 2008).

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos mais importantes na medicina veterinária são *S. aureus* e *S. intermedius*. Em 2005, Devriese propôs a criação do grupo de *S. intermedius* (SIG) que inclui *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*. Além de SIG, os outros significativos coagulase-positiva em animais são *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. aureus* subsp. *anaerobius* (SOUZA et al., 2012) Dentre estes, *Staphylococcus aureus* é a espécie mais virulenta e o patógeno mais importante que acomete as infecções intramamárias (ZAFALLON et al., 2008).

Embora historicamente, as espécies de estafilococos coagulase-positivos (ECPs) sejam consideradas patógenos oportunistas, e as espécies de estafilococos coagulase-negativos (ECNs) sejam geralmente consideradas não patogênicas, essa visão está mudando, particularmente devido às evidências que algumas espécies de ECNs podem ser potencialmente patogênicas para os homens e animais (SANTOS, 2008). Freitas et al. (2005) isolaram 36% (172/477) de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos em detrimento de apenas 13% (65/477) de *Staphylococcus aureus* em leite bovino no estado de Pernambuco, ressaltando a elevada circulação de estafilococos coagulase-negativos em ambientes de produção leiteira. Existem 31 espécies de ECNs conhecidas, sendo possível observar elevada diversidade regional na sua distribuição. Em estudos anteriores, Soares et al. (2012), identificaram a espécie *S. xylosus* como prevalente (70/100) em ambientes de produção leiteira na Região Sul-Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. Já Santos et al., (2008) identificaram as espécies *S. chromogenes* e *S. epidermidis* como prevalentes em rebanhos leiteiros nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. Na Finlândia, Taponen e colaboradores (2008) identificaram *S. chromogenes* e *S. simulans* como os ECNs mais comum isolados de amostras de leite bovino.

A identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos constitui tarefa laboriosa e não é efetuada rotineiramente em laboratórios de análises clínica. Apesar da existência de kits de identificação, estes não atendem de maneira satisfatória principalmente quando se trata de amostras de origem animal (KONEMAN et al, 2008). Desta maneira, faz-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de métodos moleculares que possibilitem uma identificação segura, rápida e menos custosa que permita detectar a presença destes agentes e seu impacto na etiologia das infecções intramamárias. (SANTOS, 2008).

2.3. Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

Os microrganismos patogênicos desenvolvem uma série de estratégias de sobrevivência para colonizar determinados sítios do hospedeiro mediante a aquisição de uma variedade de fatores de virulência, que permitem a invasão das defesas fagocíticas, facilitam sua aderência às células epiteliais, colonizam os tecidos e favorecem sua persistência extracelular.

Os *S. aureus* podem produzir mais de 30 fatores de virulência, o que contribui para o seu estabelecimento e manutenção da infecção. Os fatores de virulência podem ser divididos em dois grupos: fatores associados à superfície e enzimas de degradação, juntamente com exotoxinas. Proteínas presentes na superfície de *Staphylococcus* spp. reconhecem moléculas da matriz celular do hospedeiro e promovem a colonização. Este grupo inclui as proteínas de

ligação do fibrinogênio, da fibronectina, e do colágeno, além de um mucopolissacarídeo extracelular “slime” e são produzidos durante as etapas iniciais da infecção. Após seu estabelecimento no tecido, *Staphylococcus* spp. são capazes de secretar uma infinidade de outros fatores para obter nutrientes, invadir, sobreviver e disseminar. Esses fatores incluem enzimas e exotoxinas, tais como: hemolisinas (alfa, beta, delta, e gamma), leucocidinas e DNases. A principal função destas proteínas é converter os tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários a sua multiplicação e por isso, são responsáveis pelos efeitos patológicos observados durante o desenvolvimento da infecção (HAVERI et al., 2008; EL-SAYED et al., 2006).

A maioria destes fatores de virulência extracelulares são codificados por elementos genéticos móveis, tais como: plasmídeos, bacteriófagos ou ilhas de patogenicidade, que facilitam a disseminação horizontal de populações de *S. aureus*. Isso explica as variações na apresentação e distribuição dos fatores de virulência entre *S. aureus* isolados de diferentes origens (EL-SAYED et al., 2006).

As características de virulência de *S. aureus* podem ser melhoradas através de mutação, evolução clonal, e transferência horizontal de genes ou de plasmídeos (JAYARAMAN, 2009 in KUMAR, 2010).

2.3.1. Caseinase

A caseína é a mais importante proteína do leite, sendo uma macromolécula, composta por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, incapaz de penetrar na membrana celular dos microrganismos. Para que a caseína seja utilizada pelos microrganismos, tem de ser degradada em peptonas, polipeptídeos, dipeptídeos e finalmente em aminoácidos. Este processo é possível porque os microrganismos produzem enzimas proteolíticas (proteases) que catalisam a hidrólise da caseína em aminoácidos, os quais são depois assimilados e catabolizados pelas células (ZAFALON et al., 2008).

A capacidade da caseinase em hidrolisar proteínas do leite sugere a sua participação no início e desenvolvimento processos inflamatórios envolvendo bactérias causadoras de mastite.

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento. As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas α , β , κ e γ (ZAFALON et al., 2008).

2.3.2. Desoxirribonuclease (DNase)

A desoxirribonuclease (DNase) é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA. É uma enzima catabólica que produz os substratos desoxirribonucleotídicos necessários para a replicação do genoma do microrganismo (MURRAY et al., 2006).

A detecção da atividade DNase é importante para distinguir estafilococos patogênicos de não patogênicos da microbiota. DNase é tão importante quanto a coagulase para a patogênese. Em estudo desenvolvido por Citak e colaboradores (2003) verificou-se uma forte associação entre *S. aureus* e a produção de DNase.

Em trabalho desenvolvido por Kiedrowski & Horswill (2011) têm demonstrado que a expressão induzida de nuclease endógena em *S. aureus* previne a formação do biofilme sobre superfícies abióticas. A evidência *in vitro* que a atividade da enzima DNase previne a formação e elimina os biofilmes já estabelecidos, sugere o uso dessas enzimas no tratamento de infecções *in vivo*.

2.3.3. Proteína ligante de fibronectina

Fibronectina é uma glicoproteína presente em quantidades substanciais no sangue (0,3 mg/ml de plasma) e na matriz extracelular do tecido conjuntivo frouxo. Fibronectina imobilizada em coágulos de sangue e em matriz de tecido conectivo pode servir como um substrato para fixação e colonização de bactérias (SWITALSKI et al., 1983). A ligação a fibronectina confere vantagem para as bactérias em alguns tipos de infecção, especialmente em infecções cutâneas e de tecidos moles (BUCK et al., 2010).

A fibronectina pode mediar a adesão de *S. aureus* às células epiteliais e micro-lesões do epitélio glandular mamário onde a lâmina basal e o tecido conjuntivo inflamatório são ricos em fibronectina. Em estágios iniciais da infecção, a adesão às células epiteliais pode impedir o *S. aureus* de fluir para fora da glândula durante a ordenha. Desta forma, o *S. aureus* poderia ser disseminado na glândula mamária, aderindo-se aos glóbulos de gordura e em seguida às células epiteliais em diferentes níveis da glândula, isto é, seio do teto, seios lactíferos e dutos (SUTRA & POUTREL, 1994).

Acredita-se que a capacidade do *S. aureus* aderir a proteínas da matriz extracelular é essencial para a colonização e estabelecimento de infecções. *Staphylococcus aureus* produzem duas proteínas associadas com a parede celular que se ligam a fibronectina (Fn) e são chamadas de FnBPA e FnBPB (BUCK et al., 2010; EL-SAYED et al., 2006). Em trabalho, verificou-se que mutantes de *S. aureus* que não possuíam o gene *fnbA* ou *fnbB* foram efetivos em aderir a superfície, porém o duplo mutante para *fnbA* e *fnbB* foi deficiente na adesão e se um dos dois tipos de genes for fornecido por plasmídeos, então a adesão é restaurada (DALTON & MARCH, 1998 in MELO, 2008).

FnBPA e FnBPB são parte integrante na adesão inicial de *S. aureus* na superfície do hospedeiro. Estas moléculas da parede celular são parte de uma família de componentes da superfície bacteriana que reconhecem moléculas da matriz extracelular do hospedeiro, como a fibronectina. FnBPA se liga de forma intrínseca à Fn, por meio da ligação de 11 regiões desta proteína formando uma interação do tipo zipper. Além disso, tem-se observado a contribuição destas FnBPs para a formação de biofilmes, que limita a ação da terapia tradicional com antibióticos (BUCK et al., 2010; YTHIER et al., 2010).

A análise da ligação entre Fn-FnBP pode ser usada como um indicador de risco de *S. aureus* em pacientes implantados (BUCK et al., 2010).

2.3.4. Cápsula

A cápsula é uma camada polissacarídea extracelular presente em microrganismos causadores de doenças invasivas. As cápsulas aumentam a virulência microbiana, tornando a bactéria resistente à fagocitose e outras defesas do organismo. Para fagocitar uma bactéria possuidora de envoltório capsular é necessário que o organismo tenha anticorpos específicos contra os polissacarídeos capsulares, baseado nisso tem sido estudada a utilização de antígenos capsulares de *S. aureus* como vacina devido ao fato desses antígenos reforçarem a habilidade dos fagócitos responderem a essas infecções (DAUM & SPELLBERG, 2011; O'RIORDAM & LEE, 2004). Ela é classificada em 11 sorotipos com base na utilização de anti-soros específicos. Entretanto, apenas os polissacarídeos dos sorotipos 1, 2, 5 e 8 foram purificados e quimicamente caracterizados. As cápsulas são formadas por ligações de ácidos hexosaminurônicos (O'RIORDAM & LEE, 2004).

As cepas dos sorotipos 1 e 2 resistem *in vitro* a opsonização e fagocitose por leucócitos polimorfonucleares humanos. Produtos do sistema imune do hospedeiro não-imunizado, tais como, complementos (fragmentos de C3b) e anticorpos são depositados na parede celular bacteriana abaixo da camada capsular. A cápsula impede a interação entre o

C3b e os anticorpos aos seus receptores na célula fagocítica. Como resultado a bactéria escapa da fagocitose. Em hospedeiros imunizados, portadores de anticorpos específicos, C3b e anticorpos são depositados ao longo da matriz capsular e na superfície da bactéria, tornando-os disponíveis ao reconhecimento por receptores dos fagócitos (O'RIORDAM & LEE, 2004).

As cápsulas dos sorotipos 5 e 8 são prevalentes tanto em infecções humanas quanto em animais (O'RIORDAM & LEE, 2004). Mais de 90% das cepas de *S. aureus* possuem um dos 11 sorotipos capsulares, e a maioria das cepas que infectam os seres humanos produzem tanto CP5 e CP8 (LEE & LEE, 2000 *In*: ZHAO et al., 2010). Em contraste, a produção de cápsula é menos prevalente entre cepas de *S. aureus* isolados de ruminantes com mastite. Somente 40% de mais de 600 isolados de origem dos Estados Unidos produziram cápsula 5 ou 8 (TUCHSCHERR et al., 2005).

As cápsulas 5 e 8 são codificadas por 2 grupos gênicos formados por 16 genes cada um, e está localizado no cromossoma bacteriano. Os genes são denominados cap5A, ou cap8A, até cap5P, ou cap8P, sendo 12 destes genes praticamente idênticos. Os genes cap5HIJK e cap8HIJK demonstram pouca homologia entre si, sendo assim tipo-específicos (O'RIORDAN & LEE, 2004).

A característica de virulência das cepas formadoras de cápsulas deve-se à resistência à fagocitose por células polimorfonucleares mediada por opsoninas, o que resulta na persistência bacteriana no organismo hospedeiro. Contudo, em trabalho desenvolvido por Tuschherr et al. (2005) cepas não encapsuladas foram mais virulentas do que as cepas encapsuladas dos sorotipos 5 e 8 em um modelo de mastite em camundongos e tiveram maior capacidade de invadir células epiteliais.

Com a emergência de *S. aureus* resistente à vancomicina, novas estratégias são necessárias para combater as infecções estafilocócicas. Desta maneira, o desenvolvimento de vacinas que utilizem cápsulas 5 e 8 como antígenos para prevenir infecções deste tipo tornam-se pontos de intervenção importantes (O'RIORDAN & LEE, 2004).

2.3.5. Produção de “slime” (genes *icaABC* e *D*)

A adesão dos *Staphylococcus* spp. ao epitélio da glândula mamária é considerada o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite. Esta adesão e colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária são facilitadas pela produção de uma camada espessa de um muco polissacarídeo extracelular, chamado “slime”. A produção de “slime” é considerada um fator de virulência que inibe a quimiotaxia, a fagocitose, proliferação de linfócitos a mitógenos e limita a ação de macrófagos (VEENSTRAS et al, 1996). Além disso, estudos relacionam esta produção durante o crescimento dos microrganismos sobre superfícies inertes, facilitando a aderência e a formação do biofilme (COSTERTON, 1999).

O “slime” é composto por um polissacarídeo de alto peso molecular chamado polissacarídeo adesina intercelular (PIA), que é um polímero de carga positiva de resíduos de b-1,6-N-acetilglicosamina, também conhecido como PNAG. O PNAG está envolvido na adesão aos substratos poliméricos, adesão intercelular bacteriana, formação de biofilme, proteção contra anticorpos do hospedeiro e fagocitose. A produção do PNAG é mediada pelo operon de adesina intercelular (*ica*) formado pelos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* e um gene regulador, *icaR*. Estes genes codificam proteínas ICAA, ICAB, ICAC e ICAD envolvidas na síntese deste polímero. ICAA é uma glicosiltransferase trans-membrana e pode sintetizar polímeros curtos de PNAG *in vitro* utilizando UDP-N-acetil-glicosamina como um substrato. ICAD aumenta a eficiência de biossíntese de ICAA. ICAC é também uma proteína transmembrana e parece estar envolvida na ligação de polímeros curtos para fazer mais oligômeros de PNAG (VUONG et al., 2004; CERCA et al., 2007; ARCIOLA et al., 2001; GAD et al., 2009).

Em trabalho desenvolvido por Kropec e colaboradores (2005) em modelos animais, a exclusão do locus *ica* em estirpes de *S. aureus* resultaram em cepas mutantes com habilidades significativamente reduzida para manter os níveis de bactérias no sangue. Deste modo, a produção de PNAG por *S. aureus* parece ser um fator crítico da virulência e tem sido usado como um antígeno alvo para o desenvolvimento de vacina antiestafilocócica.

2.3.5.1. Formação do biofilme

A maioria das bactérias na natureza não estão presentes na sua forma livre ou como células isoladas, em vez disso, elas são freqüentemente encontradas associadas com superfícies. Estas comunidades microbianas, chamadas biofilmes, são compostas de aglomerados de bactérias dentro de uma matriz de exopolissacarídeo extracelular. Na matriz de polissacarídeos as bactérias estão presentes como estruturas altamente organizadas, o que permite o transporte de nutrientes e resíduos dentro e fora do biofilme. Além disso, os biofilmes na natureza são compostos por várias espécies bacterianas (JAYARAMAN & WOOD, 2008; COSTERTON, 1999).

A formação do biofilme promove a agregação célula-célula, além da adesão celular em biomateriais (MACK *et al.*, 2000), sendo atualmente o fator de patogenicidade associado à biomateriais, como por exemplo, bocais de ordenhadeira e cateteres venosos (DEGO *et al.*, 2002; BERNARDI, *et al.*, 2007).

A habilidade dos *S. aureus* aderirem e colonizarem a superfície do epitélio tem sido associado à produção de biofilmes. Biofilmes são um problema clínico extremamente importante, já que as bactérias do biofilme exibem alta resistência aos agentes antimicrobianos e mecanismos de defesa imune do hospedeiro. A compreensão dos mecanismos envolvidos na formação do biofilme pode levar a abordagens para o controle de algumas infecções. O sistema quorum-sensing de comunicação célula-célula é um dos mecanismos que tem sido proposto para governar o desenvolvimento do biofilme. Discutir métodos para controlar a formação do biofilme é uma estratégia possível de controle e/ou prevenção da infecção (JAYARAMAN & WOOD, 2008; SILVA *et al.*, 2007).

Dois distintos estágios ocorrem sucessivamente durante a formação de um biofilme: a) a aderência primária da bactéria às proteínas séricas do hospedeiro, que previamente recobrem o biomaterial inserido (VEENSTRAS *et al.*, 1996); b) a formação de agrupamento bacteriano em multicamadas, mediado pela produção do polissacarídeo extracelular (figura 1).

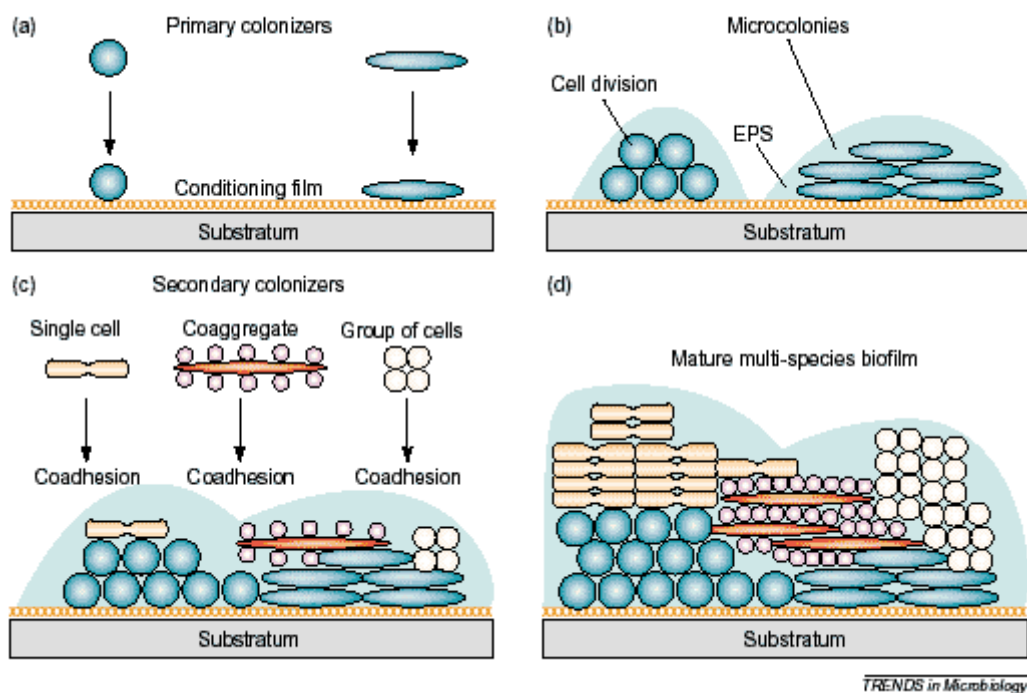


Figura 1. Desenvolvimento de um biofilme. (a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro. (Adaptado de RICKARD *et al.*, 2003).

2.3.6. Propriedades hemolíticas

Staphylococcus spp. produzem uma variedade de exoproteínas que contribuem para a sua colonização no tecido glândular mamário, sendo quatro toxinas prejudiciais à membrana celular, as hemolisinas: alfa, beta, gama e delta. Hemolisinas são citolíticas a uma variedade de células. A toxicidade às células do sistema imune constitui uma forma de evasão dos *Staphylococcus* spp. a fagocitose e outras formas de defesa do sistema imunológico do hospedeiro. Hemolisinas beta e alfa são as mais importantes na patogênese das infecções intramamárias (COELHO *et al.*, 2011).

2.3.6.1. Alfa-hemolisina

A alfa-hemolisina produzida por estafilococos é tóxica para uma ampla gama de células de mamíferos, especialmente células do sistema imune, levando a morte de monócitos, neutrófilos e linfócitos. Esta toxina apresenta ação necrosante em pequenos vasos e aparentemente induz a formação de poros, alterando a permeabilidade da membrana nuclear (LINEHAN *et al.* 2003; SILVA, *et al.*, 2007). Os poros são formados pela oligomerização de monômeros a heptâmeros na superfície de células alvo, acarretando instabilidade metabólica e lise celular (BOWNIK & SWICKI, 2008). Esses fatores contribuem para o consenso entre os pesquisadores de que esta toxina é importante em vários processos infecciosos provocados por *S. aureus* (DINGES *et al.*, 2000; BOWNIK & SWICKI, 2008).

A alfa-hemolisina é codificada pelo gene *hla*. Essa toxina está sob controle do gene regulador acessório *agr* e é sintetizada na última fase de crescimento exponencial. (DINGES, et al., 2000).

2.3.6.2.Beta-hemolisina

A beta-hemolisina é uma esfingomielinase C Mg^{2+} dependente, a qual degrada a esfingomielina presente na camada externa de fosfolípido da membrana. Desta maneira, ela é tóxica para vários tipos celulares tais como hemácias, leucócitos, plaquetas, fibroblastos e macrófagos (LINEHAN et al. 2003). A beta-hemolisina é conhecida como um indutor inflamatório e seu efeito é dependente do conteúdo de esfingomielina presente na célula-alvo (BOWNIK & SWICKI, 2008). Sendo especialmente tóxica ao úbere da vaca que apresenta grande quantidade de esfingomielina, desta maneira atuando como um fator facilitador da colonização bacteriana. Sua produção durante o curso da infecção confere vantagem seletiva aos *Staphylococcus* spp. Estudos mostram que a produção da toxina aumenta o crescimento de *S. aureus* nas glândulas mamárias murinas em comparação a um organismo isogênicos knockout para *hlb* (DINGES, et al., 2000).

A beta-toxina é também conhecida como a toxina quente-frio por causa de sua atividade diferencial em placas de ágar sangue de carneiro. A 37°C a beta-toxina interage com hemácias de carneiro, mas não promove lise celular. Se a placa de ágar sangue é colocada a 4°C, as células sofrem lise, e observa-se formação de halo de hemólise parcial (HUSEBY et al., 2007).

A beta-hemolisina é codificada pelo gene *hla*. E de forma similar a alfa-hemolisina está sob controle do gene regulador acessório *agr*, sendo secretada na última fase de crescimento exponencial (DINGES, et al., 2000).

2.3.6.3.Delta-hemolisina

A delta-hemolisina possui propriedades tensoativas, atuando como detergente e sendo responsável pelos efeitos sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas. É capaz, ainda, de inibir a absorção de água pelo íleo, devido a alteração do mecanismo de ação do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c), desencadeando uma diarreia aguda (SANTOS, 2007). Essa toxina é também codificada pelo gene que, simultaneamente, faz RNA III, que funciona como um regulador global da superfície celular e dos fatores de virulência secretado por ser parte do gene regulador acessório (HUSEBY et al., 2007).

2.3.6.4.Gama-hemolisina

A gama-hemolisina é uma toxina formadora de poro, composta por duas classes de proteínas S e F. Monócitos humanos, macrófagos e neutrófilos são os principais tipos de células suscetíveis a esses agentes bacterianos (BOWNIK & SWICKI, 2008).

2.3.6.5.Sinergismo hemolítico (SHA)

Christie e Graydon (1941) (*apud* WILLIAMS & HARPER, 2005) relataram que algumas cepas estafilocócicas produzem uma área definida de completa hemólise quando inoculados dentro da zona de efeito beta hemolítico produzido por outros estafilococos. Este método denominado ensaio sinérgico hemolítico (SHA) é devido à ação combinada da beta e delta citolisina que pode ser avaliada em meios de ágar contendo eritrócitos ovinos, bovinos,

humanos e eqüinos. Pelo fato da alfa citolisina não ter efeito sobre eritrócitos humanos e eqüinos, e a beta e gama citolisina apresentar muito pouco ou nenhum efeito sobre eritrócitos de eqüinos se deduz que o SHA observado é devido a delta toxina e deve ser observado principalmente em sangue de ovino (HEBERT & HANCOCK,1985).

Vêm-se detectando SHA em cepas de estafilococos isoladas de glândula mamária bovina, as quais poderiam ter uma ação sinérgica com outros microorganismos patógenos aumentando ainda mais seu potencial patogênico (DEMO,1996).

2.3.7. Proteína A (gene *spaA*)

A proteína A é um dos principais fatores de virulência produzidos por *S. aureus*. Esta proteína de membrana interfere na opsonização mediada pela imunoglobulina G ao se ligar a porção Fc desta imunoglobulina. A proteína A é considerada uma adesina, uma vez que se liga ao fator de von Willebrand, uma glicoproteína, mediando a adesão plaquetária nos locais de dano endotelial (GÓMEZ et al., 2004; GÓMEZ et al., 2007). A proteína A também tem as propriedades de um superantígeno de células B, sendo possível que durante o processo de infecção, essa atividade proporcione benefício para as bactérias somente quando ela é produzida à níveis baixos. Por outro lado, um maior nível de estimulação poderia acionar o sistema imune inato e poderia ser deletério para as bactérias (SILVERMAN & GOODYEAR, 2002 *in*: HUNTZINGER et al., 2005; NOVICK & JIANG, 2003).

A proteína A é codificada pelo gene *spa* que possui uma região polimórfica ou variável e uma região conservada. A região polimórfica X consiste em um número variável de repetidos 24 pares de bases e está localizada na região codificante do extremo C-terminal da parede celular (figura 2) (KOREEN et al., 2004). O polimorfismo do gene *spa* têm sido usado para distinguir isolados patogênicos (KUMAR et al., 2011; REINOSO et al., 2008).

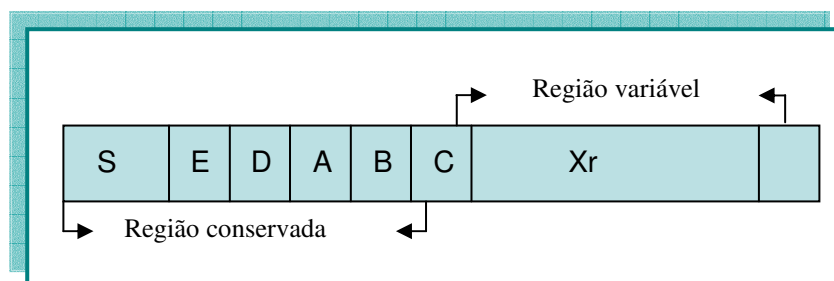


Figura 2. Diagrama esquemático do gene *spaA*. S: seqüência sinal; regiões E, D, A, B e C: sítio de ligação de imunoglobulinas; Xr: região variável repetida (COELHO, 2009).

A diversidade da região parece originar-se a partir de deleções ou duplicações espontâneas das unidades repetidas, assim como também por mutações pontuais. O domínio da proteína A, codificado pela região X, funciona de modo a estender a porção N-terminal da união à imunoglobulina IgG através da parede celular, evitando assim a fagocitose e a fixação do complemento (KOREEN et al., 2004).

A expressão da proteína A está sob controle do gene regulador acessório *Agr* e é sintetizada na fase inicial do crescimento exponencial conforme será abordado adiante (HUNTZINGER et al., 2005).

2.3.8. Coagulase (gene *coa*)

A proteína coagulase é um importante determinante fenotípico e aceita como principal fator de virulência de *S. aureus*, pois tem a capacidade de coagular a fibrina que se deposita ao redor da bactéria oferecendo-lhe proteção em face aos mecanismos de defesa do organismo, como por exemplo a fagocitose. Além de favorecer o crescimento das bactérias (GOH et al., 1992 in KARAHAN & CETINKAYA, 2007).

A coagulase se liga a protrombina e a ativa em estafilotrombina, que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. Este processo é independente de íons de cálcio e fosfolípídeos. *In vitro* podem apresentar-se falsos positivos e falsos negativos. Os falsos negativos estariam associados à clivagem parcial por proteases (estafiloquinases) e os falsos positivos são observados quando a protrombina é ativada por tripsina ou proteases. A este fenômeno se denomina “pseudocoagulase” (SHOPSIN et al., 2000).

Análise do gene de codificação da coagulase (*coa*) de *S. aureus* demonstrou seqüências variáveis na região 3'-final de codificação. Esta região variável constituída de seqüências curtas repetidas em *tandem* de 81 pb (figura 3) é utilizada em diversos estudos epidemiológicos para subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de seqüências repetidas e pela localização de sítios de restrição para endonucleases específicas, permitindo aumentar o poder discriminatório da técnica. Esta característica tem sido utilizada para distinguir isolados de *S. aureus* de origem humana e bovinos (HIMABINDU et al., 2009; GOH et al., 1992 in KARAHAN & CETINKAYA, 2007).

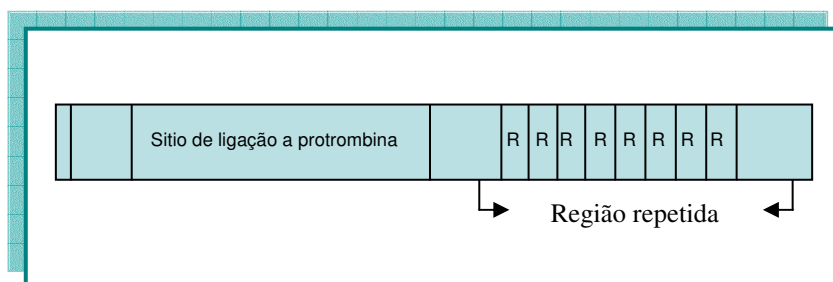


Figura 3: Diagrama esquemático do gene *coa*. R: unidade de seqüência repetida de 81pb (COELHO, 2009).

2.4. Sistema de regulação de exoproteínas (*Agr*)

A delicada coordenação da expressão dos fatores de virulência usualmente espécie-específicos é crucial para a sobrevivência do patógeno e conseqüente sucesso da invasão no hospedeiro (VOJTOV et al., 2002).

Dentre o sistema de regulação bacteriana, a comunicação existente entre as células, denominada sistema “quorum sensing” (QS) vem adquirindo maior importância. QS é um mecanismo de comunicação célula-célula em que as bactérias secretam pequenas moléculas difusíveis chamado autoindutores (AIs) para coordenar as atividades, tais como: bioluminescência, formação de biofilme, produção de antibióticos, expressão de fatores de virulência. Muitos mecanismos QS evoluíram entre as bactérias.

Em *Staphylococcus* spp o sistema QS bem caracterizado. é denominado *agr*. O lócus regulatório *agr* controla a expressão de adesinas e exoproteínas de *S. aureus*. O lócus *agr* é um sistema multigênico complexo que responde à densidade celular bacteriana. Esse sistema incluem componentes AgrD, o octapeptídeo de sinalização; AgrB, a proteína responsável pela

secreção, exportação e processamento de AgrD em sua forma ativa; AgrC, um receptor de membrana que quando ligado ao octapeptídeo ativa AgrA por um mecanismo de fosforilação; AgrA fosforilado regula positivamente a produção da molécula efetora RNA III. Em alta densidade celular, um octapeptídeo é secretado e se liga à um receptor de membrana AgrC, ativando o regulador AgrA que detecta AgrD em níveis críticos e inicia a expressão dos determinantes de virulência controlados pelo sistema Agr (KOENIG et al., 2004; O'RIORDAN & LEE., 2004) (figura 4).

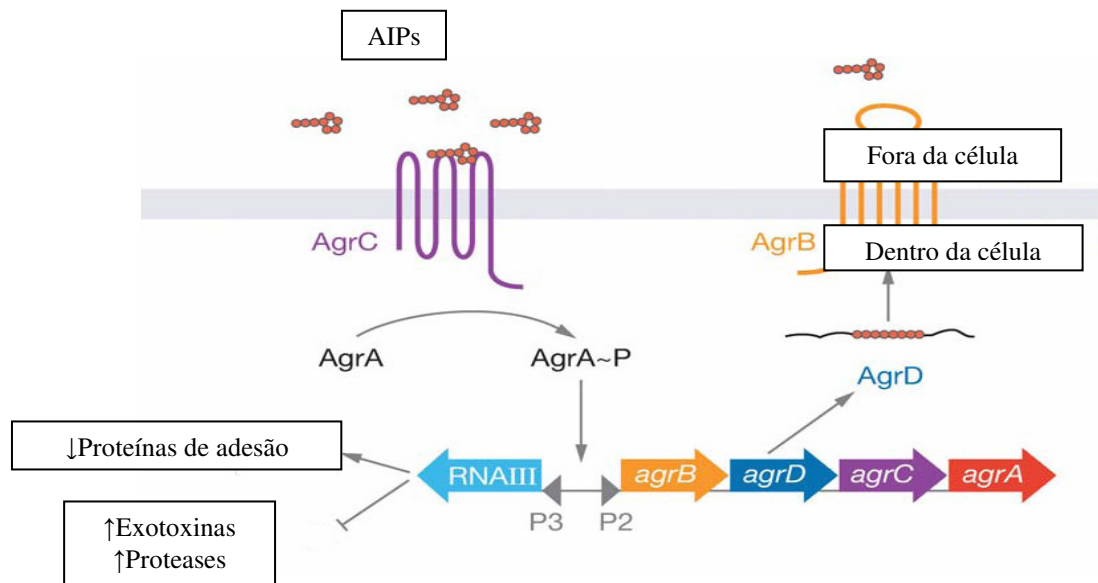


Figura 4: Diagrama esquemático do gene regulatório *agr* (Adaptado de Waters & Bassler, 2005).

A estratégia utilizada por *S. aureus* para causar doença se baseia no sistema QS, desta forma, em densidade celular baixa as bactérias expressam proteínas que promovem a fixação e colonização, enquanto que em alta densidade celular, as bactérias reprimem essas características e iniciam a secreção de toxinas e proteases que são necessários para a disseminação no tecido do hospedeiro (LYON & NOVICK, 2004 *In*: WATERS & BONNIE, 2004). Desse modo, a expressão das adesinas e proteínas de superfície, tais como proteína A, são expressas nas fases iniciais, enquanto que enzimas, imunotoxinas e citotoxinas são secretadas posteriormente (NOVICK & JIANG, 2003).

Durante a fase exponencial inicial de crescimento, o sistema *agr* está desligado. Na fase pós-exponencial o sistema *agr* é acionado. Usando a regulação de expressão do gene que codifica para a presença de proteína A como exemplo, temos o seguinte mecanismo proposto: em baixa densidade celular, mRNA de *spa* é eficientemente traduzido e protegido da degradação; em alta densidade celular, a síntese de RNAIII é induzida, permitindo ligação ao mRNA de *spa* e oclusão da ligação do sítio do ribossomo. Esta inibição da tradução favorece uma rápida degradação de mRNA de *spa* envolvendo RNase II na etapa inicial (HUNTZINGER et al., 2005).

2.5. Métodos de detecção dos genes de virulência em *Staphylococcus* spp. e a sua importância para a compreensão da patologia

Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas para analisar a distribuição dos genes envolvidos na virulência de cepas de *Staphylococcus* spp (KUMAR et al., 2011). No entanto, a informação disponível sobre a heterogeneidade genética de cepas em bovinos mastíticos em condições subtropicais ainda é limitada, por isso é importante a ampliação do uso de métodos moleculares na identificação destes agentes.

A caracterização molecular de isolados pode, por exemplo, detectar padrões polimórficos em genes de proteína A e coagulase revelando assim uma heterogeneidade genética significativa entre isolados de *S. aureus*, possibilitando a discriminação entre cepas epidêmicas e não-epidêmicas (REINOSO et al 2008.; KUMAR et al. 2010; KUMAR et al., 2011).

Diferenças genotípicas entre *S. aureus* isolados de humanos e animais tem sido observadas por diversos autores. Além disso, seqüenciamentos do genoma de cepas humanas e bovinas detectaram diferenças significativas em ambos os genomas e forneceram bases para a identificação de fatores associados a especificidade dos *Staphylococcus* spp ao hospedeiro humano ou animal (REINOSO et al., 2008).

Desta maneira, a detecção de genes codificadores dos fatores de virulência em isolados de *Staphylococcus* spp. é crucial para a caracterização genotípica das cepas envolvidas na infecção e posterior tomada de decisão sobre políticas de tratamento eficazes (KUMAR et al. 2010).

2.6. Genotipificação por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

Eletroforese em Gel de Campo Pulsado é uma técnica de genotipificação que apresenta alto poder de discriminação e reprodutibilidade. Contudo, é uma técnica de custo elevado, onde são necessários, além de pessoal qualificado e materiais específicos, vários dias de análise (DENDANI et al., 2010).

Em nosso trabalho, esta técnica foi utilizada para obtenção dos perfis cromossômicos de *S. aureus* e foi realizada a digestão enzimática com enzima de restrição *SmaI* em trabalho desenvolvido pela Dr. Miliane Moreira Soares de Souza em colaboração com professores da Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina (MARQUES et al., 2012). A enzima de restrição *SmaI* é a mais utilizada e apresenta perfis de fácil leitura com 13-17 fragmentos que variam de 20-750 Kb (FARIA et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar fenogenotipicamente os fatores de virulência de isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de quadro de mastite bovina.

3.2. Objetivos específicos:

- Identificar através de provas fenotípicas as espécies de *Staphylococcus* spp.;
- Amplificar os genes específicos para a identificação das espécies *S.aureus* (DNAr), *S.intermedius* e *S.intermedius* genogrupos (SIG);
- Detectar através de provas fenotípicas os fatores de virulência: “slime”, hemolisinas, sinergismo hemolítico, caseinase e DNase em todos os isolados;
- Amplificar os genes de virulência *hla* e *hly* (alfa e beta hemolisinas, respectivamente), *icaA* e *icaD* (“slime”), *fnbA* e *fnbB* (proteína ligante de fibronectina A e B, respectivamente), *cap5* e *cap8* (cápsula sorotipo 5 e sorotipo8, respectivamente) em todos os isolados;
- Amplificar os genes de virulência *spaA* (proteína A), *coa* (coagulase) e *agr* (controle da produção de exoproteínas) em *S.aureus*;
- Buscar correlação entre as análises genotípicas e fenotípicas dos fatores de virulência;
- Estabelecer perfis dos isolados a partir dos dados fenotípicos e genotípicos, de modo a criar uma análise comparativa com os dados observados em campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das amostras de leite

Foram utilizadas 272 amostras de leite de vacas, pertencentes a 8 propriedades situadas em cidades localizadas na região Sul Fluminense e metropolitana do Estado do Rio de Janeiro (tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de amostras de leite de vacas com mastite de diferentes propriedades situadas em cidades do Estado, ou próximas, do Rio de Janeiro.

Identificação da propriedade	Cidades	Número de amostras (nº de vacas)*
A	Seropédica	101 (26)
B	Rio Claro	62 (17)
C	Piraí	40 (13)
D	Rio Claro	20 (5)
E	Paracambi	16 (4)
F	Paracambi	15 (4)
G	Rio Claro	10 (3)
H	Rio Claro	8 (4)
Total		272 (76)

* Em alguns casos, o número de amostras não representa quatro vezes o número de vacas porque alguns animais tiveram perda da funcionalidade dos tetos provocada por mastite clínica.

As amostras foram coletadas diretamente pelo grupo de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em cada propriedade, foram realizados testes para identificação de mastite clínica (exame físico da glândula mamária e caneca telada) e subclínica (CMT – “*California Mastitis Test*”) em todos os quartos mamários de todas as vacas em lactação. O resultado do CMT foi avaliado de acordo com o grau de gelatinização da mistura de leite e reagente. Dos animais considerados positivos 20% foram selecionados aleatoriamente e, realizada a coleta do leite após higienização dos tetos com água, sabão neutro e álcool 70% com secagem dos mesmos com papel toalha. Foi coletado um volume de aproximadamente 10mL de leite por ordenha manual em pote coletor estéril. As amostras foram imediatamente transportadas sob condições adequadas de refrigeração, e assim que recebidas foram incubadas por 6hs a 37°C.

4.2. Isolamento bacteriano

As amostras de leite foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento em ágar sangue (AS), constituído por Columbia Base (MERCK) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 - 48 horas em condições de aerobiose e anaerobiose e, posteriormente repicadas em ágar seletivo Manitol Vermelho de Fenol (AMVF - HIMEDIA), para observação das características das colônias e fermentação, ou não, do manitol com o objetivo de selecionar culturas puras de *Staphylococcus* spp. (KONEMAN et al., 2008).

4.2.1. Coloração de Gram, Prova do Hidróxido de Potássio (KOH) a 3% e Prova da Catalase

Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintórias (cocos Gram positivos).

A prova do hidróxido de potássio foi efetuada em lâmina adicionando-se uma gota de KOH (3%) e uma gota da suspensão bacteriana com a alça bacteriológica a qual foi utilizada para verificar a formação ou não de um material viscoso. A não formação deste material indicou um resultado negativo confirmando a prova do Gram, uma vez que todas as bactérias Gram positivas são negativas à prova do KOH a 3%. O KOH a 3% possui a capacidade de romper os envoltórios celulares de bactérias Gram negativas, não atuando sobre bactérias Gram positivas. A ruptura dos envoltórios celulares libera o DNA bacteriano que altera a viscosidade e outras características da suspensão bacteriana (KONEMAN et al., 2008).

O teste da catalase foi realizado em lâmina. Para tal, foi depositada uma gota da suspensão bacteriana homogênea e adicionada uma gota da solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A observação de formação de bolhas de O₂ indicou ser o teste positivo (KONEMAN et al., 2008).

4.2.2. Prova da coagulase

Para detecção da atividade da enzima coagulase, foi realizado teste utilizando o crescimento bacteriano obtido em caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI -MERCK), incubado a 35°C, por 24 horas. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada a 0,3 mL de plasma liofilizado de coelho (LABORCLIN) suspenso em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%), incubados a 37°C por 4-24 horas a fim de obter a visualização do coágulo, chegando assim ao grupo *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos. As amostras coagulase-negativas foram avaliadas quanto ao seu perfil de resistência à bacitracina (KONEMAN et al., 2008).

4.2.3 Resistência à bacitracina

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos apresentam as mesmas características que o gênero *Micrococcus* spp. em relação a morfologia, coloração de Gram e às provas da catalase, KOH (3%) e coagulase, o que torna necessário a utilização de provas adicionais para sua diferenciação. Neste trabalho foi utilizada a prova da bacitracina para a separação destes dois gêneros bacterianos. Uma suspensão bacteriana (0,1 mL) crescida por 24 horas em Caldo BHI (MERCK) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Mueller Hinton) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos de bacitracina (0,04U – SENSIFAR-CEFAR®) foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito do fármaco, foram observados e medidos, em milímetros. Os estafilococos são resistentes à bacitracina, enquanto que os micrococos são sensíveis e apresentam halo de 10 mm ou maiores (FORBES, 2002; KONEMAN et al., 2008).

4.2.4. Prova de Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução de nitrato

Para identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos seguiu-se o critério proposto por KONEMAN e colaboradores (2008), onde através da realização de testes de Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução do nitrato a nitrito, foi possível a determinação das espécies.

Para realizar a prova de Voges-Proskauer foi utilizado caldo contendo água, peptona, glicose e fosfato (APGF-VETEC). Uma suspensão bacteriana de 0,1 mL foi adicionada a 1 mL de caldo APGF e incubado a 37°C por 24 horas. A utilização da glicose, apresentando como produto final a acetoína é indicada pela coloração rosa após a adição de 0,3 mL de α -naftol a 5% e de 0,6 mL de KOH a 40% no caldo (KONEMAN et al., 2008).

O teste de fermentação de maltose foi realizado utilizando-se caldo contendo o indicativo de pH vermelho de fenol e o açúcar a 1%. Uma suspensão bacteriana de 0,1 mL foi adicionada a 1 mL deste caldo e incubado a 37°C por 24 horas. A fermentação do açúcar com produção de ácido é indicada pela diminuição do pH e consequente mudança de cor do caldo (KONEMAN et al., 2008).

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO₃). À este caldo foi inoculado 0,1 mL de suspensão bacteriana e incubado a 37°C por 24 horas. A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada adicionando-se em uma lâmina, uma gota do caldo pós-incubação e, uma gota de cada reativo (A e B) de Griess Ilosway. A coloração rosa indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva. Em caso de, não formação de coloração rosa, uma gota do reativo de Nessler foi acrescentado e observado a formação de uma coloração amarela, confirmando o resultado negativo da prova (KONEMAN et al., 2008). O quadro 1 apresenta o padrão de identificação das espécies estafilocócicas coagulase-positivas utilizado, segundo os testes acima citados:

Quadro 1. Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-positivas*.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Maltose	Caldo Nitratado	APGF**
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+/-	+	-
<i>S. hiycus</i>	-	+	-

* Segundo Koneman et al., (2008).

** Água-Pepto-Glico-Fosfatada

4.3. Detecção Fenotípica dos Fatores de Virulência

4.3.1. Determinação da produção de Caseinase

A hidrólise da caseína foi testada em ágar contendo 1,5% de ágar-ágar e 10% de leite desnatado. Após autoclavação à 120°C durante 20 minutos, este foi vertido em placas de petri. Os isolados foram semeados na superfície do Agar com alça bacteriológica e incubados por 24hs a 37°C. A presença de uma área clara rodeando a zona de crescimento bacteriano indica reação positiva. A não modificação da opacidade do meio indica reação negativa (FURUMURA et al., 2006; KONEMAN et al., 2008).

4.3.2. Determinação da produção de Desoxirribonuclease (DNase)

Agar DNase (HIMEDIA) foi utilizado para determinar a produção de DNase. Estirpes de *Staphylococcus* spp. foram semeadas no meio ágar e incubadas a 37°C por 24hs. Após incubação, a placa de cultura foi inundada com azul de toluidina 1%, conforme indicações do fabricante, e o crescimento foi observado. Os isolados que apresentaram em volta do crescimento bacteriano coloração rósea foram considerados positivos para a atividade DNase, e os que não tiveram modificação de cor, apresentando cor azul foram consideradas negativas (KONEMAN et al., 2008).

4.3.3. Produção de “slime” em microplaca

A produção de “slime” em microplaca foi avaliada qualitativamente e quantitativamente através de metodologia proposta por Christensen et al., 1985 e Cucarella et al., 2001, com modificações padronizadas em nosso laboratório.

Os isolados foram repicados em ágar sangue de carneiro por 24hs a 37°C e as colônias crescidas foram inoculadas em caldo tripticase soja (TSA - Britania) contendo 0,24% de glicose para estimular a produção do slime, e também incubada a 37°C por 24hs. A seguir, alíquotas de 0,2 mL desta suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços contendo o mesmo caldo e incubadas por 24 horas à 37°C sem agitação. Após incubação, este material foi desprezado e os poços foram lavados 2 vezes com 200µL de solução salina estéril, secos em estufa à 65°C por 1h e corado com 200µL de safranina 1% por 15 min. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 490nm em leitor de ELISA (BIO RAD MODEL 680). Poços não inoculados contendo caldo TSA com 0,24% de glicose serviram como branco. Os testes foram realizados em triplicata, a leitura avaliada em momentos diferentes (no dia em que foi realizada a coloração: 0DPC, um dia após a coloração: 1DPC e sete dias após a coloração: 7DPC) e uma média foi retirada dos valores obtidos em cada dia de leitura. Foram consideradas produtoras de biofilmes cepas com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al, 2000; VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006). A produção de “slime” foi considerada forte, moderada ou fraca, conforme mostrado no quadro 2.

Quadro 2: Classificação da produção de “slime” pelo método da microplaca

Produção de “slime”	Absorbância
Fraca	0,1 > 0,2
Moderada	0,2 > 0,3
Forte	> 0,3

4.3.4. Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo

As placas de ágar Vermelho Congo foram preparadas através da adição de 0,8g de Vermelho Congo e 36g de sacarose (Sigma) a cada 1L de ágar BHI (Britania). Os isolados foram semeados na superfície do ágar por esgotamento com alça bacteriológica e após 24hs a 37°C a coloração das colônias foi avaliada. Os isolados que produziram colônias coradas em preto ou cinza foram considerados “slime” positivo, enquanto que as colônias coradas em vermelho ou bordô foram classificadas como “slime” negativo, ou seja, não produtoras (ARCIOLA et al., 2001).

4.3.5. Produção de hemolisinas e sinergismo hemolítico (SHA)

A fim de detectar a produção de alfa (hemólise completa) e beta hemolisinas (hemólise incompleta), os isolados foram semeados através de estrias radiais em AS e incubados a 37°C por 24hs para posterior observação dos halos de hemólise formados (DEMO,1996). Nova leitura foi realizada após incubação a 4°C por 18hs (HUSEBY et al., 2007).

O SHA foi avaliado seguindo protocolo de Hebert & Hancock (1985) de forma que, uma cepa de *S. aureus* produtora de beta hemolisina foi inoculada verticalmente em ágar sangue (carneiro) e foram repicadas as cepas próximas a esta beta hemolítica sem tocá-la, no sentido horizontal. Uma zona de hemólise completa dentro da zona incompleta de beta hemolisina foi considerada como SHA positivo.

4.4. Detecção Genotípica dos Fatores de Virulência

4.4.1. Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizado segundo protocolo padronizado pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde cada colônia crescida em AMVF (MERCK) foi repicada em 5 mL de caldo BHI (MERCK). Após 18hs a 37°C, uma alíquota de 1,5 mL do caldo contendo o inóculo foi transferida para microtubos que foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 min, tal processo foi repetido três vezes, afim de se obter um pellet maior. Após duas lavagens com 500µl de tampão TE a 14.000 rpm por 1 min, ressuspendeu-se o pellet em 250µl de tampão de extração (NaCl 150mM; Tris-HCl 100mM e EDTA 20mM) e foi adicionada lisostafina (SIGMA) para concentração final de 20µg/ml (5µl de lisostafina – 1mg/ml). Após incubação à 37°C por 30 minutos, foi adicionado SDS 1% para concentração final de 3mg/ml. Os microtubos foram mantidos em banho-maria a 50°C por 1 hora e posteriormente incubados a -20°C por 10 min. Após centrifugação a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Foi adicionado a este o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturado por inversão por 5 min. Após nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 min, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionado NaCl para concentração final de 0,3M e misturado por inversão, acrescentado 2 volumes de etanol 100% e também misturado por inversão, seguido de incubação a -20°C por 2 horas ou overnight. Após isto, procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 30min e descarte do sobrenadante, o pellet foi lavado com 500µl de etanol 70% e colocado para secar à temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 30 µl de água mili-Q.

O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (UNISCIENCE) para quantificação do material genético, a partir da comparação deste com o DNA lambda nas concentrações de 25 e 50ng/µl. O material genético de todos os isolados foi utilizado na concentração de 10ng/µl para as etapas de amplificação dos genes de caracterização e virulência.

4.4.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 2,0 mM MgCl₂, 50 mM KCl e 0,1% Triton X-100, pH 9.0), 0,5mM de cada iniciador (BIONEER), 0,2 mM de dNTP (FERMENTAS), 2 U de DreamTaq™ Green DNA Polimerase (FERMENTAS) e água mili-Q para completar um volume total de 20µl de reação, contendo 2µl do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002) .

Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo corante SYBR Green (INVITROGEN) diluído. A diluição foi feita na proporção de 1 µL de solução estoque concentrada 10000X do corante para cada 10 mL de gel de agarose. Posteriormente, os géis foram visualizados em transiluminador ultra-violeta e documentados pelo câmara fotográfica (SONY - Modelo DSC-HX1), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (FERMENTAS).

4.4.2.1. Caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp.

Todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR multiplex de DNAr (*S. aureus*) (STRAUB et al., 1999) e *Staph* (*Staphylococcus* spp.) (ZHANG et al., 2004) para validação do DNA extraído e identificação de *S. aureus*, adicionalmente foi realizada a detecção do gene *coa* (KARAHAN & CETINKAYA, 2007). Foi realizado também a identificação genotípica de *S.intermedius* (*nuc* 3 e 4) (SILVA et al., 2003), e do SIG (*pta*) (BANNOEHR et al., 2009) independente dos resultados obtidos através das provas fenotípicas anteriormente realizadas. Os iniciadores e ciclos utilizados estão expostos no quadro 3.

Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação das espécies.

Gene (fragmento)	Espécies	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
DNAr (930 pb)	<i>S.aureus</i>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1
<i>Staph</i> (756 pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	1
<i>nuc</i> 3 e 4 (431pb)	<i>S.intermedius</i>	CGC CGT TCT CTC TTT GG CGC CTC TCA CAT CCG	2
<i>pta</i> (320 pb)	SIG	AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG	3

*1. 94°C 5 min (94°C 1 min, 55° C 1 min, 72°C 2 min) x 30 e 72°C 10 min; 2. (95°C 50s, 42°C 2 min, 72°C 4 min) x 40 e 72°C 1 min; 3. 95°C 2 min (95°C 1 min, 53°C 1 min, 72°C 1 min) e 72°C 7 min.

4.4.2.2. Genes de virulência de *Staphylococcus* spp

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação dos genes envolvidos na produção de “slime”, *icaA* e *icaD* (VASUDEVAN et al., 2003), da proteína ligante de fibronectina, *fnbA* e *fnbB*, da formação de cápsula, *cap5* e *cap8* (EL-SAYED et al., 2006) e PCR multiplex para os genes de produção de hemolisinas, *hla* e *hly* (NILSSON et al.,1999) em todos os *Staphylococcus* spp. Os iniciadores e ciclos utilizado estão expostos no quadro 4.

Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>hla</i> (210pb)	CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T	1
<i>hlb</i> (300pb)	GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT	1
<i>icaA</i> (1315pb)	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C	2
<i>icaD</i> (381pb)	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	2
<i>fnbA</i> (1279pb)	GCG GAG ATC AAA GAC AA CCA TCT ATA GCT GTG TGG	3
<i>fnbB</i> (812pb)	GGA GAA GGA ATT AAG GCG GCC GTC GCC TTG AGC GT	4
<i>cap5</i> (880pb)	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CTC GGA TAA CAC CTG TTG C	5
<i>cap8</i> (1147pb)	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CAC CTA ACA TAA GGC AAG	6

*1. 94°C 5min. (94°C 1min, 50°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min ; 2. (92°C 45s, 49°C 45s., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min; 3. (94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1min) x 30; 4. (94°C 30s, 50°C 30s, 72°C 1min); 5. (94°C 15s, 57°C 15s, 72°C 30s) x 20; 6. (94°C 15s, 52°C 15s, 72°C 30s) x 20

4.4.2.3. Genes de virulência de *Staphylococcus aureus*

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação do gene de coagulase, *coa* (KARAHAN & CETINKAYA, 2006), de proteína A, *spaA* (REINOSO, 2004) e de regulação de exoproteínas, *agr* (RNA III) (REINOSO, 2004) em *S.aureus*. Os iniciadores e ciclos utilizado estão expostos no quadro 5.

Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus aureus*.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>agr</i> (200pb)	CAT AGC ACT GAG TCC AAG GA CAA TCG GTG ACT TAG TAA AAT G	1
<i>spaA</i> (v**)	CAA GCA CCA AAA GAG GAA CAC CAG GTT TAA CGA CAT	2
<i>coa</i> (v**)	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	3

*1. 94°C 3min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 2. 94°C 3min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10min; 3. 94°C 4min. (94°C 1min, 58°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min.

**v: variável

4.5. Análise estatística

Os percentuais de sensibilidade, especificidade, dos testes fenotípicos dos fatores de virulência foram calculados considerando a presença dos genes *icaA* e *icaD* como predição para a produção de “slime”:

% Sensibilidade = verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos negativos

% Especificidade= verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos positivos

A associação entre os testes fenotípicos e genotípicos foi avaliada através do Teste de Qui-quadrado (X^2), com intervalo de confiança de 95% (IC=95%)

A normalidade dos dados relacionados à leitura fenotípica da produção de “slime” na microplaca foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, com intervalo de confiança de 95% (IC=95%).

A análise de variância dos mesmos dados foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95% (IC=95%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das espécies de *Staphylococcus* spp.

Após a semeadura de 272 amostras de leite, foi obtido um total de 250 isolados de *Staphylococcus* spp. (tabela 2), objeto deste estudo, além de outros microrganismos pertencentes a outros gêneros bacterianos e leveduras.

Tabela 2. Distribuição dos grupos de *Staphylococcus* spp. identificados por fazenda

Região	<i>Staphylococcus</i> spp.*				SIG
	ECN	ECP	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	
Rio Claro	78	33	14	6	4
Paracambi	19	3	16	5	0
Seropédica	25	5	5	1	0
Pirai	23	10	3	0	0
Total	145	51	38	12	4

*ECP: estafilococos coagulase-positiva; ECN: estafilococos coagulase-negativa; ECP (SIG): estafilococos coagulase-positivo pertencentes ao grupo de *Staphylococcus intermedius*.

A identificação fenogenotípica das espécies revelou 58% (145/250) de *Staphylococcus* spp coagulase-negativos e 42% (105/250) de *Staphylococcus* spp coagulase-positivos, através da amplificação dos genes *Staph* e *coa* (figura 5).

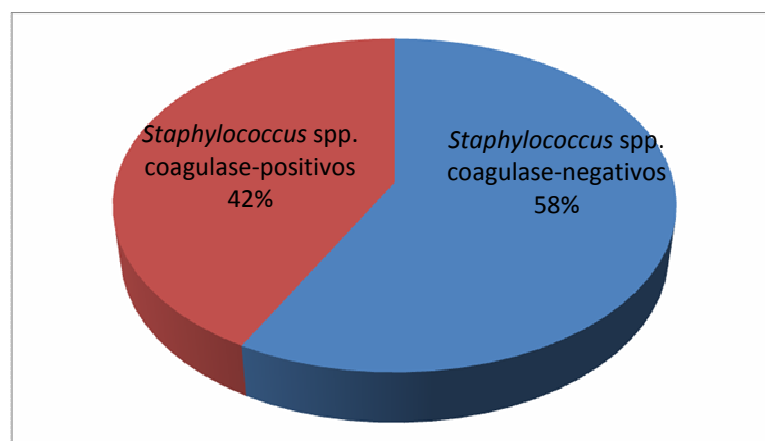


Figura 5. Gráfico apresentando o percentual de *Staphylococcus* spp. obtidos a partir de amostras de leite mastítico.

No ano 2000, Bes e colaboradores destacaram a importância de *Staphylococcus* não-*aureus* como agente causador de mastite bovina. Este grupo de estafilococos que ganhou maior importância na última década é conhecido por elevar a contagem de células somáticas (CCS) no leite, provocar perda da qualidade do mesmo e prejuízos econômicos (BES et al., 2000; PYORALA & TAPONEN, 2009).

A alta prevalência (145/250) de ECNs em todos os rebanhos estudados neste trabalho é um dado interessante já que fornece aporte aos resultados encontrados recentemente onde

ECNs tem sido identificados como causadores de mastite bovina em alguns países (PYORALA & TAPONEN, 2009; SANTOS et al., 2008, TAPONEN et al., 2006). Na Finlândia, ECNs representaram 50% do total de bactérias isoladas em um estudo que avaliou 12661 amostras de leite de 216 fazendas no país (PITKALA et al., 2004). A prevalência também foi elevada nos Estados Unidos e Eslovênia, onde o ECN foi responsável por 15% das infecções intramamárias pós-parto e 16% dos quartos positivos para o crescimento bacteriano, respectivamente (DINGWELL et al., 2004; HALTIA et al., 2006 in PYORALA & TAPONEN, 2009). Freitas e colaboradores (2005) isolaram 36% (172/477) de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos e apenas 13% (65/477) de *Staphylococcus aureus* em leite bovino no estado de Pernambuco. A bactéria prevalente nos casos de mastite clínica e subclínica de búfalas em rebanho no Pernambuco estudado foi o *Staphylococcus* spp., onde 80% das amostras foram coagulase negativa (CUNHA et al., 2006). Desse modo, o significado dos ECNs na mastite precisa ser reconsiderado.

As espécies mais frequentemente isoladas de ECNs variam de acordo com a região geográfica (SANTOS et al., 2008), uma vez que fatores ambientais como clima e temperatura poderão ser variáveis importantes para manutenção do microrganismo no meio. A alta prevalência de ECNs encontrada neste estudo embasou a elaboração de um projeto de caracterização fenogenotípica desses agentes e uma possível correlação com a ocorrência de mastites subclínicas.

Dentre as espécies coagulase-positivas identificadas obteve-se 36,2% (38/105) de *S.aureus*, 11,4% (12/105) de *S.intermedius* e 3,8% (4/105) de *Staphylococcus* spp coagulase positivos do grupo SIG, de acordo com o perfil bioquímico e a amplificação dos genes específicos de caracterização. Os demais 51 isolados foram fenotipicamente caracterizados como estafilococos coagulase-positivos, no entanto não amplificaram qualquer dos genes de caracterização específica utilizados: *DNAr* de *S.aureus*, *nuc3*, *nuc4* e *pta*. Desse modo, eles serão referenciados daqui por diante como ECP (figura 6). Em trabalho posterior desenvolvido pelo grupo de pesquisa, estes isolados serão submetidos à PCR para amplificação dos genes *nuc1* e *nuc2* (SILVA et al., 2003), para uma possível identificação de *S. hyicus*.

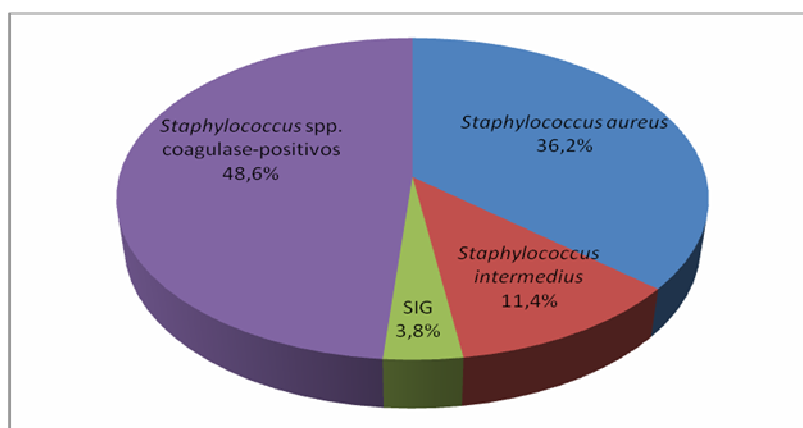


Figura 6. Gráfico apresentando o percentual de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos obtidos a partir de leite mastítico.

A eletroforese da reação de PCR multiplex do DNAr de *Staphylococcus* spp. e *S.aureus* produziu fragmentos únicos de 756 pb e 930 pb, respectivamente. O gene *nuc* de *S.intermedius* apresentou a banda esperada de 431pb (Silva et al., 2003). O gene *pta* de SIG amplificou um fragmento único de 320 pb, de acordo com Bannoehr e colaboradores (2009) (figura 7).

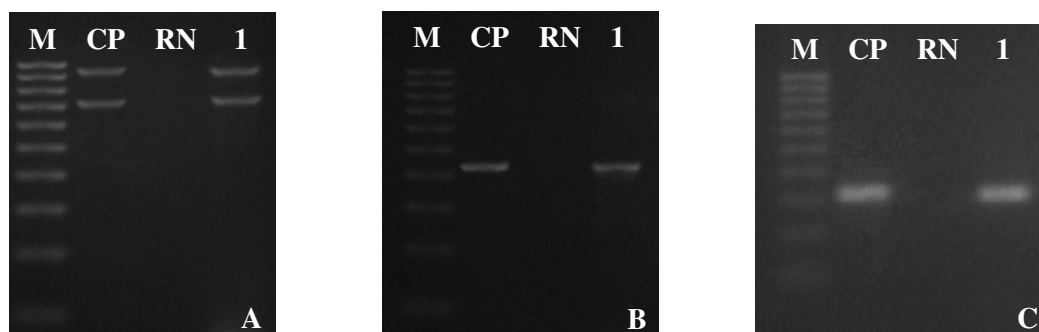


Figura 7. Genes *Staph* (756 pb) e DNAr de *S. aureus* (930 pb) (A), *nuc* 3 e 4 (431pb) (B) e *pta* (320 pb) (C). A: M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, RN: controle negativo e 1: Isolado positivo para os genes *Staph* e DNAr de *S. aureus*. B: M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, RN: controle negativo e 1: Isolado positivo para *nuc* 3 e 4. C: M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, RN: controle negativo e 1: Isolado positivo para *pta*.

Este resultado corrobora com trabalho desenvolvido por Santos (2006) onde foi relatado que a prevalência de *Staphylococcus aureus* foi de 43,24% entre os 74 isolados de estafilococos coagulase-positivos analisados a partir de amostras de oito propriedades leiteiras do município de Uberlândia, estado de Minas Gerais. O *Staphylococcus aureus* é reconhecido como sendo um dos patógenos mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica, relacionado entre os microrganismos mais contagiosos, sendo responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira (FERREIRA et al., 2006). Possui vários fatores de virulência que contribui para sua persistência no tecido mamário e, embora medidas preventivas que visam o controle das mastites sejam amplamente praticadas, as mastites causadas por este patógeno ainda são bastante comuns (FREITAS et al., 2005).

Kloos & Bannerman (2003) destacaram a presença de outras espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos, como por exemplo, *Staphylococcus intermedius* como patógenos oportunistas em animais (apud. SANTOS, 2006). Moroni e colaboradores (2006) verificaram prevalência de 12,20% de *Staphylococcus intermedius* das 82 amostras de mastite bovina avaliadas, enquanto Coelho (2008) verificou prevalência de 22% em 150 estafilococos coagulase-positivos analisados. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo e a ocorrência de *Staphylococcus intermedius* em quadros de mastite está relacionada à aproximação entre animais domésticos e o bovino leiteiro (COELHO, 2008).

Os *Staphylococcus intermedius* foram durante muito tempo considerados como principais responsáveis por infecções em animais, principalmente cães. No entanto, através de técnica genotípica foi possível identificar um grupo de *Staphylococcus intermedius* (SIG) que inclui as espécies de *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini*, e que antes eram identificados como *Staphylococcus intermedius* através das técnicas fenotípicas convencionais. As espécies *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini* tem emergido como patógeno comum de diversas infecções em humanos e animais (BANNOEHR et al., 2009).

5.2. Fatores de virulência em *Staphylococcus* spp.

5.2.1. Distribuição geral dos fatores de virulência em *Staphylococcus* spp.

Todos os isolados foram submetidos aos testes de produção de fatores de virulência bem como à detecção dos genes relacionados (tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos fatores de virulência nos *Staphylococcus* spp. isolados de leite mastítico.

Percentual dos Fatores de Virulência**		<i>Staphylococcus</i> spp.*				
		ECN	ECP	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	ECP (SIG)
Fatores Fenotípicos	<i>Sli</i>	74,5	84,3	81,6	58,3	75,0
	<i>SHA</i>	44,0	31,4	18,4	16,7	75,0
	<i>Hem</i>	9,0	9,8	31,6	16,6	25,0
	<i>DNa</i>	26,2	27,5	36,8	16,7	0
	<i>Cas</i>	66,9	66,7	68,4	66,7	25,0
Fatores Genotípicos	<i>icaA</i>	4,1	7,8	63,2	25,0	25,0
	<i>icaD</i>	8,3	23,5	63,2	33,3	25,0
	<i>hla</i>	4,8	11,8	78,9	33,3	25,0
	<i>hlb</i>	4,1	11,8	73,7	33,3	25,0
	<i>cap5</i>	0,7	2,0	15,8	8,3	25,0
	<i>cap8</i>	1,4	0	21,1	0	0
	<i>fnbA</i>	23,4	31,4	73,7	25,0	25,0
	<i>fnbB</i>	1,4	2,0	18,4	8,3	0

* ECP: estafilococos coagulase-positivo; ECN: estafilococos coagulase-negativo; (SIG): estafilococos coagulase-positivo pertencentes ao grupo de *Staphylococcus intermedius*.

** *Sli*: “slime”, *Hem*: hemolisina, *SHA*: sinergismo hemolítico, *DNa*: DNase, *Cas*: caseinase

De acordo com estes resultados, observou-se que *S. aureus* foi a espécie que apresentou maior expressão fenotípica de fatores de virulência, bem como maior diversidade de genes relacionados à codificação desses fatores. Os *S. aureus* têm capacidade de produzir um grande número de fatores de virulência, os quais são finamente regulados pelo sistema *agr*. Acredita-se que essa complexa e intrincada rede reguladora possa ser responsável pela extraordinária capacidade de adaptação da bactéria aos diferentes nichos do organismo e, ainda, pela modulação de sua patogenicidade, tornando assim esses microrganismos extremamente versáteis como agentes de diversas enfermidades (CRUZ, 2008).

5.2.2. Fatores de virulência avaliados por expressão fenotípica

5.2.2.1. Produção de Caseinase

A produção de caseinase foi significativa nos isolados avaliados, com exceção do grupo SIG, sendo 66,9% em ECN (97/145), 68,4% em *S. aureus* (26/38), 66,7% em ECP (34/51), e em *S. intermedius* (8/12).

A caseína é a principal fonte protéica do leite e estes dados refletem a capacidade desses microrganismos assimilarem essa proteína como fonte de aminoácidos em sua nutrição. Possuir proteases, neste caso, pode ser fundamental para a sobrevivência do microrganismo no hospedeiro e não está associada à agressividade da bactéria. Sendo assim, hipotetiza-se que por um processo de seleção natural as bactérias que tinham a capacidade de produzir esta enzima foram selecionadas para este ambiente e que esta capacidade conferiu vantagem adaptativa a essas bactérias em detrimento das bactérias que não possuíam esta característica. Pode-se inferir que mesmo uma bactéria com pouco potencial virulento, como é o caso de algumas cepas de ECNs poderiam possuir esta característica tanto quanto cepas de *S. aureus* extremamente agressivas, já que essa característica reflete a adaptação desses microrganismos ao meio e sua capacidade de sobrevivência.

A produção de caseinase está diretamente relacionada à qualidade do leite, uma vez que em estudos cuja redução da proporção relativa de caseína no leite mastítico foi detectada, existem evidências de que esta produção pode ocorrer ainda no interior do úbere durante as ordenhas (ZAFALON et al., 2008).

5.2.2.2. Produção de Desoxirribonuclease (DNase)

A produção de DNase foi de 36,8% em *S. aureus* (14/38), 27,5% em ECP (14/51), 26,2% em ECN (38/145), e 16,7% em *S. intermedius* (2/12), não sendo detectada em SIG (0%) (figura 8).

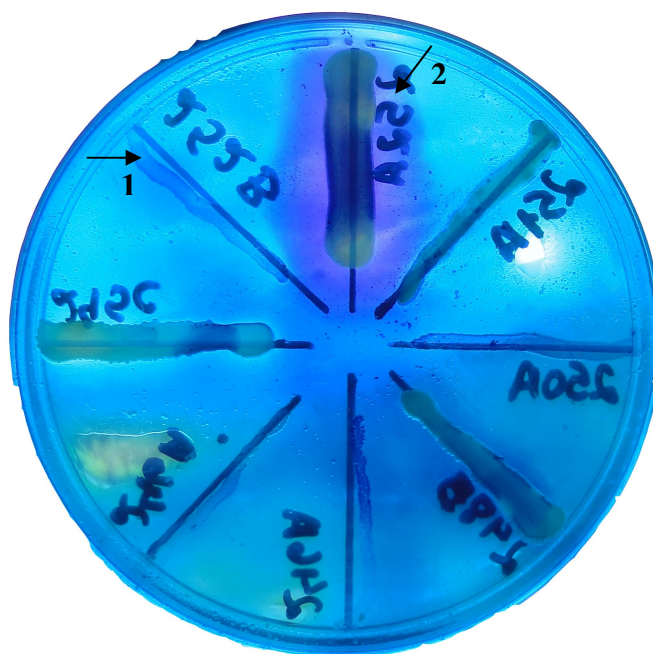


Figura 8. Produção de DNase. 1: isolado negativo (indicado pela seta) e 2: isolado positivo (indicado pela seta).

A detecção da atividade de DNase é muitas vezes usada como um marcador substituto para a identificação de estafilococos coagulase-positivos e particularmente de *S. aureus* em amostras de leite (KONEMAN et al, 2008). No entanto, a especificidade deste teste para termonucleases não é totalmente satisfatório, porque fraca atividade de DNase pode ser detectada em espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (BOERLIN et al., 2003), conforme foi observado neste trabalho.

No presente estudo, pode-se verificar maior produção de DNase entre *S. aureus* em concordância com a literatura (KATEETE et al., 2010). Do ponto de vista da virulência, a DNase é tão importante quanto a coagulase para o estabelecimento da infecção e sua detecção distingue estafilococos patogênicos de não patogênicos da microbiota (CITAK et al., 2003).

5.2.3. Fatores de virulência avaliados por caracterização genotípica

5.2.3.1. Amplificação dos genes *fnbA* e *fnbB*

O gene *fnbA* (1279pb) foi amplificado de 73,7% (28/38) dos *S. aureus*, seguido de 31,4% (16/51) dos ECPs, 25,0% (3/12) dos *S. intermedius* e dos SIG (1/4), respectivamente e 23,4% (34/145) dos ECNs. O gene *fnbB* (812pb) foi amplificado de 18,4% (7/38) dos *S. aureus*, seguido de 8,3% (1/12) dos *S. intermedius*, 2,0% (1/51) dos ECPs e 1,4% (2/145) dos ECNs, não tendo sido detectado em SIG (0%) (figura 9).

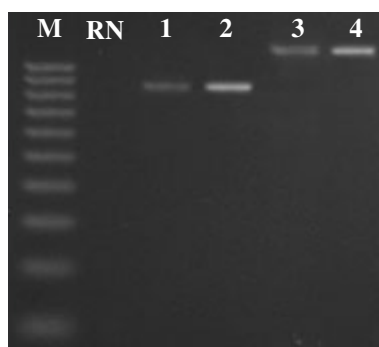


Figura 9. Gene *fnbA* (1279pb) e *fnbB* (812pb) em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5%. M: marcador de peso molecular (100pb), RN: isolado negativo, 1: controle positivo para *fnbB*, 2: isolado positivo para *fnbB*, 3: controle positivo para *fnbA*, 4: isolado positivo para o gene *fnbA*.

Em trabalho desenvolvido por El-Sayed e colaboradores (2006), ao avaliar 40 isolados de *S. aureus* oriundos de mastite clínica e subclínica no México, 100% foram *fnbA* positivos e 60% foram positivos para *fnbB*. Rabello (2007) amplificou 100% de *fnbA* e 20,7% de *fnbB* em 227 amostras de *S. aureus* oriundos de mastite clínica e subclínica de rebanhos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro. Estes trabalhos corroboram com os resultados encontrados em nosso estudo, onde 73,7% e 18,4% dos *S. aureus* amplificaram os genes *fnbA* e *fnbB*, respectivamente. A baixa prevalência do gene *fnbB* sugere que ele não tenha um papel fundamental no estabelecimento da mastite (RABELLO, 2007).

Estudos apontam para o fato de que a aderência a fibronectina não difere entre amostras com um ou dois genes de *fnb* (PEACOCK et al., 2000). Greene e colaboradores (1995) em experimento *in vitro* demonstraram que cepas de *S. aureus* mutantes para *fnbA* ou *fnbB* não mostraram redução significativa de adesão. No entanto, o duplo mutante (*fnbA* e *fnbB*) foi completamente defeituoso em se aderir à superfície.

5.2.3.2. Amplificação dos genes *cap5* e *cap8*

É consenso entre os autores que a maioria das cepas isoladas de leite bovino podem classificar-se nos tipos capsulares 5 e 8 (O'RIORDAM & LEE, 2004; ZHAO et al., 2010), justificando a utilização destes dois tipos no presente trabalho. Contudo, a prevalência destes tipos capsulares de bactérias isoladas de amostras de leite mastítico pode ser variável. No presente trabalho, o gene *cap5* (880 pb) (figura 10) foi amplificado de 25,0% dos SIG (1/4), 15,8% dos *S. aureus* (6/38), 8,3% dos *S. intermedius* (1/12), 2,0% dos ECPs (1/51) e 0,7% dos ECN(1/145). O gene *cap8* (1147 pb) (figura 10) foi amplificado de 21,1% dos *S. aureus* (8/38), seguido de 1,4% dos ECNs (2/145), não tendo sido detectado em *S. intermedius*, SIG e ECP (0%).

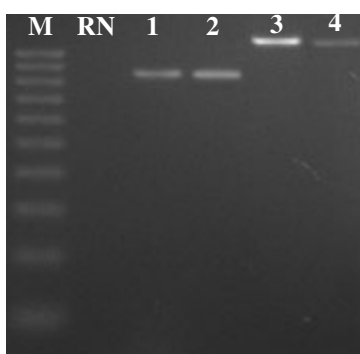


Figura 10. Gene *cap5* (880pb) e *cap8* (1147pb) em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5%. M: marcador de peso molecular (100pb), RN: isolado negativo, 1: controle positivo para *cap5*, 2: isolado positivo para *cap5*, 3: controle positivo para *cap8*, 4: isolado positivo para o gene *cap8*.

Em trabalho desenvolvido por El-Sayed e colaboradores (2006), 82,5% (33/40) das cepas de *S. aureus* foram *cap5* positivas, enquanto 17,5% (7/40) foram positivas para *cap8*. Em Tollersrud e colaboradores (2000), foi amplificado 14,9% (54/362) de *cap5* e 27,1% (98/362) de *cap8* de *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite bovina dos Estados Unidos e Europa. Apesar de Reinoso e colaboradores (2008) ter detectado 60% (9/15) de *cap5* em cepas de *S. aureus* oriundos de mastite, na Argentina, a maioria das cepas de *S. aureus* são acapsulares sugerindo a ausência ou perda dos genes *cap5* e *cap8* que codificam esta característica (TUCHSCHERR et al., 2005).

A distribuição deste fator de virulência pelos países demonstra que a produção de cápsula tem importância variada no desenvolvimento da infecção nestas regiões, não constituindo um ponto único possível de intervenção no controle das mastites, uma vez que tem sido proposta a imunização através destes antígenos capsulares (DAUM & SPELLBERG, 2011).

A presença de *cap5* e *cap8* pode variar de acordo com a região geográfica (EL-SAYED et al., 2006). A sua expressão é modulada e dependente da fase de crescimento bacteriano, o que pode permitir a expressão do fenótipo mais vantajoso durante o processo infeccioso, sendo uma característica importante para a sobrevivência de *S. aureus* em diferentes nichos (RABELLO, 2007).

Os genes codificadores de fatores de virulência estão geralmente armazenados em plasmídeos que podem ser adquiridos ou perdidos de acordo com a pressão de seleção exercida pelo meio (RABELLO, 2007) justificando os 72% (180/250) de isolados negativos no presente trabalho.

5.2.4. Fatores de virulência avaliados por caracterização fenogenotípica

5.2.4.1. Produção de “slime” e amplificação dos genes *icaA* e *icaD*

Após a execução da técnica de microplaca para todos os *Staphylococcus* spp, não foi observada diferença significativa, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, entre as médias das leituras realizadas em diferentes momentos (0DPC, 1DPC e 7DPC) para cada um dos isolados bacterianos analisados (Anexo I). Considerando isolados positivos ou negativos para a produção de “slime” e desconsiderando a intensidade da produção, foi possível observar um número elevado de *Staphylococcus* spp. produtores. Um total de 84,3% dos ECPs (43/51) foi produtor, seguido de 81,6% dos *S. aureus* (31/38), 75,0% dos SIG (3/4), 74,5% dos ECNs (108/145) e 58,3% dos *S. intermedius* (7/12), sugerindo um alto potencial destes isolados em utilizar o mucopolissacarídeo na adesão ao tecido glandular mamário.

Embora tenha sido realizada como prova de triagem, a detecção de “slime” em ágar vermelho congo mostrou ser uma prova muito subjetiva, com baixa reprodutibilidade e por isso, estes resultados foram desconsiderados nesta análise.

A maioria dos relatos da produção de “slime” considera isolados obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes humanos portadores de cateteres, como Bernardi e colaboradores (2007) que detectaram 81,4% de produtores de “slime” em 27 ECNs isolados de cateteres venosos e Gad e colaboradores (2009) que encontraram percentuais de 83,3% em 18 *S. aureus* e 88,6% em 35 *S. epidermidis* de amostras de cateter de trato urinário.

O “slime” facilita a adesão dos *Staphylococcus* spp. ao tecido do hospedeiro e agregação célula-célula, favorecendo a formação do biofilme. O biofilme é caracterizado por uma comunidade microbiana onde há troca de nutrientes e água entre as células e, pode ser formado por uma única espécie ou por espécies diferentes. No biofilme, as bactérias são menos suscetíveis ao tratamento por antibióticos e a ação do sistema imune inato do hospedeiro. A capacidade de formação de biofilmes é fonte de estudo tanto na medicina humana quanto veterinária e a melhor compreensão desta característica fornece subsídios para a aplicação de medidas de tratamento mais eficaz na mastite bovina (MELCHIOR et al., 2006). A detecção de cepas de *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme é um procedimento relevante na avaliação dos fatores de virulência presente em patógenos causadores de mastite (OLIVEIRA ET AL., 2006).

Estudos da produção de “slime” em isolados animais permitem a compreensão do papel deste fator na etiopatogenia das infecções que os acometem. Turkeyilmaz & Eskişimşirli (2006) estudaram a produção de “slime” em 180 isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de amostras animais de diferentes quadros clínicos. Estes autores encontraram produção de “slime” de 55,5% no teste em microplaca. Mork e colaboradores (2005) ressaltam a importância da produção de “slime” como fator de patogenicidade, o qual garante a instalação e manutenção bacteriana no tecido glandular mamário. A camada de “slime” dificulta a fagocitose por células do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, a produção de “slime” também está associada à infecções por ordenhadeiras mecânicas, pois este muco polissacarídeo facilita a adesão bacteriana à biomateriais, o qual não é removível mesmo após lavagens sucessivas (DEGO et al., 2002).

A variação na expressão gênica produz intensidades diferentes de coloração e formação de três grupos produtores de “slime”: fraco-produtor, produtor moderado e forte produtor, observáveis ao teste fenotípico de detecção de “slime” em microplaca (figura 11). Em nosso estudo esta variação ocorreu em todos os grupos de *Staphylococcus* spp. estudados, não mostrando associação com a espécie (tabela 4).

Tabela 4. Níveis de produção de “slime” em microplaca de *Staphylococcus* spp. (n=250) isolados de mastite bovina.

<i>Staphylococcus</i> spp.*	Produção de “slime”**			
	Ausente	Fraco	Moderado	Forte
<i>ECN</i>	25,5% (n=37)	33,8% (n=49)	11,0%(n=16)	29,7% (n=43)
<i>ECP</i>	15,7% (n=8)	33,3%(n=17)	15,7%(n=8)	35,3%(n=18)
<i>S.aureus</i>	18,4% (n=7)	36,8%(n=14)	15,8%(n=6)	29%(n=11)
<i>S. intermedius</i>	41,7%(n=5)	33,3% (n=4)	8,3%(n=1)	16,7%(n=2)
<i>SIG</i>	25%(n=1)	0% (n=0)	50%(n=2)	25% (n=1)

*ECP: estafilococos coagulase-positiva; ECN: estafilococos coagulase-negativo; ECP (SIG): estafilococos coagulase-positivo pertencentes ao grupo de *Staphylococcus intermedius*.

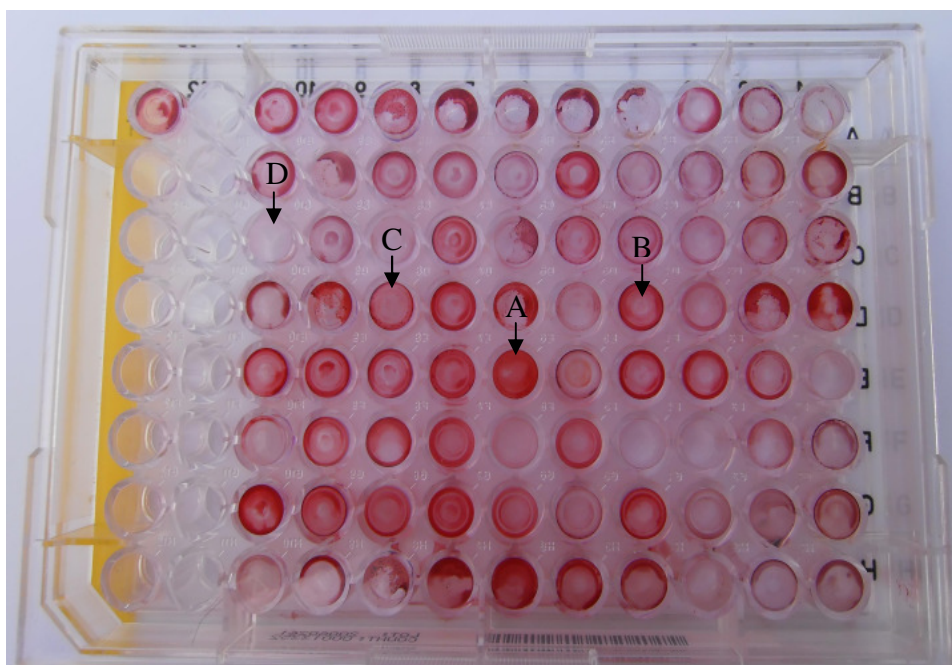


Figura 11. Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. A- isolado forte produtor, B- isolado produtor moderado, C- isolado fraco produtor, D- isolado não produtor.

Ziebuhr e colaboradores (1999) demonstrou que a variação do fenótipo da produção de biofilme em *S. epidermidis*, ocorreu por inativação de *icaC* por inserção do transposon *IS256*. Handke e colaboradores (2004) demonstraram dois mecanismos que governam a variação fenotípica: a mutação (no gene *icaD* e na região terminal do gene *icaA*) e regulação da transcrição do operon *ica*. A variação fenotípica da expressão do biofilme não é somente um mecanismo de liga e desliga, mas é reversível e pode ser afinada para gerar níveis variados de síntese do biofilme (HANDKE *et al*, 2004).

Quanto à presença dos genes *icaA* (1315pb) e *icaD* (381pb), foi encontrado um percentual de 4,1% (6/145) e 8,3% (12/145) em ECNs, 7,8% (4/51) e 23,5% (13/51) em ECPs, 63,2% (24/38) e 63,2% (24/38) em *S. aureus*, 25,0% (3/12) e 33,3% (4/12) em *S. intermedius* e 25,0% (1/4) e 25,0% (1/4) em SIG, respectivamente. O percentual encontrado

de *Staphylococcus* spp. positivos para ambos os genes foi de 11,2% (28/250) (figura 12, tabela 5).

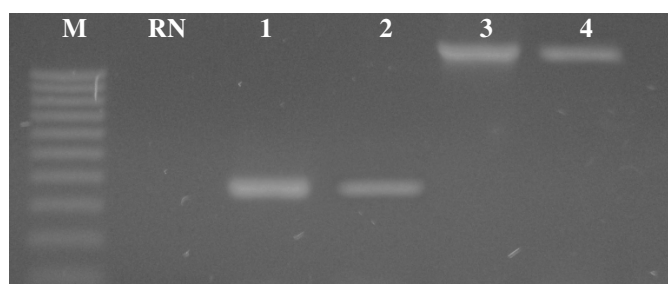


Figura 12. Genes *icaA* (1315pb) e *icaD* (381pb) em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5%. M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa; 1: controle positivo para *icaD*, 2: isolado positivo para *icaD*, 3: controle positivo para *icaA*, 4: isolado positivo para *icaA*.

Tabela 5. Produção de “slime” e presença dos genes *icaA* e *icaD* em *Staphylococcus* spp. (n=250) isolados de mastite bovina.

Produção de “slime”	Genes*		Nº de isolados (%)
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	
Ausente	-	-	45(18)
Ausente	+	+	7(2,8)
Ausente	-	+	4(1,6)
Ausente	+	-	2(0,8)
Fraco	-	-	60(24)
Fraco	+	+	12(4,8)
Fraco	-	+	9(3,6)
Fraco	-	+	4(1,6)
Moderado	-	-	24(9,6)
Moderado	+	+	5(2)
Moderado	-	+	4(1,6)
Forte	-	-	56(22,4)
Forte	-	+	10(4)
Forte	+	-	4(1,6)
Forte	+	+	4(1,6)

* +: positivo, -: negativo.

Dos isolados avaliados apenas 2,8% (7/250) foram positivos para ambos os genes e negativos para a produção de “slime” em microplaca. E um total de 56% (140/250) dos isolados foram negativos para ambos os genes e positivos para a produção de “slime” em microplaca. A baixa amplificação dos genes *icaA* e *icaD* em contraposição a alta expressão de

“slime” pode ser explicada pelo fato de existirem outros mecanismos genéticos envolvidos na adesão e que, em análise posterior deverão ser testados como a detecção do gene *bap*, que é o codificador da proteína de superfície Bap cuja função é auxiliar na adesão intercelular e formação do biofilme e foi primariamente estudada em isolados provenientes de mastite bovina (CUCARELLA et al., 2001). Outra justificativa pode ser a presença de um fator independente do operon *icaA*DBC que pode ser necessário para a síntese de polissacarídeo e acumulação do biofilme (DOBINSKI et al., 2003).

A produção de “slime”, detectada pela técnica de microplaca, foi avaliada quanto a sua sensibilidade e especificidade considerando a presença de ambos os genes *icaA* e *icaD* como teste padrão, através da análise estatística realizada pelo teste do X^2 . Devido à elevada positividade de produção “in vitro” a sensibilidade também se mostrou elevada (80%). Já a especificidade foi inferior a 30% demonstrando que esta técnica apresenta dificuldade em detectar isolados negativos. Uma das explicações plausíveis pode ser a possível deposição de corante agregado ao poliestireno causando efeito de positividade visual e detectável em leitura por espectrofotometria. Porém a redução do tempo de incubação para evitar o excesso de corante depositado não é recomendada uma vez que o polissacarídeo relacionado à aderência ao substrato de poliestireno é expresso em quantidade significativa somente após incubações de 24h (KREPSKY et al., 2003).

Como citado anteriormente, outros genes parecem estar também relacionados à produção de “slime” e serão futuramente detectados de modo a aumentar a confiabilidade da análise da acurácia da técnica de microplaca.

5.2.4.2. Produção de hemolisinas e amplificação dos genes *hla* e *hlb*

Dos isolados avaliados quanto à produção de hemolisinas, apenas 13,2% (33/250) foram hemolíticos (figura 13). Destes, 48,5% (16/33) apresentaram hemólise total, 36,4% (12/33) hemólise parcial e 15,1% (5/33) hemólise total e parcial. Na tabela 6 é possível analisar o perfil hemolítico das espécies avaliadas.

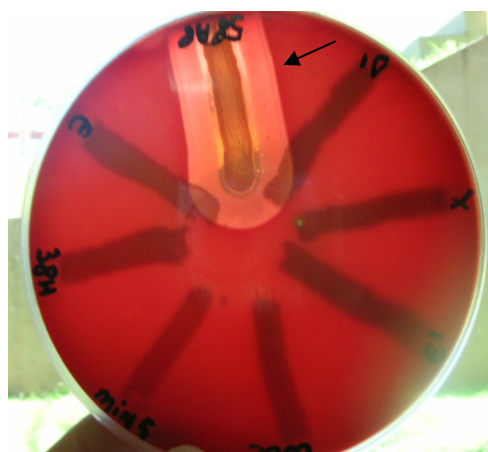


Figura 13. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. A seta indica um isolado produtor de alfa e beta hemolisinas em placa de ágar sangue apresentando outros isolados negativos para a produção de ambas as hemolisinas.

Tabela 6. Produção de hemolisinas em *Staphylococcus* spp. (n=250) isolados de mastite bovina.

<i>Staphylococcus</i> spp.*	Produção de hemolisinas**			
	NH	PAR	TOT	PAR/TOT
<i>ECN</i>	91%(n=132)	2,8%(n=4)	4,8%(n=7)	1,4%(n=2)
<i>ECP</i>	90,2%(n=46)	2%(n=1)	3,9%(n=2)	3,9%(n=2)
<i>S.aureus</i>	68,4%(n=26)	13,2%(n=5)	15,8%(n=6)	2,6%(n=1)
<i>S. intermedius</i>	83,4%(n=10)	8,3%(n=1)	8,3%(n=1)	0%(n=0)
<i>ECP (SIG)</i>	75%(n=3)	25%(n=1)	0%(n=0)	0%(n=0)

*ECP: estafilococos coagulase-positiva; ECN: estafilococos coagulase-negativa; ECP (SIG): estafilococos coagulase-positivo pertencentes ao grupo de *Staphylococcus intermedius*.

** PAR/TOT: parcial e total, PAR: parcial, TOT: total, NH: não hemolítico.

A produção de hemolisinas está relacionada a patogenicidade das amostras de *Staphylococcus* spp. Larsen e colaboradores (2002) sugerem que cepas de *Staphylococcus* spp. produtoras de hemólise parcial são mais virulentas ao gado que, cepas não hemolíticas. A hemólise parcial, em *Staphylococcus* spp., é representada pela beta-hemolisina, uma enzima que apresenta atividade de esfingomielinase, destruindo membranas celulares ricas em esfingomielina, sendo tóxica para vários tipos celulares apresentando grande importância nos casos de mastite uma vez que o úbere é rico em esfingomielina (COELHO, 2009; LINEHAN et al., 2003).

ECNs foram os menos produtores apresentando 91,0% (132/145) dos isolados não-hemolíticos. Chapman e colaboradores (1934) reportaram estafilococos que não produziam nenhum tipo de hemolisina, no que se concluiu que este não seria um critério absoluto para sua patogenicidade. Silva & Cardoso (2000) apontam que, amostras não hemolíticas também podem ser isoladas de casos de mastite bovina. Em estudo realizado com cepas de *Staphylococcus* spp. demonstrou que todas as amostras analisadas eram fracas produtoras de alfa-hemolisina. A alfa-toxina é letal e sua expressão reduzida pode estar associada a vantagens adquiridas em termos de colonização e transmissibilidade (SABERSHEIKH & SAUDERS, 2004 in CABOCLO, 2008).

O fenômeno de sinergismo hemolítico foi positivo em 36,8% (92/250) dos isolados, conforme pode ser verificado na tabela 7.

Tabela 7. Produção de sinergismo hemolítico em espécies de *Staphylococcus* spp. (n=250) isolados de mastite bovina.

<i>Staphylococcus</i> spp. *	Sinergismo hemolítico**		
	-	+	NA
<i>ECN</i>	51%(n=74)	44%(n=64)	5%(n=7)
<i>ECP</i>	64,7%(n=33)	31,4%(n=16)	3,9%(n=2)
<i>S.aureus</i>	65,8%(n=25)	18,4%(n=7)	15,8%(n=6)
<i>S. intermedius</i>	75%(n=9)	16,7%(n=2)	8,3%(n=1)
<i>ECP (SIG)</i>	25%(n=1)	75%(n=3)	0%(n=0)

*ECP: estafilococos coagulase-positiva; ECN: estafilococos coagulase-negativa; ECP (SIG): estafilococos coagulase-positivo pertencentes ao grupo de *Staphylococcus intermedius*.

** +: positivo, -: negativo, NA: não avaliado.

Dentre as espécies avaliadas observou-se que *S. aureus* apresentaram baixo percentual de sinergismo hemolítico 18,4% (7/38), enquanto ECNs apresentaram percentual de 44,1% (64/145) de positividade. ECNs foram também o grupo de *Staphylococcus* spp. que apresentaram a menor produção de hemolisinas, 9,0% (13/145) apenas. Isolados não hemolíticos com produção de sinergismo podem ser portadores da delta hemolisina, a qual é expressa somente na presença da beta-hemolisina (REINOSO, 2004).

Acredita-se que o fenômeno de sinergismo hemolítico é independente da produção de hemolisinas, porém sua ação é considerada potencializadora para isolados que são hemolíticos, especialmente em *Staphylococcus aureus*, pois permite uma melhor colonização do úbere por estes microrganismos (WATTS, 1988).

Através da técnica de PCR multiplex, os genes *hla* e *hlb* (210pb e 300 pb, respectivamente) (figura 14) foram amplificados em 15,2% (38/250) e 18,0% (45/250) dos *Staphylococcus* spp. avaliados, respectivamente.

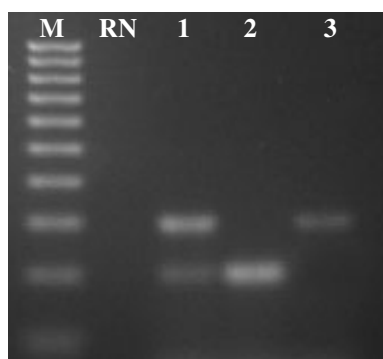


Figura 14. Genes *hla* (210pb) e *hlb* (300pb) em *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina, através do PCR multiplex (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa, 1: isolado positivo para ambos os genes; 2: isolado positivo para o gene *hla*; 3: isolado positivo para o *hlb*.

Dos isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados (n=250) apenas 3,6% (9/250) foram produtores de hemólise total e apresentaram o gene *hla*, 2,8% (7/250) foram produtores de hemólise parcial e apresentaram o gene *hlb* e 0,8% (2/250) dos isolados apresentaram os genes *hla* e *hlb* e foram produtores de alfa e beta hemolisinas. Em 7,2% (18/250) dos isolados foi detectada a produção de algum tipo de hemolisina, mas não amplificou para nenhum dos genes, o que sugere o envolvimento de outros marcadores genéticos, possivelmente relacionados à expressão destas toxinas, que não foram amplificados no presente trabalho. Dos isolados avaliados, 14,4% (36/250) não expressaram hemolisina, porém foram positivos para pelo menos um gene. Este fato pode ser explicado pela não expressão dos genes nas condições “in vitro” fornecidas. E 72,4% (181/250) não expressaram nenhum tipo de hemolisina e não amplificaram para os genes estudados (tabela 8).

Tabela 8. Produção de hemolisinas e presença dos genes *hla* e *hlb* em *Staphylococcus* spp. (n=250) isolados de mastite bovina.

Tipos de Hemolisinas*	Genes**		Nº de isolados (%)
	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	
PAR/TOT	-	-	3(1,2)
PAR/TOT	+	+	2(0,8)
PAR	-	-	4(1,6)
PAR	+	-	1(0,4)
PAR	+	+	7(2,8)
TOTAL	-	-	11(4,4)
TOTAL	+	+	5(2)
NH	-	-	181(72,4)
NH	-	+	3(1,2)
NH	+	-	5(2)
NH	+	+	28(11,2)

* PAR/TOT: parcial e total, PAR: parcial, TOT: total, NH: não hemolítico.

** +: positivo, -: negativo.

5.3. Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. por regiões de estudo

Após a avaliação da prevalência dos fatores de virulência analisados de forma separada e considerando as espécies identificadas, as regiões foram caracterizadas quanto à presença de isolados potencialmente virulentos (tabela 9).

Tabela 9. Comparação dos fatores de virulência nas regiões de estudo.

Fatores de virulência	Regiões			
	Rio Claro (n=135)	Piraí (n=36)	Paracambi (n=43)	Seropédica (n=36)
“Slime”	72,6	86,1	65,1	97,2
<i>icaA</i>	12,6	5,5	37,2	8,3
<i>icaD</i>	16,3	22,2	39,5	19,4
SHA	50,4	22,2	11,6	30,5
Hemolisina	8,9	2,8	27,9	22,2
<i>hla</i>	12,6	11,1	51,2	13,9
<i>hlb</i>	12,6	8,3	46,5	13,9
Dnase	25,2	36,1	27,9	25,0
Caseinase	60,7	88,9	62,8	69,4
<i>cap5</i>	3,7	5,5	7,0	0,0
<i>cap8</i>	0	0	14,0	11,1
<i>fnbA</i>	25,2	27,8	69,8	22,2
<i>fnbB</i>	4,4	0	11,6	0,0

Nas quatro regiões de estudo (Rio Claro, Pirai, Paracambi e Seropédica), os fatores de virulência com elevada prevalência foram a produção de “slime” e de caseinase. Estes podem ser, portanto os fatores que caracterizam as cepas circulantes nestas regiões.

O “slime” está intimamente ligado a aderência ao epitélio glandular mamário, sendo indispensável nas etapas iniciais de adesão. Na região de Paracambi pode-se observar que apesar de elevado, a produção de “slime” (65,1%) foi a menor das quatro regiões. Isto pode ser explicado pela amplificação de 69,8% do gene codificador da proteína ligante de fibronectina. Esta proteína também facilita a adesão e está relacionada à formação de biofilme.

A região de Paracambi foi a que apresentou elevada prevalência de todos os fatores de virulência quando comparado às outras regiões e uma maior detecção dos genes de fibronectina e cápsula, reflexo da alta incidência de *Staphylococcus aureus*. Esta espécie, quando associada à mastite bovina, é caracterizada por apresentar uma alta variação de genes de virulência, bem como uma considerável diversidade populacional. Sendo que, alguns genes codificadores de fatores de virulência são frequentemente detectados, enquanto outros são ausentes ou raramente estão presentes (OTE et al., 2011).

Frente a estes dados, pode-se concluir que a grande sobreposição entre fatores de virulência pode não ser funcional, sendo necessários apenas alguns destes fatores para o desenvolvimento do processo infeccioso (ITHIER et al., 2010).

5.4. Perfis dos fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. por regiões de estudo

A partir dos resultados obtidos dos testes fenotípicos e genotípicos dos fatores de virulência foi possível estabelecer 105 perfis distintos, dificultando o estabelecimento de clones específicos circulantes em cada região (Anexo II). Apenas os ECNs com perfil cuja característica é a positividade para caseinase e produção de “slime” (Perfil 1) se apresentaram prevalentes em todas as regiões (tabela 10). Este perfil também foi detectado com elevada prevalência em isolados de *S.aureus* da região de Rio Claro e ECPs das regiões de Rio Claro e Pirai, apontando para a importância destes fatores de virulência no desenvolvimento da mastite.

Tabela 10. Distribuição dos perfis nas regiões estudadas

<i>St. spp.*</i>	Regiões							
	Rio Claro (n=135)		Piraí (n=36)		Paracambi (n=43)		Seropédica (n=36)	
ECN (n=145)	Perfis	(n=78)	Perfis	(n=23)	Perfis	(n=19)	Perfis	(n=25)
	1	12,8%	1	26,1%	1	10,5%	1	32,0%
	5	11,5%	3	17,4%	44	10,5%	10	24,0%
	10	9,0%	10	13,0%				
	6	6,4%	16	8,7%				
ECP (n=51)	Perfis	(n=33)	Perfis	(n=10)	Perfis	(n=3)	Perfis	(n=5)
	16	9,09%	1	20,0%	8	33,3%	1	20,0%
	5	9,09%			12	33,3%	3	20,0%
	1	6,06%			105	33,3%	16	20,0%
	3	6,06%					20	20,0%
							44	20,0%

* *St. spp.*: *Staphylococcus* spp., ECP: estafilococos coagulase-positivo; ECN: estafilococos coagulase-negativo. Foi encontrada uma elevada variedade de perfis dentro das espécies *S.aureus*, *S.intermedius* e do grupo SIG não justificando a sua inserção da tabela.

5.5. Caracterização do gene *spaA* de *S.aureus*

No presente trabalho todos os isolados de *S.aureus* foram positivos para o gene *spaA*. O gene amplificado foi referente à região X, que consiste em um número variável de repetidos 24 pares de bases (figura 15).

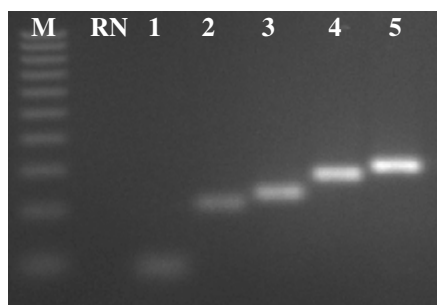


Figura 15. Gene *spaA* (região polimórfica) em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa, 1: isolado positivo (100pb), 2: isolado positivo (220pb), 3: isolado positivo (250pb), 4: isolado positivo (300pb) e 5: isolado positivo (320pb).

Nenhum isolado apresentou bandas múltiplas e foi possível estabelecer 9 perfis segundo o tamanho da banda (tabela 11).

Tabela 11. Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene *spaA* em *Staphylococcus aureus* (n=38) isolados de mastite bovina.

Perfis (pb)	Número de repetições da região X	Frequência	Percentual
1(100)	4	6	15,8%
2(150)	6	1	2,6%
3(180)	8	1	2,6%
4(200)	8	4	10,5%
5(220)	9	1	2,6%
6(250)	10	2	5,3%
7(300)	12	19	50%
8(320)	13	3	8%
9(350)	15	1	2,6%

O perfil predominante foi o 7 (50%) que apresenta 12 repetições. Em trabalho desenvolvido por Coelho e colaboradores (2011), o perfil predominante da amplificação da região x do gene *spaA* foi o amplicom com tamanho de 315pb com prevalência de 64% (32/50) de cepas *S. aureus* oriundas de mastite bovina da região sul do estado do Rio de Janeiro. Frenay et al. (1996) determinaram que cepas com mais de 260 pb ou 11 unidades repetidas na região X tendem a ser mais epidêmicas, enquanto que a presença de 7 ou menos unidades indica circulação de cepas esporádicas. Isso se justifica pelo fato de que quanto maior o número de repetições, maior a longitude da região de união à porção Fc das imunoglobulinas, favorecendo a colonização e conseqüente infecção.

5.6. Caracterização do gene *coa* em *S.aureus*

Todos os isolados de *S.aureus* foram positivos para o gene *coa*, apresentaram 9 perfis distintos, estabelecidos pelas repetições dos 81 pares de base, sem bandas duplas e em 68,5% (26/38) dos amplicons foi encontrado um tamanho que variou de 600 a 800pb (tabela 12).

Tabela 12. Perfis estabelecidos segundo amplificação do gene *coa* em *Staphylococcus aureus* (n=38) isolados de mastite bovina.

Perfis (pb)	Número de repetições da região polimórfica	Frequência	Percentual
1 (400)	1	1	2,6%
2 (450)	2	4	10,5%
3 (500)	2	6	15,8%
4 (550)	3	1	2,6%
5 (600)	3	13	34,2%
6 (650)	4	1	2,6%
7 (700)	5	7	18,4%
8 (750)	5	2	5,3%
9 (800)	6	3	8%

O gene *coa* amplificado de isolados de *S. aureus* provenientes de animais apresenta banda única, enquanto que em isolados de origem humana apresenta banda dupla. Estudos têm indicado que *S. aureus* isolados de reservatórios humanos e animais representam duas subpopulações que raramente sofrem infecção cruzada (KARAHAN et al., 2007).

Estudos mostraram que alguns genótipos de *coa* são predominantes em cada país, e estes são resistentes à fagocitose e morte por neutrófilos do que aqueles com genótipos menos frequentes (Su et al., 1999; Aestrup et al., 1994). Em trabalho desenvolvido por Reinoso e colaboradores (2008) foram detectados cinco perfis com amplicons de 400pb (2/15), 500pb (3/15), 600pb (3/15), 900pb (6/15) e de 1000pb (1/15) de isolados de *S. aureus* oriundos de mastite bovina na Argentina. Aslanta e colaboradores (2007) amplificaram o gene *coa* de 80 isolados de *S. aureus* oriundos de mastite bovina na Turquia com tamanhos de 730-1050 pb, sendo os produtos de 730 e 970 bp os mais frequentes com prevalência de 38,8% e 41,3%, respectivamente. Portanto, acredita-se que a prevalência de amplicons com tamanhos entre 600 e 900pb envolvidos em casos de mastite bovina sugere que estes sejam os perfis mais virulentos e mais competitivos relacionados a este tipo de infecção.

O polimorfismo dos genes *coa* e *spaA* tem sido frequentemente aplicado em investigações epidemiológicas de *S.aureus* oriundos de mastite bovina (ZECCONI et al., 2006; El-SAYED et al., 2006).

5.7. Gene *agr* (*rnaIII*) em *S.aureus*

Todos os isolados de *S.aureus* foram positivos para o gene *rnaIII*, e apresentaram bandas de 200pb (Figura 16). Esse gene, localizado no locus *agr*, codifica a molécula RNAIII e regula pelo menos 15 genes que codificam fatores de virulência. Os mutantes Agr não patogênicos, são relacionados com a diminuição da síntese de toxinas extracelulares e enzimas, e são, ao mesmo tempo, relacionado a um aumento da síntese de moléculas de adesão, tais como coagulase e proteína A (GILOT & VAN LEEUWEN, 2004).

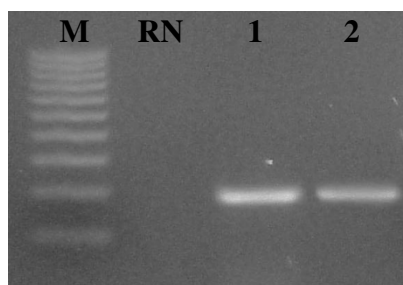


Figura 16. Gene *agr* (*RNAIII*) em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa, 1: controle positivo, 2: isolado positivo (200pb).

Em nosso trabalho foi detectado amplicom não-polimórfico de 200 pb, em contraposição a outros autores que obtiveram prevalência dos amplicons de tamanho de 550 pb, em isolados de *S. aureus* originados de leite mastítico (COELHO, 2009; GILOT & VAN LEEUWEN, 2004). Este fato, assim como um estudo mais detalhado a cerca do papel deste gene na regulação da produção de exoproteínas em microrganismos causadores de mastite, será abordado em trabalhos futuros da presente discente em projeto a ser desenvolvido no seu doutoramento.

5.8. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de isolados *S. aureus*

Como parte dos estudos de Pós-Doutoramento da Professora Miliane Moreira Soares de Souza, coordenadora do projeto de pesquisa e orientadora da presente dissertação, foi realizada a tipagem molecular através da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) utilizando 50% (19/38) dos isolados de *S. aureus* deste estudo. Estes dados foram incorporados a esta dissertação para auxiliar na compreensão dos perfis genotípicos obtidos. Depois da digestão do DNA dos isolados com a enzima de restrição *SmaI*, foi possível a detecção de 6 perfis genéticos distintos (A-F). Os perfis A e B foram formados por 2 isolados cada um, os perfis C, D e E por 3 isolados cada um e o perfil F formado por um único isolado. Cinco (5) isolados não foram possíveis de tipar por esta técnica, destes, 4 isolados não foram cortados pela enzima *SmaI* e 1 isolado quando submetido ao campo pulsante originou um perfil do tipo rastro (figura 17).

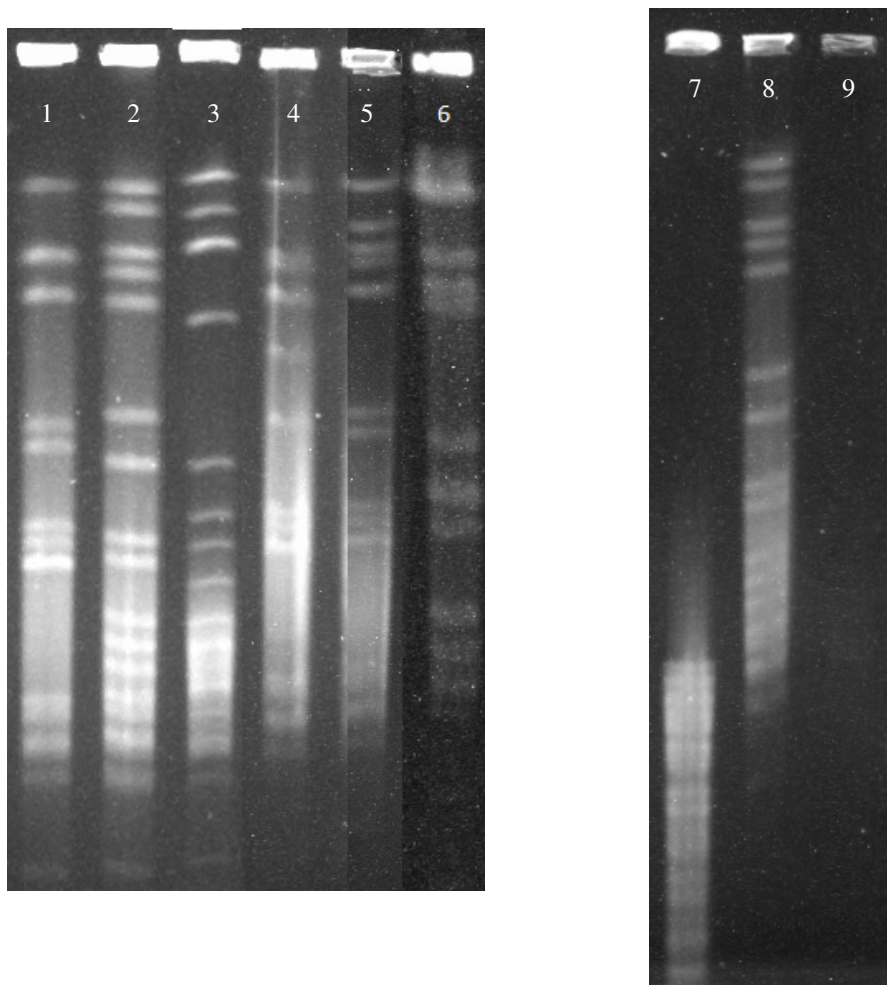


Figura 17. Perfis obtidos por PFGE. 1: perfil C, 2: perfil D, 3: perfil E, 4: perfil B, 5: perfil F, 6: perfil A, 7: perfil tipo rastro, 8: perfil D, 9: isolado não cortado pela enzima *SmaI*.

Foi possível observar uma acentuada diversidade de clones de *S. aureus* nas propriedades leiteiras avaliadas na região Sul-Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, não tendo sido detectado um perfil predominante nos isolados estudados. Rabello e colaboradores (2005) detectaram 16 perfis ao analisar 106 cepas de *S. aureus* isolados de 9 fazendas

distintas do Estado do Rio de Janeiro, sendo o perfil do tipo A predominante em 54,2% dos isolados e presente em 6 das nove propriedades avaliadas.

Ao correlacionar os perfis eletroforéticos do DNA cromossomal encontrados através do PFGE com os genes de virulência detectados por PCR, foi feito um agrupamento considerando os genes presentes em todos os isolados que apresentaram o mesmo perfil. Foi observado que os genes *hla*, *hly*, *cap5* e *fnbA* estavam presentes nos dois isolados que apresentaram o perfil A; os genes *icaA*, *icaD*, *hla*, *hly* e *fnbA* estavam presentes nos dois isolados que apresentaram o perfil B; os genes *icaD*, *hla*, *hly*, *fnbA* e *fnbB* estavam presentes nos três isolados que apresentaram o perfil C; os genes *icaD*, *hla*, *hly*, e *fnbA* estavam presentes nos três isolados que apresentaram o perfil D; os genes *hla*, *hly* e *fnbA* estavam presentes nos três isolados que apresentaram o perfil E. O perfil F foi verificado em apenas um isolado e apresentou prevalência dos mesmos de genes de virulência observado no perfil D (tabela 13). De modo geral, foi observado que a presença ou ausência dos genes de virulência estudados não estavam relacionadas com os distintos perfis eletroforéticos. A grande diversidade genética observada nos isolados demonstra a existência de diversos clones circulantes. Foi observado ainda que os genes de virulência avaliados dentro do presente estudo não parecem contribuir para gerar discriminação entre os perfis obtidos.

Tabela 13. Perfis encontrados através de PFGE e detecção dos genes de virulência por PCR

Perfil PFGE**	Isolados (região****)	Genes de Virulência detectados por PCR***										
		<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>hla</i>	<i>hly</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>spa A</i> (pb*)	<i>coa</i> (pb*)	<i>agr</i> (pb*)
A	4(Piraí)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	300	600	200
	19(RC)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	300	600	200
B	187(RC)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	100	500	200
	208(P)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	300	500	200
C	144(RC)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	100	500	200
	207(RC)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	100	600	200
	218(P)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	100	450	200
D	100(S)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	200	500	200
	247(P)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	200	500	200
	249(P)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	300	500	200
E	226(P)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	300	550	200
	228(P)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	320	600	200
	219(P)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	250	450	200
F	210(P)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	320	600	200

*pb: pares de base

**PFGE: Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

*** (+): presença do gene, (-): ausência do gene

**** RC: Rio Claro, P: Paracambi, S: Seropédica

Estudos epidemiológicos baseados no polimorfismo dos genes *coa* e *spaA* tem demonstrado que isolados de *S. aureus* podem ser divididos em subtipos (ASLANTAS et al., 2007; El-SAYED et al., 2006). No presente estudo, ao correlacionar a análise do polimorfismo dos genes *spaA* e *coa* com os perfis eletroforéticos obtidos por PFGE pode-se observar que apenas os perfis A e C, considerando o polimorfismo do gene *spaA* e os perfis A, B e D, considerando o polimorfismo do gene *coa*, tiveram similitude. Indicando um alto grau de heterogeneidade do gene *coa* e *spaA* em *S. aureus* (KARAHAN et al., 2007; El-SAYED et al., 2006).

O gene *agr* não pode ser usado na discriminação das cepas de *S. aureus* neste estudo, pois amplificou fragmentos de mesmo tamanho (200 pb).

O uso de técnicas moleculares adicionais e o estudo das demais cepas estafilocócicas seriam necessários para um maior aprofundamento do estudo epidemiológico destes clones, pois o conhecimento sobre os fatores de virulência de estafilococos isolados de rebanho leiteiro, pode ajudar a formular estratégias que reduzam a disseminação da infecção (LINEHAN et al., 2003).

6. CONCLUSÕES

- Os ECNs foram prevalentes dentre os estafilococos isolados de amostras de leite mastítico;
- A espécie *S. aureus* (38/250) foi prevalente dentre os ECPs identificados;
- A produção de caseinase foi observada em 66,4% (166/250) dos isolados;
- A DNase, embora detectada em ECNs (38/145) foi prevalente em *S. aureus* (14/38);
- Um total de 76,8% (192/250) dos *Staphylococcus* spp. foi produtor de “slime”, em diferentes escalas, na técnica da microplaca;
- A detecção dos genes *icaA* (38/250) e *icaD* (54/250) foi baixa quando comparada a produção de “slime” (192/250);
- Apenas 6,4% (16/250) dos isolados foram produtores de α -hemólise, 4,8% (12/250) de β -hemólise e, 1,6% (4/250) de α e β -hemólise. Foram detectados com prevalência de 19,2% (48/250) e 18% (45/250) os genes *hla* e *hly*, respectivamente.
- O sinergismo hemolítico foi positivo 36,8% (92/250) dos isolados.
- Os genes de cápsula foram detectados com prevalência de 4% (10/250) para *cap5* e para *cap8*;
- Os genes de proteína ligante de fibronectina foram detectados em 32,8% (82/250) para *fnbA* e 4,4% (11/250) para *fnbB*.
- O gene *spaA* foi positivo em todos os *S. aureus* (n=38), apresentando amplicons de tamanhos variados, sendo o tamanho prevalente o de 300pb;
- A amplificação do gene *coa* apresentou nove tipos polimórficos distintos, sendo prevalente o amplicon de 600pb;
- O gene *agr* foi detectado em todos os *S. aureus* (n=38) e apresentou um único perfil de banda com 200 pb;
- Foram encontrados 105 perfis quando analisados os fatores feno-genotípicos de *Staphylococcus* spp;
- Os fatores de virulência circulante nas propriedades foi o de produção de “slime” e caseinase;
- Foi observado que a presença ou ausência dos genes de virulência estudados não estavam relacionadas com os distintos perfis eletroforéticos obtidos por PFGE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCIOLA, C.R.; COLLAMATI, S.; DONATI, E.; MONTANARO, L. **A rapid PCR method for the detection of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in perioprosthesis infections.** Diagnostic Molecular Pathology, v.10, p.130-137, 2001.
- ASLANTA, O.; DEM, C.; TURUTO, H.; CANTEK, Z.; ERGUN, Y.; DO, G. **Coagulase Gene Polymorphism of *Staphylococcus aureus* Isolated from Subclinical Bovine Mastitis.** Turk. J. Vet. Anim. Sci., v.31, n.4, p.253-257, 2007.
- BANNOEHR, J.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; FITZGERALD, J. R. **Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*.** Journal of clinical microbiology, v. 47, n. 2, p. 469–471, 2009.
- BENEDETTE, M.F.; SILVA, D.; ROCHA, F.P.C.; SANTOS, D.A.N.; COSTA, E.A.D.; AVANZA, M.F.B. **Mastite Bovina.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária, Ano VI, n. 11, 2008.
- BERNARDI, A. C. A., PIZZOLITO, E. L., PIZZOLITO, A. C. **Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v.28, n.1, p.57-66, 2007.
- BES, M.; GUEÂRIN-FAUBLEÂE, V.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. **Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods.** Veterinary Microbiology, v. 71, p. 287-294, 2000.
- BOERLIN, P.; KUHNERT, P.; HUSSY, D.; SCHAELLIBAUM, M. **Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis.** JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, v. 41, n. 2, p. 767–771, 2003.
- BUCK, A.W.; FOWLER, V.G.; YONGSUNTHON, R.; LIU, J.; DIBARTOLA, A.C.; QUE, Y.A.; MOREILLON, P.; LOWER, S. **Bonds between Fibronectin and Fibronectin-Binding Proteins.** Langmuir, v.26, n.13, 2010.
- CABOCLO, R.M.F. ***Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de hospitais do Rio de Janeiro: aspectos fenotípicos e moleculares da resistência e correlação com virulência e genótipos.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, 2008.
- CERCA, N.; JEFFERSON, K.K.; LITRÁN, T.M.; PIER, D.B.; QUINTOS, C.K., GOLDMAN, D.A.; AZEREDO, J.; PIER, G.B. **Molecular Basis for Preferential Protective Efficacy of Antibodies Directed to the Poorly Acetylated Form of Staphylococcal Poly-N-Acetyl-₂-(1-6)-Glucosamine.** Infection and Immunity, v. 75, n. 7, p. 3406–3413, 2007.
- CHAPMAN, G.; BERENS, C.; PETERS, A.; CURCIO, L. **Journal of Bacteriology.** XXVIII p.343, 1934.
- CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, M. L.; BARRET, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. **Adherence of coagulase--ative staphylococci to**

plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology. v. 22 n. 6 p.996-1006, 1985.

CITAK', S.; VARLIK, O.; GUNDOGAN, N. **Slime production and DNase activity of *Staphylococci* isolated from raw milk.** Journal of Food Safety, v.23, p. 281-288, 2003.

COELHO, S. M. S., **Caracterização fenotípica e genotípica de fatores de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, 2008.

COELHO, S.M.S.; REINOSO, E.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; DEMO, M.; BOGNI, C. & SOUZA, M.M.S. **Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro.** Pesq. Vet. Bras., v. 29, n.5, p.369-374, 2009.

COELHO, S.M.O.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; B. R. PRIBUL B.P.; SOUZA, M. M. S. **Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** J. Dairy Sci. TBC:1–6 doi:10.3168/jds.2010-3229.

COSTERTON, J.W.; STEWART P.; GREENBERG P. **Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections.** Science, v.284, p.1318-1322, 1999.

CRUZ, R.S. **Análise do efeito do locus *agr* sobre a formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, 2008.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.N.I.; PENADE'S, J.R. **Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation.** Journal of bacteriology, v. 183, n.9, p. 2888–2896, 2001.

CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G. DA; PINHEIRO, J.W.; SILVA, D.R. DA.; OLIVEIRA, A.A. DA F.; SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. **Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.73, n.1, p.17-21, 2006.

DAUM, R.S.; SPELBERG, B. **Progress Toward a *Staphylococcus aureus* Vaccine.** Clinical Infectious Diseases Advance Access published December 20, 2011, DOI: 10.1093/cid/cir828.

DEGO K. O., VAN DIJK J. E., NEDERBRAGT H. **Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion-A review.** Vet Microbiol; 24:181–98, 2002.

DEMO, M. **Characterization Y studios de patogenicidad de cepas dela genero *Staphylococcus* asiladas de leches mastiticas.** Instituto de Microbiologia, Universidad Nacional de Rio Cuarto, 1996.

DOBINSKY, S.; KIEL, K.; ROHDE, H.; BARTSCHT, K.; KNOBLOCH, J.K.M.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. **Glucose-Related Dissociation between *icaADBC* Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an**

Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. Journal of bacteriology, v. 185, n. 9, p. 2879–2886, 2003.

EL-SAYED, A.; ALBER, J.; LAMMER, C.; JAGER, S.; WOLTER, W.; VÁZQUEZ, H.C. **Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico.** Vet. Méx., v.37, n.2, p.165-179, 2006.

FERREIRA, L.M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L.F.; SOUZA, V. **Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.4, p.1228-1234,2006.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms. In: **Bayiley & Scott's Diagnostic Microbiology**, 11 ed. Mosby: USA, 2002.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S. de A.; SILVA, D.R. da; SILVEIRA FILHO, V.M. da; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J. da; MOTA, R.A. **Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, abr./jun., 2005.

FRENAY H., BUNSCHOTEN A., SCHOOLS L., VAN LEEUWEN W., VANDENBROUCKE-GRAULS C., VERHOEF J., MOOI F. **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. v.15 p.60-64, 1996.

GAD, G.F.M.; EL-FEKY, M.A.; EL-REHEWY, M.S.; HASSAN, M.A.; ABOLELLA, H.; EL-BAKY, R.M. **Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients.** J Infect Dev Ctries, v.3, n.5, p.342-351, 2009.

GILOT P.; VAN LEEUWEN W. **Comparative analysis of *agr* locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates.** J Clin Microbiol. v.42 p.1265-1269, 2004.

GÓMEZ, M.; SEAGHDHA, M. O.; PRINCE, A. S. ***Staphylococcus aureus* protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling.** The EMBO Journal, 26, p. 701–709, 2007.

HANDKE, L.D.; CONLON, K.M.; SLATER, S.R.; ELBARUNI, S.; FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS,H.; GILES, W.P.; RUPP, M.E.; FEY, P. D.; O'GARA, J. P. **Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates.** Journal of Medical Microbiology, v. 53, p.367–374, 2004.

HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLOF, A.; PYORALA, S. **Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites.** Journal of clinical microbiology, v.46, n.11, p. 3728–3735, 2008.

HEBERT,G.A.; HANCOCK, G.A. **Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci.** Journal of Clinical Microbiology, v.22, n.3, p.409-415, 1985.

HUNTZINGER, E.; BOISSET, S.; SAVEANU, C.; BENITO, Y.; GEISSMANN, T.; NAMANE, A.; LINA, G.; ETIENNE, J.; EHRESMANN, B.; EHRESMANN, C.; JACQUIER, I.; VANDENESCH, F.; ROMBY, P. ***Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression.** The EMBO Journal, v.24, p.824–835, 2005.

HUSEBY, M.; SHI, K.; BROWN, K.; DIGRE, J.; MENGISTU, F.; SEO, K.S.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M.; OHLENDORF, D.H.; EARHART, C.A. **Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*.** Journal of bacteriology, v.189, n.23, p. 8719–8726, 2007.

JAYARAMAN, A.; WOOD, T.K. **Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease.** Annu. Rev. Biomed. Eng., v.10, p.145–167, 2008.

KARAHAN M ; CETINKAYA B. **Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey.** *Vet J.*, v.174, n.2, p.428-431, 2007.

KATEETE, D.P.; KIMANI, C.N.; KATABAZI, F.A.; OKENG, A.; OKEE, M.O.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M.L.; NAJJUKA, F.C. **Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, n. 9, v.23, 2010.

KIEDROWSKI, M.R.; HORSWIL, A.R. **New approaches for treating staphylococcal biofilm infections.** Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 1241, p.104–121, 2011.

KOENIG, R.L.; RAY, J.L.; MALEKI, S.J.; SMELTZER,M.S.; HURLBURT, B.K. ***Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region.** Journal of Bacteriology, v. 186, n. 22, p. 7549–7555, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C. ; WINN JR. **Diagnóstico Microbiológico.** 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.

KOREEN, L.; RAMASWAMY, S.V.; GRAVISS, E.A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B.N. **spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation.** J Clin Microbiol. v.42 p.792–799, 2004.

KROPEC, A.; LITRAN, T.M.; JEFFERSON, K.K.; GROUT, M.; CRAMTON, S. E.; GOTZ, F.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. **Poly-N-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* Is Essential for Virulence in Murine Models of Systemic Infection.** Infection and immunity, v. 73, n. 10, p. 6868–6876, 2005.

KUMAR, R.; YADAV, B.R.; SINGH, R.S. **Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle.** Curr Microbiol (2010) 60:379–386 DOI 10.1007/s00284-009-9553-1.

KUMAR, R.; YADAV, B.R.; SINGH, R.S. **Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle.** J. Biosci., v.36, n.1, p.175–188, 2011.

LARSEN, H. D., AARESTUP, F. M., JENSEN, N. E. **Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and β -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA.** Veterinary Microbiology, v.85, p.61-67, 2002.

LINEHAN D., ETIENNE J. & SHEEHAN D. **Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially purified β -like toxin from *Staphylococcus schleiferi*.** FEMS Immunology and medical Microbiology, v.36, n.1-2, p.95-102, 2003.

MACK, D., ROHDE, H., DOBINSKY, S., RIEDEWALD, J., NEDELMANN, M., KNOBLOCH, J. K.M. **Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation.** Infection and Immunity, v.68, p.3799-3807, 2000.

MARQUES, V.F., SOUZA, M.M.S., MENDONÇA, E.C.L., ALENCAR, T.A., PRIBUL, B.R., COELHO, S.M.O., LASAGNO, M., REINOSO, E.B. 2012. **Análise fenotípica e genotípica da virulência em *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina em regiões do Estado do Rio de Janeiro.** Pesquisa Veterinária Brasileira. *In Press*.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. **Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?** The Veterinary Journal, v. 171, p.398–407, 2006.

MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

MORK T., TOLLERSRUD T., JORGENSEN H. J., KVITILE B., WAAGE S. **Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in norway.** Vet Microbiol, v.106, p.65-73, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFAUE, M. **Microbiologia Médica.** 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 979p.

NILSSON, I.-M., HARTFORD, O., FOSTER, T., TARKOWSKI, A. **Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis.** Infection and Immunity, v.67, p.1045–1049, 1999.

NOVICK, R.P.; JIANG, D. **The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing.** Microbiology, v.149, p.2709-2717, 2003.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. **Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates.** Veterinary Microbiology, v. 118, p. 133–140, 2006.

O'RIORDAN, K.; LEE, J.C. ***Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides**. Clinical microbiology reviews, v. 17, n.1, p. 218–234, 2004.

OTE, I; TAMINIAU, B.; DUPREZ, J-N.; DIZIER, I.; MAINIL, J.G. **Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis**. Veterinary Microbiology, v. 153, p.285–292, 2011.

PARK, P.W.; FOSTER, T.J.; NISHI E.; DUNCAN S.J.; KLAGSBRUN, M.; CHEN, Y. **Activation of Syndecan-1 Ectodomain Shedding by *Staphylococcus aureus* α -Toxin and β -Toxin**. J. Biol. Chem., v. 279, n.1, p. 251-258, 2004.

PEACOCK, S.J.; DAY, N.P.J.; THOMAS, M. G.; BERENDT, A. R.; FOSTER, T. J. **Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Exhibit Diversity in *fnb* Genes and Adhesion to Human Fibronectin**. Journal of Infection, v.41, p.23–31, 2000.

PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. **Bovine Mastitis in Finland 2001—Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance**. J. Dairy Sci., v. 87, p. 2433–2441, 2004.

PYORALA, S.; TAPONEN, S. **Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens**. Veterinary Microbiology, v.134, p. 3–8, 2009.

RABELLO, R.F. **Diversidade Genética e Genes de Virulência de Amostras de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Mastite Bovina no Estado do Rio de Janeiro**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, 2007.

REINOSO, E.B. **Análisis epidemiológico y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* de distintos orígenes**. Universidad Nacional de Rio Cuarto, Tese de doutorado, 2004.

REINOSO, E.B.; EL-SAYED, A.; LAMMLER, C.; BOGNIA, C.; ZSCHOCKC, M. **Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina**. Microbiological Research, v.163, p.314—322, 2008.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C. ; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. **Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não-infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio grande do sul**. R. bras. Agrociência, v. 9, n. 3, p.287-290, 2003.

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

SANTOS, C. D. M. ***Staphylococcus* sp e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**. Mestrado em Produção Animal - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, 69 p., 2006.

SANTOS, L.L. dos. ***Staphylococcus* coagulase negativo como agente de mamite em rebanhos bovinos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SHOPSIN B., GOMEZ M., WADDINGTON M., RIEHMAN M., KREISWIRTH B.N. **Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** J. Clin. Microbiol. v.38 p.3453-3456, 2000.

SILVA, N., CARDOSO, H. F. T. **Produção de toxinas hemolíticas por amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina.** Revista veterinária, v.6, n.2, 2000.

SILVA, E.C.B.F. da; MACIEL, M.A.V.; MELO, F.L. de; ANTAS, M.G.C.; NETO, A.M.B.; RABELO, M.A. ***Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos.** An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb., Recife, v.52, n.2, 2007.

SILVA, W.P., SILVA; A.J., MACEDO, M.R.P., ARAÚJO, M.R., MATA, M.M.; GANDRA, E.A. **Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr amplification of *coa* and *nuc* genes.** Brazilian Journal of Microbiology. v.34 (Suppl.1) p.125-127, 2003.

SOARES L.C.; PEREIRA I.A.; PRIBUL B.R.; OLIVA, M.S.; COELHO S.M.O.; SOUZA M.M.S. **Antimicrobial resistance and detection of *mec* and *bla* regulatory genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 2012. *In press*

SOUZA M.M.S, COELHO S.M.O., PEREIRA I.A., SOARES L.C., PRIBUL B.R. & COELHO I.S. 2012. **Antibiotic resistance in *Staphylococcus* species of animal origin.** *In press*

STRAUB, J.A.; HERTEL, C. ; HAMMES, W.P. **A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products.** J. Food Prot., v.62, p.1150-1156, 1999.

SWITALSKI, L.M.; RYDEN, C.; RUBIN,K.; LJUNGH,A.; HOOK, M.; WADSTROM, T. **Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*.** J. Med. Microbiol., v. 40, p.79-89; 1994.

SUTRA, L.; POUTREL, B. **Binding of Fibronectin to *Staphylococcus* Strains.** INFECTION AND IMMUNITY, v. 42, n. 2, p. 628-633, 1983.

TAPONEN, S., SIMOJOKI, H., HAVERI, M., LARSEN, H.D., PYORALA, S. **Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP.** Vet. Microbiol. v.115, p. 199–207, 2006.

TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ JR., A. J.; LEE, J. C. **Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States.** J. Clin. Microbiol., v. 38, p.2998–3003, 2000.

TUCHSCHERR, L.P.N.; BUZZOLA, F.R.; ALVAREZ, L.P.; CACCURI, R.L.; LEE, J.C.; SORDELLI, D.O. **Capsule-Negative *Staphylococcus aureus* Induces Chronic Experimental Mastitis in Mice.** Infection and immunity, v.73, n.12, p. 7932–7937, 2005.

TURKYILMAZ, S., ESKLIZMITLILER, S. **Detection of slime factor production and antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from various animal clinical samples.** *Turk J Vet Anim Sci.*, v.30, p.201-206, 2006.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANA, K.S. **Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation.** *Veterinary Microbiology.* v.92, p.179-185, 2003.

VEENSTRAS G, CREMERS F, DIJK H, FLEER, A. **Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*.** *J Bacteriol.* v.178, p.537-541, 1996.

VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. **Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington,* v. 99, n. 15, p. 10102-10107, 2002.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y; FISCHER, E.R.; DELEO, F.R.; OTTO, M. **A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence.** *The journal of biological chemistry,* v.279, n.52, p. 54881–54886, 2004.

WATERS, C.M. & BASSLER, B.L. **Quorum-Sensing: cell-to-cell communication in bacteria.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v.21, p. 319-46, 2005.

WATTS, J. **Etiological agents of bovine mastitis.** *Veterinary Microbiology.* v.16 p.41-46, 1988.

YTHIER, M.; ENTENZA, J.M.; BILLE, J.; VANDENESCH, F.; BES, M.; MOREILLON, P.; SAKWINSKA1, O. **Natural Variability of *In Vitro* Adherence to Fibrinogen and Fibronectin Does Not Correlate with *In Vivo* Infectivity of *Staphylococcus aureus*.** *Infection and immunity,* v.78, n.4, p. 1711–1716, 2010.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; CARVALHO, M.R.B. de; LIMA, T.M.A. de. **Influência da mastite subclínica bovina sobre as frações protéicas do leite.** *Arq. Inst. Biol., São Paulo,* v.75, n.2, p.135-140, 2008.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. **Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,* v.59, n.3, p.577-585, 2007.

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

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. **New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci.** *Journal of clinical microbiology,* v. 42, n 11, p. 4947–4955, 2004.

ZHAO, L.; XUE,T.; SHANG, F.; SUN, H.; SUN, B. ***Staphylococcus aureus* AI-2 Quorum Sensing Associates with the KdpDE Two-Component System To Regulate Capsular Polysaccharide Synthesis and Virulence.** *Infection and immunity*, v.78, n.8, p. 3506–3515, 2010.

ANEXOS

- A. Leituras, em absorvância, da produção de “slime” em microplaca obtidas em diferentes momentos
- B. Perfis obtidos através de análise fenogenotípica dos fatores de virulência detectados

A: Leituras, em absorbância, da produção de “slime” em microplaca obtidas em diferentes momentos

Isolados	Média(0DPC)	Média(1DPC)	Média(7DPC)
1	0,08	0,087	0,09
2	0,143666667	0,143666667	0,185333333
3	0,335666667	0,304666667	0,199333333
4	0,308666667	0,289333333	0,245666667
5	1,605	1,693	1,952666667
6	0,09	0,089666667	0,094333333
7	0,087333333	0,087666667	0,105666667
8	0,188	0,181333333	0,202333333
9	0,687333333	0,668666667	0,714333333
10	0,71	0,686333333	0,626666667
11	0,439333333	0,391	0,344333333
12	0,368333333	0,386666667	0,247
13	0,277666667	0,234666667	0,218666667
14	0,335666667	0,296333333	0,324333333
15	0,375	0,335333333	0,227333333
16	0,297	0,250333333	0,181666667
17	0,341333333	0,270666667	0,216666667
18	0,592333333	0,501	0,5
19	0,338	0,313666667	0,328
20	0,133333333	0,137	0,167
21	0,228333333	0,221333333	0,194333333
22	0,190666667	0,186333333	0,200666667
23	0,447	0,383333333	0,335666667
24	0,476333333	0,366666667	0,286333333
25	0,408	0,323333333	0,226
26	0,447666667	0,409333333	0,266333333
27	0,183333333	0,186666667	0,179666667
28	0,406333333	0,345333333	0,356
29	0,129	0,132	0,142666667
30	0,775333333	0,705666667	0,736
31	0,092666667	0,091666667	0,099666667
32	0,243333333	0,261333333	0,291333333
33	0,127666667	0,129	0,125
34	0,273333333	0,268333333	0,248666667
35	0,522666667	0,416666667	0,195333333
36	0,087	0,090333333	0,080666667
37	0,092	0,105666667	0,119666667
38	0,148333333	0,139666667	0,122666667
39	0,431333333	0,333666667	0,273666667
40	0,233	0,224333333	0,218666667
41	1,169333333	1,237666667	1,473333333
42	0,197	0,197333333	0,205333333
43	0,362	0,297666667	0,261666667
44	0,116333333	0,136	0,154
45	0,263666667	0,275	0,199666667
46	0,261666667	0,217333333	0,211
47	0,288333333	0,261333333	0,215666667
48	0,339666667	0,268	0,234
49	0,496666667	0,490666667	0,536333333
50	0,480333333	0,422666667	0,294

Isolados	Média(0DPC)	Média(1DPC)	Média(7DPC)
51	0,36	0,271	0,203
52	0,454333333	0,402333333	0,406
53	0,327	0,258	0,256
54	0,303	0,318666667	0,355666667
55	0,071	0,077	0,122
56	1,393333333	1,441	1,629333333
57	1,268	1,337666667	1,555
58	1,412666667	1,469333333	1,645333333
59	0,076	0,067333333	0,063666667
60	0,115	0,100666667	0,083333333
61	0,275	0,248666667	0,157333333
62	0,091333333	0,089666667	0,127333333
63	0,325666667	0,311333333	0,295666667
64	0,861666667	0,899333333	0,916666667
65	0,310333333	0,325666667	0,312
66	0,138333333	0,114	0,105666667
67	0,157333333	0,152333333	0,147666667
68	1,182333333	1,202333333	1,301333333
69	0,368333333	0,311666667	0,284333333
70	0,224333333	0,182333333	0,233666667
71	0,506333333	0,477666667	0,556
72	0,395333333	0,366666667	0,406666667
73	0,764	0,766333333	0,896666667
74	0,159666667	0,160333333	0,206666667
75	0,437333333	0,403666667	0,256
76	0,365	0,315	0,218666667
77	0,407666667	0,339	0,177333333
78	0,389333333	0,352	0,381666667
79	0,311666667	0,258666667	0,229
80	0,341666667	0,304333333	0,251666667
81	0,38	0,403666667	0,471333333
82	0,205666667	0,186	0,173333333
83	0,155333333	0,156666667	0,174666667
84	0,591666667	0,630333333	0,667
85	0,229333333	0,285	0,357
86	1,189	1,277	1,457333333
87	1,263666667	1,219333333	1,230666667
88	0,211666667	0,247	0,327333333
89	0,401666667	0,423	0,491
90	0,465666667	0,464666667	0,516666667
91	0,124666667	0,136333333	0,151
92	0,141	0,132666667	0,140666667
93	1,282666667	1,152666667	0,722666667
94	0,367666667	0,343333333	0,387
95	0,404	0,375	0,389
96	0,441333333	0,428666667	0,359
97	0,699	0,63	0,457
98	0,628333333	0,579666667	0,449333333
99	0,785333333	0,747666667	0,668666667
100	0,937	0,966333333	1,023

Isolados	Média(0DPC)	Média(1DPC)	Média(7DPC)
101	0,408666667	0,39	0,393
102	0,083666667	0,065333333	0,06
103	0,081333333	0,092666667	0,097666667
104	0,079333333	0,075	0,063333333
105	0,165	0,146333333	0,142
106	0,121	0,107333333	0,122333333
107	0,073333333	0,061666667	0,054333333
108	0,096333333	0,064333333	0,061666667
109	0,053333333	0,054	0,051333333
110	0,104333333	0,102333333	0,087333333
111	0,086666667	0,076333333	0,076
112	0,114666667	0,090666667	0,078666667
113	0,072	0,059666667	0,055666667
114	0,085	0,081	0,057666667
115	0,547666667	0,527333333	0,604666667
116	0,113333333	0,071333333	0,060666667
117	0,217333333	0,198666667	0,241666667
118	0,207666667	0,212666667	0,278333333
119	0,085666667	0,08	0,066333333
120	0,225666667	0,202	0,215
121	0,191666667	0,18	0,194
122	0,108666667	0,114	0,097
123	0,131	0,116666667	0,104666667
124	0,182333333	0,197666667	0,221666667
125	0,101333333	0,136333333	0,101333333
126	0,092666667	0,115333333	0,079666667
127	0,088	0,086	0,082666667
128	0,134	0,114	0,105
129	0,432666667	0,436333333	0,455
130	0,099333333	0,096	0,151666667
131	0,21	0,181666667	0,205
132	0,101333333	0,101666667	0,063
133	0,075666667	0,089333333	0,057666667
134	0,139333333	0,125	0,144666667
135	0,278	0,269	0,292333333
136	0,291	0,285333333	0,314666667
137	0,167666667	0,139	0,136666667
138	0,134666667	0,119666667	0,091
139	0,123	0,126333333	0,082333333
140	0,67	0,629666667	0,587666667
141	0,109333333	0,099	0,092
142	0,244666667	0,215	0,195
143	0,213333333	0,209	0,209666667
144	0,152666667	0,133333333	0,143
145	0,133	0,115	0,077
146	0,166666667	0,166333333	0,132666667
147	0,129333333	0,112333333	0,122333333
148	0,089666667	0,129666667	0,081666667
149	0,071333333	0,089	0,073666667
150	0,095	0,113	0,055

Isolados	Média(0DPC)	Média(1DPC)	Média(7DPC)
151	0,129333333	0,109333333	0,068
152	0,09	0,071666667	0,057333333
153	0,204333333	0,196666667	0,187333333
154	0,107333333	0,100333333	0,092333333
155	0,182666667	0,181	0,201333333
156	0,095333333	0,124333333	0,059333333
157	0,084666667	0,084333333	0,042333333
158	0,144666667	0,136666667	0,150666667
159	0,108666667	0,115666667	0,120666667
160	0,176	0,175333333	0,207666667
161	0,125	0,095333333	0,088666667
162	0,115	0,098666667	0,120666667
163	0,075666667	0,108666667	0,073666667
164	0,077	0,080666667	0,084666667
165	0,078	0,063	0,075666667
166	0,386666667	0,261	0,265333333
167	0,171666667	0,162666667	0,148
168	0,101333333	0,070666667	0,047666667
169	0,150666667	0,146666667	0,110333333
170	0,186333333	0,150666667	0,172
171	0,130666667	0,117666667	0,083666667
172	0,120333333	0,095	0,109333333
173	0,166666667	0,162333333	0,135333333
174	0,297666667	0,278333333	0,282
175	0,114333333	0,088333333	0,055666667
176	0,210333333	0,215666667	0,204333333
177	0,112	0,099	0,099666667
178	0,227333333	0,248666667	0,267333333
179	0,098333333	0,070333333	0,043333333
180	0,105333333	0,104	0,048333333
181	0,125666667	0,086333333	0,067333333
182	0,113	0,088333333	0,073
183	0,125666667	0,099	0,086
184	0,130666667	0,119333333	0,105666667
185	0,202333333	0,219	0,242333333
186	0,149333333	0,166666667	0,160666667
187	0,179666667	0,163	0,172333333
188	0,081666667	0,073666667	0,073333333
189	0,087333333	0,064333333	0,054333333
190	0,069333333	0,055666667	0,046
191	0,113333333	0,100333333	0,106
192	0,243333333	0,222	0,227333333
193	0,469666667	0,492	0,536666667
194	0,077333333	0,067	0,052333333
195	0,105333333	0,090333333	0,079333333
196	0,083	0,076333333	0,073333333
197	0,105	0,104	0,135666667
198	0,091333333	0,096333333	0,078333333
199	0,227	0,224333333	0,233
200	0,27	0,266	0,320333333

Isolados	Média(0DPC)	Média(1DPC)	Média(7DPC)
201	0,130666667	0,105333333	0,110666667
202	0,096666667	0,097666667	0,08
203	0,052	0,051333333	0,045666667
204	0,083333333	0,082666667	0,086
205	0,280333333	0,279666667	0,306666667
206	0,074	0,073	0,047
207	0,35	0,350666667	0,410666667
208	0,344333333	0,335333333	0,423333333
209	0,116333333	0,095666667	0,105333333
210	0,113	0,067333333	0,056666667
211	0,171333333	0,136333333	0,125
212	0,147666667	0,106	0,078
213	0,095	0,060333333	0,057333333
214	0,091666667	0,056333333	0,046333333
215	0,081666667	0,069	0,074333333
216	0,09	0,061	0,059333333
217	0,114666667	0,065666667	0,057
218	0,157	0,120666667	0,117
219	0,101	0,058	0,050333333
220	0,147	0,132666667	0,148333333
221	0,085333333	0,059	0,053666667
222	0,064333333	0,056	0,054333333
223	0,352333333	0,340666667	0,318333333
224	0,111	0,079666667	0,069666667
225	0,126666667	0,081666667	0,065666667
226	0,105333333	0,077333333	0,062333333
227	0,175333333	0,153333333	0,112333333
228	0,312666667	0,311333333	0,225333333
229	0,076666667	0,078666667	0,076333333
230	0,528	0,486333333	0,456333333
231	0,147333333	0,152	0,147333333
232	0,217666667	0,228333333	0,227666667
233	0,065666667	0,072333333	0,071666667
234	0,105	0,108	0,110333333
235	0,113666667	0,114666667	0,119333333
236	0,067	0,069	0,069333333
237	0,064	0,064666667	0,065666667
238	0,365666667	0,372333333	0,368
239	0,096666667	0,103	0,105
240	0,579666667	0,582333333	0,581333333
241	1,296333333	1,293666667	1,295
242	0,113	0,122	0,120333333
243	0,157666667	0,159	0,161666667
244	0,089333333	0,091333333	0,096
245	0,068333333	0,075	0,07
246	1,507	1,527	1,519
247	0,257666667	0,26	0,259666667
248	0,062666667	0,064	0,064333333
249	0,090333333	0,098333333	0,094666667
250	0,100666667	0,112666667	0,107666667

B: Perfis obtidos através de análise fenogenotípica dos fatores de virulência detectados.

Slime	icaA	icaD	SHA	hem	hla	hIb	DNase	caseína	Cap5	Cap8	fnbA	fnbB	Perfil
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	3
+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	6
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	7
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	8
-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	9
+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	10
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	11
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	12
-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	13
+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	14
+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	15
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	17
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	18
+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	19
+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	20
+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	21
+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	22
+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	23
+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	24
+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	25
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26
-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	27
-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	28
-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29

Slime	icaA	icaD	SHA	hem	hla	hfb	DNase	caseina	Cap5	Cap8	fnbA	fnbB	Perfil
+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	30
-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	31
+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	32
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	33
-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	34
-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	35
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	36
+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	37
+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	38
+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	39
+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	40
-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	41
-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	42
-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	43
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	44
-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	45
-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	46
+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	47
+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	48
-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	49
+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	50
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	51
+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	52
-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	53
+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	54
-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	55
+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	56
+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	57
-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	58

Slime	icaA	icaD	SHA	hem	hla	hly	DNase	caseina	Cap5	Cap8	fnbA	fnbB	Perfil
+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	59
-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	60
+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	61
+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	62
+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	63
+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	64
+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	65
+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	66
+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	67
+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	68
+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	69
+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	70
+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	71
+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	72
-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	73
-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	74
+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	75
+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	76
+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	77
-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	78
+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	79
+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	80
+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	81
-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	82
+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	83
+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	84
+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	85
+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	86
+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	87

Slime	icaA	icaD	SHA	hem	hla	hly	DNase	caseina	Cap5	Cap8	fnbA	fnbB	Perfil
-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	88
+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	89
-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	90
+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	91
+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	92
-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	93
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94
+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	95
+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	96
-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	97
-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	98
+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	99
+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	100
+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	101
+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	102
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	103
+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	104
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	105