

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

TESE

EXPRESSÃO GÊNICA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME E
RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS EM ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE LEITE
MASTÍTICO BOVINO

Viviane Figueira Marques

2016



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

**EXPRESSÃO GÊNICA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME E
RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS EM ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE LEITE
MASTÍTICO BOVINO**

Viviane Figueira Marques

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

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

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2016

579.353

M357e

T

Marques, Viviane Figueira, 1986-

Expressão gênica na formação do biofilme e resistência aos beta-lactâmicos em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de leite mastítico bovino / Viviane Figueira Marques. - 2016.

89 f.: il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

Bibliografia: f. 56-67.

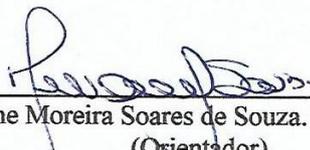
1. *Staphylococcus aureus* - Teses. 2. Drogas - Resistência em micro-organismos - Teses. 3. Mastite - Teses. 4. Expressão gênica - Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

VIVIANE FIGUEIRA MARQUES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em
Ciências Veterinárias.

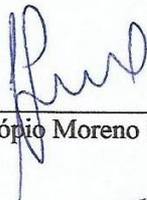
TESE APROVADA EM 02/03/2016.



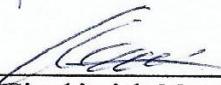
Miliane Moreira Soares de Souza. DSc. UFRRJ
(Orientador)



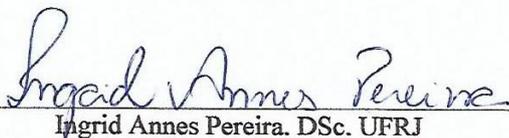
Huarrisson Azevedo Santos. DSc. UFRRJ



José Procópio Moreno Senna. DSc. FIOCRUZ



Marcia Giambiagi de Marval. DSc. UFRJ



Ingrid Annes Pereira. DSc. UFRJ

Deus e todos que acreditaram em mim

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e por ter me dado força e esperança em cada momento dessa jornada.

À minha família, e ao meu marido, Vagner Fernandes Cabral, por toda a compreensão e carinho que dedicam a mim. Muito obrigada, sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

À minha orientadora, Miliane Moreira Soares de Souza, que já na iniciação científica me apresentou ao mundo da pesquisa, obrigada pelos ensinamentos e “puxões de orelha” que me nortearam durante todos esses anos e me mostraram que era possível alcançar objetivos maiores em minha vida. Muito obrigada!!!

À minha co-orientadora, Shana de Mattos de Oliveira Coelho, muito obrigada, por todo o tempo que dedicou à correção deste trabalho e por todas as sugestões e apoio durante o desenvolvimento deste projeto.

À professora Irene da Silva Coelho, fundamental no desenvolvimento deste trabalho, que incentivou a nos aventurarmos por um mundo da pesquisa tão “difícil” e antes desconhecido por nós. Obrigada pela coragem, pelo incentivo, por todas as vezes que sentou comigo para discutir cada etapa deste projeto e por me ensinar tanto. Muito obrigada!!!

Ao professor Francisco de Assis Baroni, sempre disposto a nos ajudar, com seu jeito calmo e amigo. Muito obrigada!!!

Ao professor Huarrisson Azevedo Santos, por todo tempo dispensado durante o desenvolvimento deste projeto. Obrigado pela paciência e por todos os ensinamentos, essenciais para a conclusão das minhas análises de expressão.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ e aos residentes do Diagnóstico

Microbiológico pela presença, amizade, compreensão e auxílio em vários momentos. Obrigada!

Aos amigos que fiz no Laboratório hemoparasitos e vetores, Marquinhos, Claudinha, Maristela, Thamiris, Gabriela, Renata e Daniele, sempre disponíveis a me ajudar e me ensinar tantas coisas. Muito obrigada pela paciência e pelo carinho. Vocês foram muito importantes pra mim nessa jornada.

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 acolher durante estes dez anos, pelos amigos que fiz e pela excelente formação que recebi. Obrigada!!!

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, e iniciou o curso em março de 2012. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de setembro de 2012 a fevereiro de 2016.

RESUMO

MARQUES, Viviane Figueira. **Expressão gênica na formação do biofilme e resistência aos beta-lactâmicos em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de leite mastítico bovino.** 73 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Staphylococcus spp. tem papel importante na etiologia da mastite bovina. *Staphylococcus aureus* é considerada a espécie mais relevante devido à produção de fatores de virulência, tais como “slime”, o que favorece a formação do biofilme. O presente trabalho teve por objetivo detectar a expressão fenotípica da formação de biofilme em 20 isolados de *S. aureus* oriundos de mastite bovina, detectar e quantificar a expressão dos genes envolvidos na sua produção e regulação, além de detectar a resistência fenogenotípica aos beta-lactâmicos para avaliação da possível relação da produção de biofilme com a resistência antimicrobiana. Os isolados foram caracterizados através de testes fenogenotípicos e MALDI-TOF, submetidos às provas fenotípicas de detecção da formação de biofilme e avaliação da suscetibilidade aos beta-lactâmicos. A Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB) foram determinadas para três isolados selecionados com base na variação da intensidade da produção de biofilme. Posteriormente, todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR para detecção dos genes de produção de “slime” (*icaA* e *icaD*), proteína Bap (*bap*), beta-lactamase (*blaZ*) e proteína ligante de penicilina alterada (*mecA*). Além de detecção do sistema regulador Agr (*agr RNAIII*) e da tipificação do sistema Agr (*agr I*, *agr II*, *agr III* e *agr IV*). Foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para determinar o intervalo de tempo mais adequado para a análise do biofilme. A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada nos tempos selecionados para quantificar a expressão dos genes *icaA*, *icaD* e *hld* em três isolados com produção variada de biofilme. Todos os isolados foram produtores de biofilme e a maioria apresentou os genes *icaA* e *icaD*. Apenas um isolado apresentou o gene *bap*. O gene *agr* tipo II mostrou prevalência de 70%. A MEV mostrou mudanças graduais no arranjo bacteriano durante a formação de biofilme ao longo das fases da curva de crescimento que atingiu seu pico de formação na fase estacionária. A análise transcricional evidenciou maior expressão dos genes *ica* no tempo de 8 h de crescimento e *hld* em 24 h. Contudo, a cepa N-365 mostrou baixa produção dos genes *ica*. Para este estudo, a resistência à penicilina foi relacionada com a produção de beta-lactamase, enquanto a elevada CBM detectada para cefoxitina pode estar associada à proteção que o biofilme oferece, episódio evidenciado pelo fato dos isolados apresentarem valores de CIMB superiores aos CIMs testados para as células planctônicas.

Palavras-chave: *S. aureus*, *icaA*, *icaD*, *hld*, tipos de Agr, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

MARQUES, Viviane Figueira. **Gene expression in biofilm formation and resistance to beta-lactam in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine milk mastitic.** 73 p. Thesis (Doctor in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Staphylococcus spp. plays an important role in the etiology of bovine mastitis. *Staphylococcus aureus* is considered the most relevant specie due to the production of virulence factors such as “slime”, which is required for biofilm formation. This study aimed to detect the phenotypic expression of the biofilm formation in 20 *S. aureus* isolates from bovine mastitis, to detect and quantify the expression of genes involved in its production and regulation, as well as to detect the phenogenotypic resistance to beta-lactam in order to evaluate the possible relation between biofilm production and antimicrobial resistance. The isolates were characterized by MALDI-TOF and phenogenotypic identification assays. Also they were submitted to the phenotypic tests to evaluate biofilm production and the susceptibility to beta-lactams. Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration in the Biofilm (MICB) were determined to three isolates presenting distinct biofilm production. Futherly, a PCR for the detection of “slime” production genes (*icaA* and *icaD*), Bap protein (*bap*), beta-lactamase (*blaZ*) and protein altered penicillin-binding (*mecA*). Also, the Agr system was typified (*agr I*, *agr II*, *agr III* and *agr IV*) and its regulator (*agr RNAIII*) was detected. Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed to determine the most suitable time interval for biofilm analysis. Real-time PCR (qPCR) was performed at the chosen times to quantify the expression of *icaA*, *icaD* and *hld* genes in the three studied isolates. All 20 isolates were biofilm producers and most presented *icaA* and *icaD* genes. Only one isolate presented the *bap* gene. The *agr* gene type II presented a prevalence of 70%. The SEM showed gradual changes in bacterial arrangement during the biofilm formation along the phases of the growth curve. The peak was reached at the stationary phase. Transcriptional analysis revealed increased expression of *ica* genes at 8 h of growth and of *hld* at 24 h. However, for the N-365 strain the *ica* expression was of low yield. For this study, the penicillin resistance was related to the production of beta-lactamase otherwise the high MBC detected for cefoxitin may be associated to biofilm protection, evidentiated by the fact that the isolates have MICB values higher than MICs tested for planktonic cells.

KEY WORD: *S. aureus*, *icaA*, *icaD*, *hld*, Agr types, antimicrobial resistance.

LISTA DE ABREVIACÕES

ABHI = Ágar Infuso Cérebro Coração
AIS = moléculas autoindutoras
AMC = Amoxicilina + ácido clavulânico
AMH = Ágar Muller-Hinton
AMP-c = monofosfato de adenosina cíclico
AMVF = Ágar Manitol Vermelho de Fenol
APGF = Água-Pepto-Glico-Fosfatada
AS= Ágar sangue
Bap = Proteína associada a biofilme
cDNA = DNA complementar
CFO = Cefoxitina
CIM = Concentração Inibitória Mínima
CIMB = Concentração Inibitória Mínima no Biofilme
CBM = Concentração Bactericida Mínima
CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute*
Cq = “*quantification cycle*”
Ct = “*cycle threshold*”
CTSA = Caldo tripticase de soja
CRF = Fator de reação com a coagulase
DEPC = Dietilpirocarbonato
DNA = ácido desoxiribonucléico
DNase = desoxirribonuclease
dsDNA = DNA fita dupla
ECP = Estafilococos Coagulase Positivos
ECN = Estafilococos.Coagulase Negativos
EPS = Exopolissacarídeo extracelular
Fn = fibronectina
FnBPA = proteína ligante de fibronectina A
FnBPB = proteína ligante de fibronectina B
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
H₂O = água
O₂ = gás oxigênio
KOH = hidróxido de potássio

MH = “Müeller-Hinton”

mL = mililitros

mM = milimolar

min. = minuto

mm = milímetros

MALDI-TOF MS = Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (“Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry”)

NaCl = cloreto de sódio

nm = nanômetro

OXA = Oxacilina

pb = pares de base

PIA/ PNAG = adesina intercelular polissacarídica (β -1,6-N-acetilglicosamina)

pb = pares de base

PCR = “Polymerase Chain Reaction” - reação em cadeia da polimerase

PEN = Penicilina

pH = Potencial hidrogeniônico

qPCR = PCR em tempo real

QS = “Quorum Sensing”

RNA = ácido ribonucleico

RT-PCR = Transcriptase reversa-PCR

seg. = segundo

ssDNA = DNA fita simples

U = unidade

V = voltagem

VP = “Voges Proskauer”

$x g$ = força gravitacional

μg = micrograma

μL = microlitro

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

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Desenvolvimento de um biofilme. 7
Figura 2	Esquema da biossíntese de PIA. 8
Figura 3	Diagrama esquemático do gene regulatório <i>agr</i> . 12
Figura 4	Esquema mostrando o sistema Agr de <i>S. aureus</i> regulando a formação do biofilme. 13
Figura 5	Gráfico apresentando o percentual de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> com formação de biofilme forte, moderada e fraca. 34
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos genes <i>icaA</i> (1315 pb), <i>icaD</i> (381 pb) e <i>bap</i> (971 pb). 36
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos genes <i>agr</i> (<i>RNA III</i>) (200 pb) e <i>agr II</i> (572 pb). 37
Figura 8	Micrografia eletrônica de varredura da cepa N-341 mostrando as mudanças morfológicas ao longo do crescimento. 39
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do gene <i>blaZ</i> (861 pb). 41
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA total. 45
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de qPCR dos genes <i>icaA</i> (151 pb), <i>icaD</i> (211 pb), <i>hld</i> (74 pb), <i>gyrB</i> (242 pb) e 16S rRNA (191 pb). 46
Figura 12	Curva de dissociação dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>hld</i> , <i>gyrB</i> e 16S rRNA avaliados por qPCR. 47
Figura 13	Eficiência de amplificação dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>hld</i> e 16S rRNA de <i>Staphylococcus aureus</i> . 48
Figura 14	Expressão transcricional dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>hld</i> da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> N-354, fraca produtora de biofilme, isolada de mastite bovina. 49
Figura 15	Expressão transcricional dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>hld</i> da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> N-341, forte produtora de biofilme, isolada de mastite bovina. 51
Figura 16	Expressão transcricional dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>hld</i> da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> N-365, produtora moderada de biofilme, isolada de mastite bovina. 52

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Oligoiniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.	22
Quadro 2. Oligoiniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Quadro 3. Oligoiniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Quadro 4. Oligoiniciadores empregados nos ensaios de amplificação da qPCR	31

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Teste de otimização das concentrações dos oligoiniciadores utilizados na qPCR	32
Tabela 2. Produção de biofilme e presença dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>bap</i> em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina	35
Tabela 3. Tipificação do sistema Agr e presença dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina	41
Tabela 4. Resultados de CIM e CIMB de cefoxitina em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina	42

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.2. Fatores de virulência	4
2.3. Formação de biofilme	5
2.3.1. Produção de “slime” (genes <i>icaADB</i> e <i>C</i>)	7
2.3.2. Produção de biofilme <i>ica</i> -independente	9
2.4. Sistema de regulação de exoproteínas (<i>Agr</i>)	10
2.5. Resistência associada à formação do biofilme bacteriano	13
2.6. Expressão gênica e a Transcriptase-reversa-PCR (RT-PCR)	15
2.7. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	16
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Amostragem	21
4.2. Detecção fenotípica da formação do biofilme	22
4.2.1. Formação do biofilme em microplaca	22
4.2.2. Estimativa da curva de crescimento	23
4.2.3. Preparo do biofilme para observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	23
4.3. Detecção genotípica da formação do biofilme e do Sistema regulatório <i>Agr</i>	24
4.3.1. Extração do DNA bacteriano	24
4.3.2. Detecção dos genes de formação do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> e tipificação de <i>Agr</i>	25
4.4. Avaliação da resistência feno-genotípica aos beta-lactâmicos	26
4.5. Determinação da concentração inibitória mínima de cefoxitina no biofilme (CIMB)	28
4.6. Estudo da expressão gênica da formação do biofilme em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
4.6.1. Extração do RNA total	29
4.6.2. Síntese do cDNA	30
4.6.3. Oligoiniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real (qPCR)	30

4.6.4. Padronização das reações de qPCR	31
4.6.5. Análise da expressão gênica	32
4.7. Análise estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Formação de biofilme e amplificação dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>bap</i>	34
5.2. Gene <i>agr</i> (<i>RNA III</i>) e tipificação do sistema Agr	37
5.3. Caracterização da curva de crescimento e MEV de <i>S. aureus</i>	38
5.4. Resistência aos beta-lactâmicos	40
5.5. Determinação da concentração inibitória mínima no biofilme (CIMB)	42
5.6. Análise da expressão dos genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>hld</i> durante a formação do biofilme em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Staphylococcus* spp. têm papel importante na etiologia das infecções intramamárias do gado leiteiro. Destas, os *Staphylococcus aureus*, destacam-se entre os agentes etiológicos prevalentes neste tipo de infecção (CHAGAS et al., 2012; SAEI, 2012).

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. Entre os vários fatores de virulência produzidos por *Staphylococcus aureus* está a produção de um mucopolissacarídeo extracelular (“slime”), que parece ajudar na aderência e colonização do microrganismo ao epitélio glandular mamário, participando na formação do biofilme, que é descrito 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).

O “slime” é composto por um polissacarídeo de alto peso molecular chamado adesina intercelular polissacarídica (PIA), que é um polímero de carga positiva de resíduos de β -1,6-N-acetilglicosamina, também conhecido como PNAG. 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 transmembrana e pode sintetizar polímeros curtos de PNAG *in vitro* utilizando GDP-N-acetilglicosamina como um substrato. ICAD aumenta a eficiência de biossíntese de ICAA (GAD et al., 2009; ATKIN et al., 2014).

Existem mecanismos *ica*-independentes que podem também ter importância na formação do biofilme bacteriano. Um exemplo é o 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).

A resistência a alguns antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite também pode estar associada à formação de biofilmes (AMORENA et al., 1999). Entre os mecanismos responsáveis por essa resistência estão a barreira de difusão física e química formada pela matriz exopolissacarídica, que dificulta a penetração dos antimicrobianos, a existência de microambientes que antagonizem a ação do antibiótico, a ativação de respostas

de estresse que provocam mudanças na fisiologia bacteriana, o crescimento estável e mais lento desses microrganismos devido à limitação de nutrientes e também devido a ausência de alvos dos antimicrobianos (COELHO et al., 2011).

A delicada coordenação da expressão dos fatores de virulência usualmente espécie-específicos é crucial para a sobrevivência do patógeno e consequente 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) tem grande importância. Em *Staphylococcus aureus* o sistema QS melhor caracterizado é denominado *agr*. O locus *agr* é um sistema multigênico complexo que responde à densidade celular bacteriana, controlando a expressão de adesinas e exoproteínas de *S. aureus*.

Em bactérias, o controle da expressão gênica permite que as células se ajustem às mudanças nutricionais no ambiente, de forma que o seu crescimento e divisão sejam otimizados. Medir a expressão gênica é fundamental em muitas áreas de pesquisa e, neste contexto, a técnica de PCR em tempo real (qPCR) se tornou referência para a quantificação de ácidos nucleicos (BUSTIN et al., 2009) e uma poderosa ferramenta para a quantificação da expressão gênica (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

Frente à importância da formação do biofilme no desenvolvimento da mastite causada por *Staphylococcus aureus* o presente trabalho teve por objetivo detectar a expressão fenotípica da produção deste fator de virulência, detectar e quantificar os genes envolvidos na sua produção e regulação, além de detectar a resistência fenogenotípica aos betalactâmicos para avaliação da possível relação da formação de biofilme com a resistência antimicrobiana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Staphylococcus aureus*

A espécie *Staphylococcus aureus* pertence ao gênero *Staphylococcus*, família *Staphylococcaceae*, que de acordo com suas características morfológicas são 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, e podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Todos são catalase-positivos, característica que os diferencia dos estreptococos que são catalase-negativos. A catalase é uma enzima que converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e gás oxigênio (O_2). De acordo com a sua capacidade de produção da coagulase, o gênero *Staphylococcus* spp. é subdividido em dois grupos, *Staphylococcus* coagulase-negativos e *Staphylococcus* coagulase-positivos, sendo o *S. aureus* pertencente a este último grupo. 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., 2012).

A identificação fenotípica da espécie é feita com base em testes bioquímicos de fermentação de açúcares (maltose e manose) e produção de acetoina através da via butilenoglicol (teste de Voges-Proskauer), critério proposto por KONEMAN et al. (2012), sendo a espécie *S. aureus* positiva para os três testes, fatores que os diferenciam das demais espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

Testes moleculares baseados na detecção de oligonucleotídeos espécie-específicos têm sido empregados na identificação de *S. aureus* em diversos laboratórios e permitem relacionar os resultados dos testes fenotípicos aos genotípicos (LANGE et al, 2011). Os marcadores moleculares são mais sensíveis e específicos, permitindo uma precisa e rápida identificação, e por isso estão sendo cada vez mais utilizados no diagnóstico de amostras clínicas (BLAIOTTA et al., 2010). Diversos genes para identificação bacteriana estão disponíveis na literatura, dentre estes os genes *23S rDNA*, *coa* e *nuc* de *S. aureus*, podem ser usados para identificação da espécie em estudo (CIFTCI et al, 2009; STRAUB et al., 1999; HOOKEY et al, 1998).

Nos últimos anos, uma análise proteômica baseada na comparação entre o espectro de massa da amostra desconhecida e o espectro de massa de cepas referenciadas, técnica chamada de espectrometria de massa MALDI-TOF MS, ou Espectrometria de Massa por

Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz, vem ganhando destaque na literatura pelo uso na identificação de diferentes microrganismos ao nível de espécies (ALATOOM et al., 2011; BANNOEHR et al., 2012; CARBONNELLE et al., 2011). Para *Staphylococcus aureus*, a identificação por MALDI-TOF MS de isolados clínicos teve alta especificidade e sensibilidade (BÖHME et al., 2012).

A espécie *S. aureus* faz parte da microbiota residente ou transitória de seres humanos e animais, e constitui um patógeno oportunista, o que não diminui seu potencial patogênico. *Staphylococcus aureus* é a espécie mais patogênica do gênero, estando associada a um amplo espectro de infecções, tais como infecções de pele e tecidos moles, pneumonias, bacteremias, endocardites, meningites e abscessos (KONEMAN et al., 2012; LEITE, 2013). *S. aureus* também está relacionado com infecções relacionadas a dispositivos artificiais, como próteses, catéteres e outros biomateriais. Este tipo de infecção está diretamente relacionada a capacidade destas bactérias formarem biofilmes (ARCIOLA et al., 2011; MONTANARO et al., 2011).

O patógeno *Staphylococcus aureus* também causa mastites em rebanhos bovinos em todo o mundo. Estudos epidemiológicos realizados em rebanhos leiteiros no Brasil têm demonstrado uma prevalência de cerca de 50% de *S. aureus* neste tipo de infecção (CHAGAS et al., 2012). Infecções intramamárias causadas por esta bactéria geralmente se manifestam como uma forma subclínica que evolui para um quadro crônico. Uma possível razão para a persistência do patógeno no úbere é a formação de biofilmes, que são comunidades de bactérias aderidas a superfícies e envoltas em uma matriz composta principalmente por polissacarídeos (FABRES-KLEIN et al., 2015).

2.2. Fatores de virulência

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 (MARQUES et al., 2013).

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 denominado “slime”, relacionado a produção do biofilme, 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 gama), 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 modificadas através de mutação, evolução clonal, e transferência horizontal de genes ou de plasmídeos (JAYARAMAN, 2009 in KUMAR, 2010).

2.3. Formação de biofilme

A maioria das bactérias na natureza não estão presentes na sua forma livre ou como células isoladas, em vez disso, elas são frequentemente encontradas associadas com superfícies. Estas comunidades microbianas, chamadas biofilmes, são compostas de aglomerados de bactérias dentro de uma matriz de exopolissacarídeo extracelular (EPS). 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). Contudo, os biofilmes de origem estafilocócica não são normalmente misturados com outras espécies (ARCIOLA et al., 2005).

Os biofilmes são populações de microrganismos que crescem sobre uma superfície que está rodeado por EPS composto por proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, polissacarídeos, e DNA extracelular (WELLS et al., 2011). Biofilmes bacterianos são capazes

de resistir a antibióticos, desinfetantes, fagocitose e outros componentes da imunidade inata e adaptativa e sistema da defesa inflamatória do hospedeiro (ARCIOLA et al., 2012).

A formação do biofilme pode ser visto como um processo dividido em quatro etapas: 1) ligação inicial das células bacterianas; 2) agregação e formação de múltiplas camadas de células; 3) maturação do biofilme e 4) destacamento das células do biofilme para iniciar um novo ciclo de formação de biofilme em outros lugares (figura 1). Durante o primeiro passo, as interações iniciais que ocorrem entre as bactérias e a superfície do material são inespecíficas e conduzida por diferentes forças: hidrofóbica, eletrostática e forças Lifshitz-Van DerWaals, entre outros. Além disso, existem proteínas específicas que medeiam a ligação às superfícies abióticas, as autolisinas. Autolisinas estão associados com a superfície por interações iônicas ou hidrofóbicas e possuem uma dupla função: enzimática (sendo hidrolases do peptidoglicano) e adesiva. Em *S. aureus*, a autolisina é a AtlA. O segundo passo, a formação de múltiplas camadas bacterianas, é um processo ativo mediado por adesinas denominadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) e por adesão intercelular. Durante esta fase, a superfície do biofilme é progressivamente colonizada. No entanto, é no passo subsequente que a maturação do biofilme acontece e características estruturais específicas do biofilme para a espécie bacteriana são desenvolvidas. Na quarta etapa, as bactérias protegidas na estrutura do biofilme retornam à sua forma planctônica inicial, e estão prontas para uma nova fase invasiva. Este passo final é portanto caracterizado pelo destacamento e dispersão bacteriana (ARCIOLA et al., 2012).

A habilidade dos *S. aureus* aderirem e colonizarem a superfície do epitélio tem sido associada 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 (COELHO et al., 2011).

A produção do biofilme pode ser analisada tanto por métodos fenotípicos, teste de detecção em microplaca desenvolvido por Christensen et al. (1985) e o teste de ágar vermelho Congo como descrito por Freeman et al. (1989), e através da detecção molecular do locus *ica* (ARCIOLA, et al., 2002). Somente a detecção molecular do locus *ica* é insuficiente para

determinar um fenótipo de produção de biofilme verdadeiro, uma vez que existem diferentes mecanismos e condições ambientais que influenciam a expressão final de formação do biofilme. Por isso, ambos, os testes moleculares e fenotípicos devem ser utilizados nesta caracterização (ARCIOLA et al., 2012).

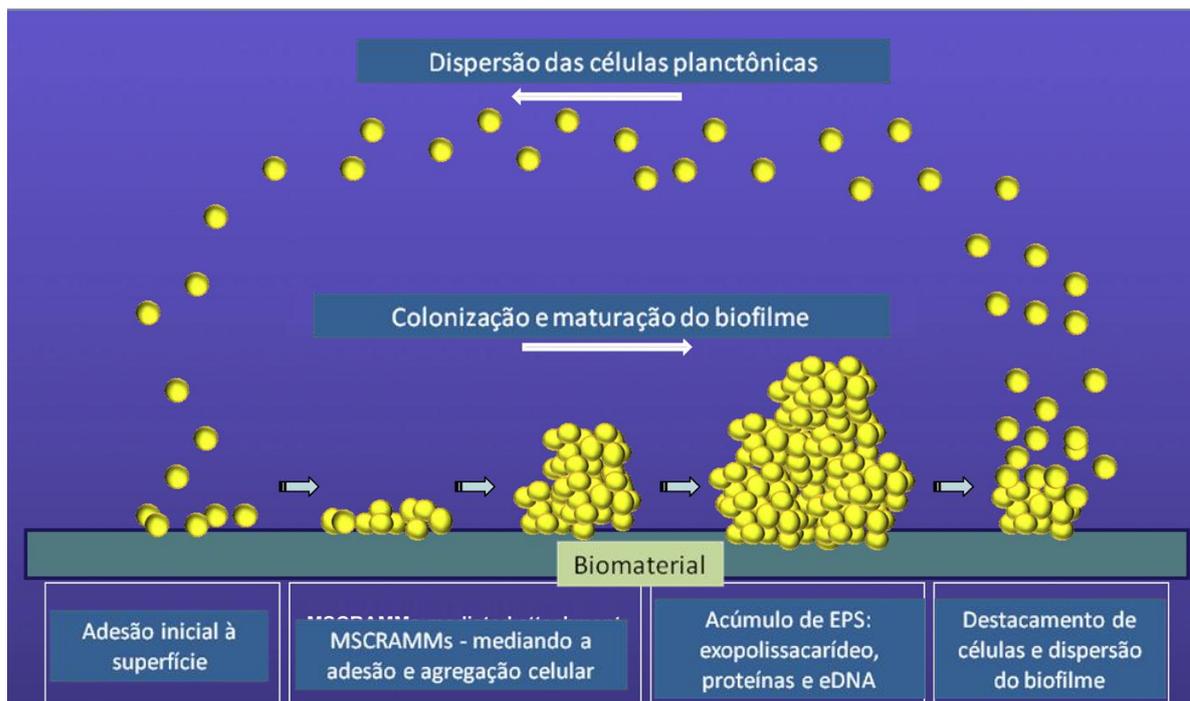


Figura 1. Desenvolvimento de um biofilme. 1) ligação inicial das células bacterianas; 2) agregação e formação de múltiplas camadas de células; 3) maturação do biofilme e 4) destacamento das células do biofilme para iniciar um novo ciclo de formação de biofilme em outros lugares (Adaptado de ARCIOLA et al., 2012).

2.3.1. Produção de “slime” (genes *icaADB* e *C*)

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 mucopolissacarídeo 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 adesina intercelular polissacarídica (PIA), que é um polímero de carga positiva de resíduos de β -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 (figura 2). ICAA é uma glicosiltransferase trans-membrana e pode sintetizar polímeros curtos de PNAG *in vitro* utilizando GDP-N-acetilglicosamina como um substrato. ICAD compreende uma proteína trans-membrana e é necessária para a plena atividade de ICAA, aumentando sua eficiência de biossíntese. ICAB corresponde a uma N-desacetilase específica de PNAG. Quanto à proteína ICAC, estudos anteriores afirmavam que ela estava envolvida na rota de exportação do polissacarídeo para o exterior da célula, no entanto, estudos recentes propõem que essa função seja realizada pela porção ICAAD. Assim o ICAC teria a função de modificar o polissacarídeo através de uma reação de O-succinilação (GAD at al., 2009; ATKIN et al., 2014).

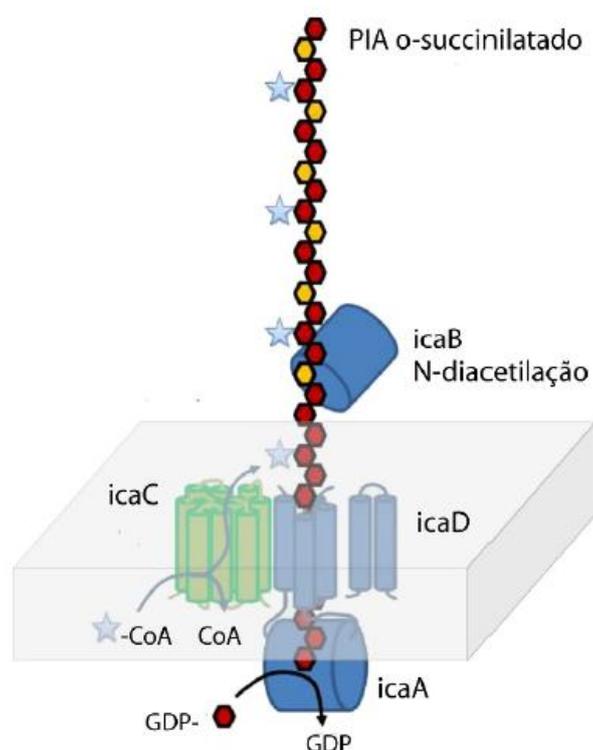


Figura 2. Esquema da biossíntese de PIA. Rota de exportação de PIA através da porção ICAAD e O-succinilação catalisada por ICAC (Adaptado de Atkin et al., 2014).

O locus *ica* foi inicialmente descoberto e investigado em *S. epidermidis* e mais tarde em *S. aureus*, assim como em várias outras espécies de *Staphylococcus* (HEILMANN et al., 1996; CRAMTON et al., 1999). Uma notável prevalência do locus *ica* foi documentada em uma coleção de isolados clínicos de *S. aureus* por Arciola et al. (2001). Com o aprimoramento destes conhecimentos, as sequências de DNA homólogo ao locus *ica* puderam ser detectados em muitas espécies de estafilococos, incluindo *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caseolyticus*, *S. condimenti*, *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* (MACK et al., 2006).

Ziebuhr et al. (1999) descobriram que o fenótipo de biofilme-negativo estava associado com a produção diminuída do PIA devido a introdução do elemento de sequência de inserção IS256 no locus *ica*. A transposição do IS256 no operon *ica* verificou-se ser um processo reversível. Em trabalho posterior, foram detectados 2 mutantes de estafilococos com a sequência IS256 inserida no gene *icaC* e não produtor de biofilme (ARCIOLA et al., 2004). Esses dados confirmaram a importância do operon funcional *ica* para expressão do fenótipo formador de biofilme.

A observação de que o locus *ica* está presente em *S. aureus* e é necessário para a formação do biofilme, mostra a necessidade de estudar mais exhaustivamente o papel dos genes *ica* nesta espécie, a composição e regulação genética do biofilme, além do seu papel como um fator crítico da virulência (ARCIOLA et al., 2012).

2.3.2. Produção de biofilme *ica*-independente

Em estudos desenvolvidos por O’Gara et al. (2007), verificou-se que em alguns isolados de *S. aureus* que transportavam o operon *ica*, a exclusão deste operon não prejudicou a sua capacidade de produção do biofilme, concluindo que o biofilme pode ser produzido através de uma via independente de *ica*. Na verdade, a matriz extracelular de biofilmes também abriga proteínas adesivas que estão implicados na formação do biofilme, entre estas, a proteína associada a biofilme (denominada Bap) foi descoberta por Cucarella et al. (2001). Este mecanismo alternativo de síntese do biofilme baseia-se na capacidade de *S. aureus* expressar uma variedade de proteínas de adesão que permite que as células colonizem um grande número de superfícies diferentes. Estas proteínas, encontradas principalmente ancorada na parede celular de *S. aureus*, mantêm as células juntas dentro do biofilme, provavelmente, interagindo com outras proteínas da superfície das células vizinhas. Estudos desenvolvidos por Latasa et al., (2006) mostrou que para algumas cepas bacterianas, a

expressão da proteína Bap é suficiente para a formação do biofilme, não havendo a necessidade do EPS para a sua formação.

O gene *bap* foi detectado no genoma de isolados de diversas espécies de estafilococos, incluindo *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hyicus* isolados de humanos e animais (TORMO et al., 2005; POTTER et al., 2009). Em *S. aureus*, o gene *bap* foi encontrado exclusivamente em cepas isoladas de mastite bovina (CUCARELLA et al., 2001). O papel da proteína Bap em infecções por estafilococos humanos parece estar limitada a espécies de ECN e não é confirmada para *S. aureus* (ARCIOLA et al., 2012).

Além de Bap, outras proteínas estafilocócicas estão envolvidos na formação do biofilme ica-independente. Foram encontradas cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* que produziam biofilme por um mecanismo ica-independente (ROHDE et al., 2007). Este mesmo estudo, identificou a proteína AAP como sendo a principal envolvida na formação do biofilme em *S. epidermidis* e a proteína SASG em *S. aureus*.

Um novo fenótipo de biofilme foi identificado em estudo realizado com isolados de *S. aureus*. Neste estudo, o fenótipo formador de biofilme foi promovido pelas proteínas de ligação à fibronectina FnBPA e FnBPB (HOUSTON et al., 2011). 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 (BUCK et al., 2010). Existem evidências, de que os componentes da matriz do biofilme de *S. aureus* podem ser de base proteica ou exopolissacarídea, e a bactéria modula essa expressão diferencial de acordo com os estímulos ambientais (ARCIOLA et al., 2012).

2.4. Sistema de regulação de exoproteínas (Agr)

A expressão do operon *ica* e produção do biofilme depende de várias condições ambientais e também da densidade populacional. Comunidades bacterianas produzem e secretam moléculas de sinalização, denominadas autoindutores, que desencadeiam uma cascata de respostas celulares. Este mecanismo de comunicação célula-célula, chamado *quorum sensing*, controla um grande número processos na célula, inclusive a formação do biofilme. Em *Staphylococcus* spp. o sistema *quorum sensing* bem caracterizado é denominado *agr*. O locus 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. O sistema Agr é ativado durante a transição da fase exponencial para a estacionária de crescimento. Sob estas circunstâncias, um peptídeo modificado sinaliza o estado de densidade celular (COELHO et al., 2011).

A estratégia utilizada por *S. aureus* para causar doença se baseia no sistema *quorum sensing*, 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. 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 (MARQUES et al., 2013).

O sistema Agr é formado por quatro genes (*agrA*, *agrC*, *agrD* e *agrB*) que são co-transcritos (figura 3). O sistema está organizado em um complexo de transdução de membrana de dois componentes (AgrA e AgrC), um peptídeo de sinalização pró-(AgrD), e um componente de membrana (AgrB), responsável pela externalização do peptídeo de sinalização modificado. A molécula de sinalização, também chamada de peptídeo autoindutor (AIP), é um peptídeo formado por 7-9 aminoácidos. A molécula efetora do sistema Agr é um RNA regulatório, o RNAIII, cuja síntese é dependente da ativação do sistema Agr e conduzida pelo promotor do sistema Agr P3. RNAIII, uma molécula de RNA de 514 nucleotídeos, regula a expressão de muitos genes que codificam exoproteínas e proteínas associadas à parede celular de *S. aureus*. Além da sua função regulatória, RNAIII é o RNAm que codifica a delta-toxina (GEISINGER et al., 2012).

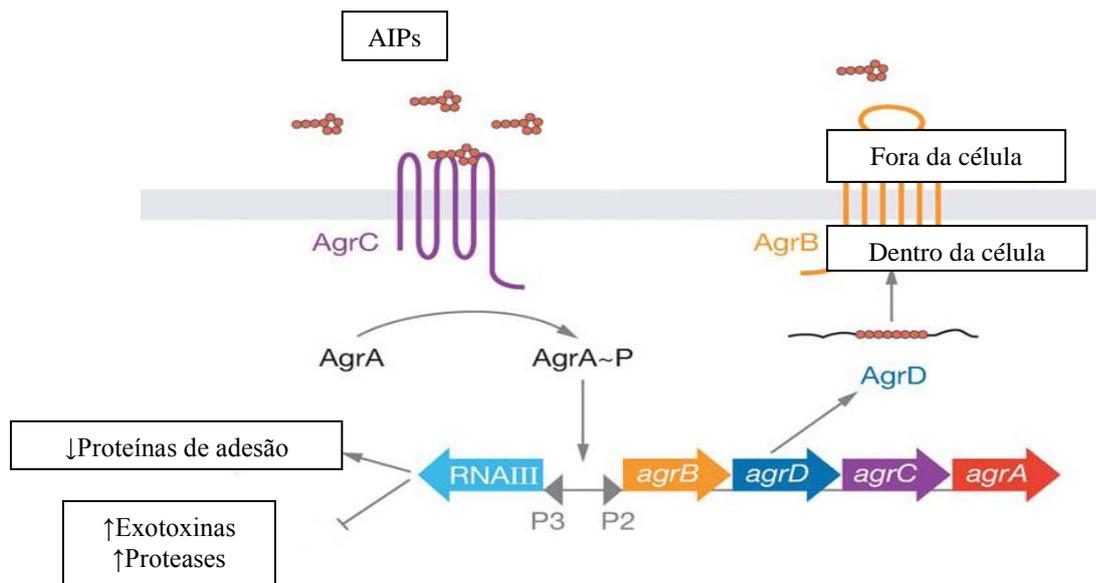


Figura 3. Diagrama esquemático do gene regulatório *agr* (Adaptado de Waters & Bassler, 2005).

Em *S. aureus*, existem quatro grupos Agr caracterizados de acordo com a diferença na sequência de aminoácidos do AIP. Os quatro grupos Agr foram caracterizados, numerados de I a IV e tem sido observado que a atividade de Agr dentro de um grupo inibe a atividade de outros grupos. Este fenômeno é conhecido como "interferência bacteriana". Estudos recentes indicam que os grupos de Agr distintos estão associados à padrões de virulência e ocorrência em quadros infecciosos e região geográfica específica, o que indica uma distribuição clonal dos tipos de Agr (MONTANARO et al., 2011).

Dentre os fatores de virulência de *S. aureus* que são controlados pelo sistema Agr está a produção de PIA. Quando secretado, PIA é detectado por AgrC, o qual ativa o regulador de AgrA. Por sua vez, AgrA regula positivamente a transcrição de genes, incluindo aqueles que codificam as proteases extracelulares envolvidas na dispersão do biofilme. Assim, no caso de *S. aureus*, o *quorum sensing* regula negativamente a formação de biofilme (figura 4). A fase de dispersão, a qual envolve o desprendimento de uma única célula ou grupos de células, é fundamental para a disseminação da bactéria para novos locais de infecção no organismo (BOLES & HORSWILL, 2008). A delicada coordenação da expressão dos fatores de virulência usualmente espécie-específicos é crucial para a sobrevivência do patógeno e consequente sucesso da invasão no hospedeiro (VOJTOV et al., 2002).

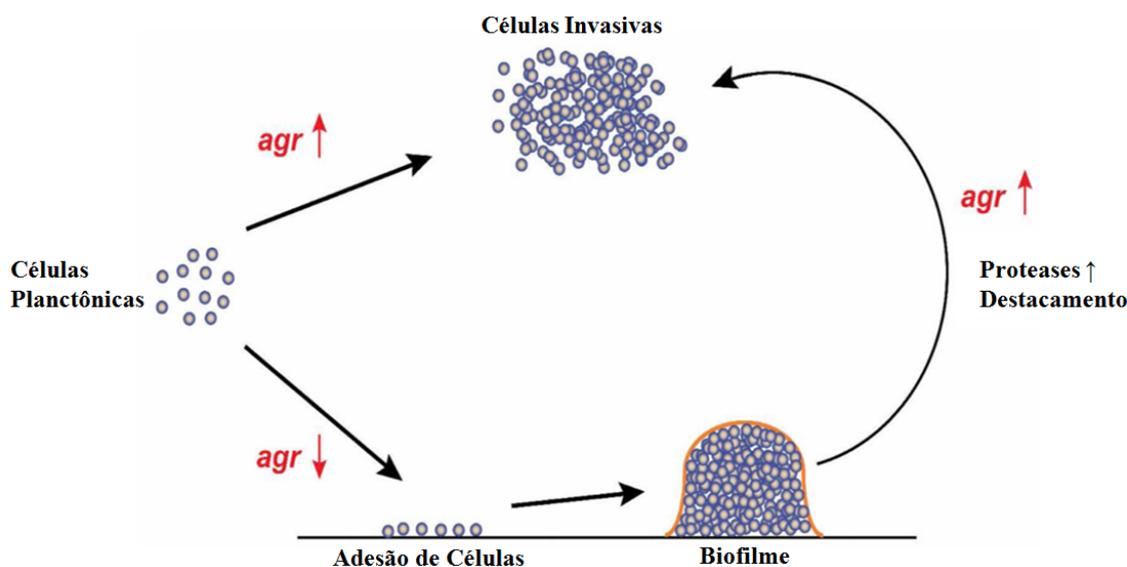


Figura 4. Esquema mostrando o sistema Agr de *S. aureus* regulando a formação do biofilme. Quando o sistema Agr está ativo, *S. aureus* secretam fatores invasivos e permanecem planctônicos. Quando o sistema Agr está desativado, *S. aureus* adere a superfícies e forma biofilme. Se a situação reverter e o sistema Agr tornar-se ativo, as células podem se destacar por mecanismo dependente de proteases e retornar ao estado planctônico. Esquema baseado em experimentos *in vitro* (Adaptado de Thoendel et al., 2012).

2.5. Resistência associada a formação do biofilme bacteriano

O agente patogênico *Staphylococcus aureus* frequentemente forma biofilme em superfícies biológicas e inertes durante a infecção. Estas infecções são diversas e incluem colite, vaginite, uretrite, otite, infecções dentárias, infecções do trato biliar, conjuntivite, prostatite, osteomielite, infecções em úlceras de queimaduras, endocardite, infecções pulmonares, fibrose cística e infecções associadas a dispositivos de longa permanência tais como catéteres, próteses de articulações, válvulas cardíacas, e stents. Os biofilmes protegem as bactérias contra os efeitos do sistema imune do hospedeiro e de drogas antibacterianas (WELLS et al., 2011; SAVAGE et al., 2013).

A formação de biofilmes em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite também pode estar associada à resistência a alguns antimicrobianos (AMORENA et al., 1999). Entre os mecanismos responsáveis por essa resistência estão a barreira de difusão física e química formada pela matriz exopolissacarídica, que dificulta a penetração dos antimicrobianos, a existência de microambientes que antagonizem a ação do antibiótico, a ativação de respostas de estresse que provocam mudanças na fisiologia bacteriana, o crescimento estável e mais

lento desses microrganismos devido à limitação de nutrientes e também devido a ausência de alvos dos antimicrobianos (COELHO ET AL., 2011).

Ryder e colaboradores (2012) discutiram o fato de que estafilococos em biofilmes apresentaram maior frequência de mutação, acelerando, assim, o surgimento de resistência a antibióticos. Esses autores verificaram que a frequência de mutação das culturas de *S. aureus* em biofilme aumentou em até 60 vezes em comparação com as culturas planctônicas. Observaram ainda que a incorporação de antioxidantes nos biofilmes de *S. aureus* reduziu a frequência de mutação, indicando que o aumento do estresse oxidativo pode estar relacionado à mutabilidade elevada (RYDER et al., 2012). Além disso, já foi verificado que, em biofilmes de *S. aureus* há um drástico aumento na frequência de eventos de transferência de plasmídeo por conjugação, promovendo assim a propagação horizontal da resistência a determinados antibióticos. Este fenômeno provavelmente resulta, em parte, do maior contato célula-a-célula que ocorre no biofilme e o fato de que a matriz do biofilme pode estabilizar os contatos entre bactérias vizinhas. Uma vez que os estafilococos residentes em biofilmes mostram frequências de mutação elevadas, além do aumento de eventos de transferência de plasmídeos, estas observações identificam o biofilme como um ambiente privilegiado para o surgimento e propagação da resistência a antibióticos em *S. aureus* (SAVAGE et al., 2013).

Em algumas infecções com bactérias geneticamente suscetíveis, o tratamento pode falhar devido a mecanismos de resistência associada à formação de biofilmes. Como já foi dito, as bactérias embebidas em EPS são mais resistentes aos antibióticos do que células planctônicas (KIRBY et al., 2012). Infelizmente, não há métodos universalmente aceitos para estudar a sensibilidade aos antibióticos nas bactérias em biofilmes (WELLS et al., 2011).

Uma forma utilizada para abordar esta questão tem sido a de comparar a Concentração Inibitória Mínima de antibióticos para bactérias em biofilmes (CIMB) com a correspondente Concentração Inibitória Mínima (CIM) correspondente dessas bactérias estimados pelos protocolos padrão para células plânctônicas (KEAYS et al., 2009). Uma limitação deste método é a incapacidade de controlar o estado fisiológico e a densidade das bactérias em biofilmes, tais como são controlados no protocolo de determinação do CIM padronizado pelo CLSI. A susceptibilidade de bactérias aos antibióticos, varia de acordo com o seu estado fisiológico; por exemplo, bactérias em fase estacionária são mais resistentes aos antibióticos do que em populações com crescimento exponencial. Além disso, os valores de CIM dos antibióticos aumentam com a densidade bacteriana (KIRBY et al., 2012).

Dada a importância de melhorar o tratamento de infecções relacionadas com o biofilme, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para impedir e erradicar biofilmes é

uma área de ativa pesquisa. O desenvolvimento de medidas eficazes de abordagens antibiofilme não só permitem melhorar o tratamento de infecções relacionadas com biofilme, mas também pode potencialmente oferecer benefícios para retardar a taxa de disseminação da resistência aos antibióticos (SAVAGE et al., 2013).

2.6. Expressão gênica e a Transcriptase-reversa-PCR (RT-PCR)

Expressão gênica refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada, por meio da transcrição e da tradução, em RNAm e proteína, respectivamente. Em um organismo, seja eucarioto ou procarioto, alguns genes não são expressos o tempo todo, existindo a regulação da expressão gênica e esta encontra-se intimamente ligada à identidade e/ou metabolismo do organismo. Em bactérias, o controle da expressão gênica permite que as células se ajustem às mudanças nutricionais no ambiente, de forma que o seu crescimento e divisão sejam otimizados (MADIGAN et al., 2010).

Medir a expressão gênica é fundamental em muitas áreas de pesquisa, que vão desde a ciência básica às aplicações na indústria e na medicina humana e veterinária. Na maioria dos estudos de expressão gênica, os investigadores estão interessados em determinar os níveis de expressão relativa do gene testado em face de amostras controle. A simplicidade conceitual e prática, em conjunto com a combinação de velocidade, sensibilidade, e especificidade em um mesmo ensaio, tornaram a técnica de PCR em tempo real (qPCR) como referência para a quantificação de ácidos nucleicos (BUSTIN et al., 2009) e uma poderosa ferramenta para quantificação da expressão gênica (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

O uso da qPCR para medir níveis de expressão de RNA mensageiros específicos requer o isolamento de RNA, conversão do mesmo em cDNA pela enzima transcriptase reversa e finalmente a amplificação e detecção dos produtos gerados em tempo real. Diferentes estratégias de detecção de fluorescência foram desenvolvidas, destas o *SYBR Green I* aparece como uma ferramenta bastante utilizada em ensaios de expressão gênica (SIHTO et al., 2014).

O isolamento do RNA constitui uma técnica laboriosa e delicada, uma vez que o RNA é uma molécula bastante instável e extremamente sensível a ação de ribonucleases (RNAses). Desta forma, uma boa extração de RNA depende de cuidados que visam diminuir a contaminação por RNAses. Dentre estes, destaca-se o uso de luvas, de água com DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAses), de materiais plásticos RNase-free e vidrarias

submetidas à tratamentos térmicos, além de boas práticas de laboratório (SAMBROOK et al., 2002).

Após o isolamento do RNA e verificação de sua integridade através de técnica de eletroforese em gel de agarose, o RNA deve ser submetido a reação de transcriptase-reversa-PCR (RT-PCR). Nesta etapa a molécula de RNAm serve como molde para a síntese de uma molécula de DNA complementar (cDNA), molécula mais estável que o RNA. A RT-PCR é composta por duas etapas. Na primeira etapa, moléculas de RNAm são moldes para a síntese de uma fita de DNA complementar a sua sequência, chamada de cDNA. Nesta etapa, pode-se utiliza-se o oligoiniciador Oligo-dT, formado por uma sequência de desoxitimas que irá anelar na cauda poli-adenina presente no RNAm de eucarioto. Outro oligoiniciador que pode ser utilizado é o *random* oligoiniciadores, indicado para amostras de RNA sem cauda poli-adenina, no caso de procaríotos. A polimerização da cadeia de cDNA é realizada pela adição dos nucleotídeos complementares a fita de RNAm pela enzima transcriptase reversa. Após a síntese do cDNA, o RNAm molde é degradado pela ação da enzima RNase e o DNA fita simples (ssDNA) fica disponível para iniciar a PCR. A segunda etapa da reação é uma PCR simples ou qPCR, onde um par de oligoiniciadores específicos para o gene de estudo determinarão a região a ser amplificada. No final deste ciclo, teremos como produto um DNA fita dupla (dsDNA) (MADIGAN et al., 2010). Após a qPCR, os resultados obtidos com a amplificação dos genes de estudo deverão ser analisados conforme exposto em tópico posterior.

O estudo dos cDNAs nos permitem avaliar o padrão de expressão dos genes de um organismo em diferentes condições ambientais ou de estresses, por exemplo. A análise espacial e temporal da transcrição é um aspecto preliminar importante na genômica funcional. A comparação entre perfis transcricionais contrastantes pode auxiliar na identificação dos genes responsáveis pelo processo biológico em estudo e dos genes expressos durante as diferentes etapas do desenvolvimento (CALSA JÚNIOR et al., 2004)

2.7. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) foi descrita pela primeira vez em 1993 por Higuchi e colaboradores. Eles usaram uma câmara de vídeo para monitorar as reações em cadeia da polimerase durante o curso da termociclagem. Esta câmara de vídeo detectava o acúmulo de fitas duplas de DNA (dsDNA) através da fluorescência emitida pela ligação do dsDNA ao brometo de etídeo. Desta maneira, os autores puderam analisar a

cinética do acúmulo de fluorescência ao longo da PCR e relacioná-la ao número inicial de cópias de DNA na amostra (HIGUCHI et al., 1993).

O aprimoramento da qPCR permitiu sua aplicação em diversas áreas das ciências, sendo uma técnica bastante utilizada em ensaios de diagnóstico de patógenos pouco abundantes, em estudos de genotipagem/discriminação alélica e em estudos de expressão gênica.

A amplificação da reação de qPCR pode ser representada por uma curva dividida em 3 fases: fase linear, fase exponencial e fase de platô. A fase linear corresponde aos primeiros ciclos da reação, onde as amplificações ainda não são específicas. A fase exponencial é assim chamada, pois, é nessa fase que a reação tem a duplicação da quantidade de sequências alvo a cada ciclo, isso quando a reação tem próxima a 100% de eficiência (ideal > 90%). A última é a fase de platô, nessa etapa a reação atinge o platô nas amplificações. Isso devido, principalmente, ao fato de que os reagentes começam a ser exauridos (GOMES, 2011).

O principal fundamento na utilização desta técnica é o chamado limiar do ciclo, ou “*cycle threshold*” (Ct) também chamado de “*quantification cycle*” (Cq) ou ciclo de quantificação. O Ct (ou Cq) é definido como o ciclo da reação de qPCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada limiar ou “*threshold*”. Para apresentar os dados na forma de Ct, deve-se certificar que o limiar está delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do ruído de fundo (*baseline*) e abaixo da fase de platô da reação de qPCR. O Ct é, portanto o ciclo da reação onde a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial. O valor numérico do Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade inicial do alvo na amostra (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

Existem dois diferentes métodos para se analisar os resultados de um experimento utilizando qPCR: quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número exato de cópias da molécula de interesse (número de cópias do DNA ou transcrito), relacionando o sinal da qPCR a uma curva-padrão, com quantidades conhecidas de DNA. Por meio dos dados da curva-padrão, o software efetua a quantificação do DNA alvo nas amostras (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). A curva-padrão também fornece o coeficiente angular da reta (“*slope*”), que é importante para o cálculo da eficiência da amplificação (ϵ). “*Slope*” de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da PCR (KUBISTA et al., 2006). Deve-se levar em conta que o custo com a quantificação absoluta é maior devido ao gasto de maior quantidade de reagentes necessários para geração da curva-padrão, e, além disso, em muitos

casos é desnecessário apresentar os dados como número absoluto de cópias, sendo suficiente a expressão relativa dos mesmos (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008; SUDGEN & WINTER, 2008).

A quantificação relativa, ou método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), descreve a alteração na expressão do gene alvo relativo a um calibrador, amostra usada como base para comparar os resultados. Na quantificação relativa também é necessário um controle endógeno, um gene de controle interno usado para normalizar as diferenças nas quantidades de amostra. Uma das condições necessárias para que um gene possa ser considerado como controle interno é que as condições do experimento não influenciem sua expressão. Para o controle endógeno normalmente são escolhidos genes chamados de “housekeeping” ou genes constitutivos (SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000). Para utilizar o método de Ct comparativo é necessária a otimização das reações para que a eficiência da reação do gene de interesse seja similar a do controle interno, ou seja, ΔCt de aproximadamente 1 e um “slope” de até 0,1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). A quantificação relativa é aplicável na quantificação da expressão gênica, quando esta é medida em valores múltiplos de expressão.

Devido à precisão e sensibilidade da qPCR, ela é uma valiosa ferramenta no controle da expressão de genes sob diferentes condições de crescimento (BASTOS, 2013). A análise *in vitro* dos produtos da amplificação por qPCR é realizada através da detecção de compostos fluorescentes. Os métodos químicos de fluorescência utilizados na qPCR são diversificados, sendo os mais utilizados os corantes intercalantes e as sondas hidrolizáveis, do tipo *TaqMan*®.

As sondas hidrolizáveis são pequenas sequências de oligonucleotídeos marcados com um fluoróforo (Reporter) na extremidade 5' e um “quencher” na extremidade 3'. Essa sonda reconhece e se liga a uma região do interior da sequência alvo da PCR. Quando a Taq polimerase amplifica a região da sequência alvo, as sondas são clivadas, uma vez que o “quencher” se desliga do repórter há emissão da fluorescência. Essa fluorescência é diretamente proporcional ao número de “amplicons” produzidos. A metodologia de sondas específicas muitas vezes é considerada de maior confiabilidade, porém apresenta um custo maior (LEAL, 2012).

Os corantes intercalantes são fluorocromos sem especificidade para uma sequência particular de DNA, que se intercalam na dupla cadeia de qualquer produto da PCR permitindo a sua detecção. Exemplos de corantes intercalantes são: *SYBR*® *Green* (Molecular Probes®), *LCGreen*® *Plus* (Idaho Technology) e *EvaGreen*® (Biotium Inc) (OLIVEIRA, 2010). Destes, o mais antigo e mais utilizado é o *SYBR Green I*, sendo também a opção mais econômica do

mercado. O *SYBR Green I* é um corante que se liga ao DNA e à medida que a reação de qPCR avança, uma maior quantidade de *SYBR Green I* liga-se aos amplicons dupla-fita gerados, aumentando a fluorescência proporcionalmente à concentração do produto. Uma desvantagem deste método é que o *SYBR Green* se liga também a qualquer produto não específico que possa ser gerado, como por exemplo, dímeros de oligoiniciadores. Contudo, o desenho correto dos oligoiniciadores confere a especificidade da detecção e de quantificação através deste método. Além disso, através da análise da curva de dissociação ou curva de *melting*, gerada ao final da qPCR, é possível verificar a identidade do produto das amostras amplificadas. Se somente uma molécula foi formada, a curva de *melting* apresentará um único pico, se amplicons de tamanhos diferentes forem sintetizados estes formarão um pico com temperatura diferente. Por exemplo, dímeros de oligoiniciadores geralmente produzem um pico de dissociação em uma temperatura mais baixa, já que são de tamanho menor que os produtos verdadeiros, e desta maneira pode-se discriminar as moléculas formadas ao longo da qPCR (TOLEDO-SILVA, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar a regulação da produção do “slime” e formação do biofilme, associado à detecção da resistência ao beta-lactâmicos em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de leite mastítico bovino.

3.2. Objetivos específicos:

- Detectar os genes de virulência *icaA*, *icaD* envolvidos na produção de “slime” e do gene *bap* codificador da proteína Bap, ambos relacionados à formação do biofilme;
- Analisar, por técnica de microplaca e microscopia eletrônica, a expressão fenotípica da formação do biofilme;
- Estabelecer perfis dos isolados a partir do agrupamento dos dados fenotípicos e genotípicos;
- Detectar os tipos de Sistema Agr predominantes nas amostras estafilocócicas estudadas;
- Verificar o papel do *agr* como ativador na expressão gênica do “slime”;
- Determinar se os genes *icaA* e *icaD* são expressos em níveis diferentes durante o curso de formação do biofilme.
- Detectar a resistência fenogenotípica aos beta-lactâmicos em cepas de *S. aureus* cultivadas como células planctônicas e em células associadas ao biofilme bacteriano.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Um total de 120 amostras de leite foi coletado no período de outubro e novembro de 2012, originado de três fazendas de gado leiteiro localizadas nos municípios de Vassouras, Passa Três e Barra do Piraí, do estado do Rio de Janeiro. Estas propriedades foram selecionadas por apresentarem alta prevalência de mastite subclínica (superior a 50%) testadas através do California Mastitis Test (CMT) e contagem de células somáticas (CCS). Cinquenta e nove *Staphylococcus* spp. foram isolados, entre os quais 41 eram *S. aureus*. Para o estudo da produção de biofilme e resistência aos betalactâmicos, 20 *S. aureus* foram selecionados considerando o perfil de produção de biofilme.

Os isolados utilizados no presente estudo fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia Veterinária. Todos os isolados foram obtidos através do protocolo de isolamento e identificação descrito a seguir: inoculação primária das amostras de leite em ágar sangue (AS - ágar base enriquecido com 5% de sangue de carneiro) e incubação a 35 ° C por 24 h. Os cocos gram-positivos foram selecionados e submetidos a testes de rotina, incluindo inoculação em meio seletivo para análise de suas características coloniais e produção de catalase e coagulase. As amostras coagulase-positiva foram avaliadas para fermentação de maltose, D-manitol e produção de acetoina (KONEMAN et al., 2012). A confirmação do gênero *Staphylococcus* foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene *16S rRNA* (ZHANG et al., 2004). PCR dos genes *coa* (HOOKEY et al., 1998), *nuc* (CIFTCI et al., 2009) e *23S rDNA* (STRAUB et al., 1999) foram realizados para caracterizar a espécie *S. aureus* (quadro 1). A cepa padrão *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle.

A confirmação da identificação fenotípica dos isolados foi feita pela análise proteômica por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF), realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como descrito por Motta et al. (2014). Para essa análise, os isolados foram cultivados em ágar Infusão de Cérebro e Coração (ABHI-Himedia) a 37 °C por 24 h. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida, 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi

utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser 16 de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e, posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três. Neste trabalho, foi considerado aceitável, valores iguais ou superiores a dois.

Quadro 1. Oligoiniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação de *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Espécies	Oligoiniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>16S rRNA</i> (756 pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	1
23S rDNA (1250 pb)	<i>S.aureus</i>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1
<i>coa</i> (variável)	<i>S. aureus</i>	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	2
<i>nuc</i> (279 pb)	<i>S. aureus</i>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	3

*1. 94°C 5min (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10 min; 2. 94°C 4 min (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5 min; 3. 94°C 5 min (94°C 45 s, 68°C 45 s e 72°C 90 s) x 30 e 72°C 10 min.

4.2. Detecção fenotípica da formação do biofilme

4.2.1. Formação do biofilme em microplaca

A formação do biofilme em microplaca foi avaliada qualitativamente e quantitativamente através de metodologia descrita por Marques et al. (2013). Todos os 20 isolados foram repicados em ágar sangue de carneiro (AS) por 24 h a 35°C e as colônias crescidas foram inoculadas em ágar BHI e também incubadas a 35°C por 24 h. As culturas bacterianas foram ajustadas a escala 0,5 de McFarland e diluídas 1:10 em caldo TSA com adição de 0,24% de glicose. Alíquotas de 200µL desta suspensão foram inoculadas em

microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços e incubadas por 24 h à 35°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 490 nm 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. As cepas foram classificadas quanto à intensidade de formação de biofilme de acordo com os seguintes valores de OD obtidos: forte ≥ 0.3 ; moderado ≥ 0.2 e <0.3 e fraco ≥ 0.1 e <0.2 .

4.2.2. Estimativa da curva de crescimento

O isolado de *S. aureus* positivo para os genes *icaA*, *icaD* e *agr* e que apresentou forte formação de biofilme (N-341) na técnica da microplaca foi selecionado, para estimativa da curva de crescimento, a fim de determinar os pontos a ser realizada a microscopia eletrônica.

Uma alíquota de 1mL da cultura bacteriana (10^6 UFC/mL) foi transferida para um tubo contendo 9mL de caldo simples (2% de extrato de carne, 5% de peptona de carne, 2,5% de cloreto de sódio) e deixado sem agitação à 35 °C. O grau de turvação do caldo foi avaliado em intervalos de 2h sendo que os pontos considerados importantes para estimativa da curva foram: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 30h, 36h e 48h. As suspensões foram diluídas em solução salina (NaCl 0,85%) e uma alíquota de 0,1mL foi plaqueada em ágar para contagem (Plate Count Agar - PCA) e as placas foram incubadas a 35 °C durante 18 h. As células viáveis foram contadas e expressas em unidades formadoras de colônia por mL. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.2.3. Preparo do biofilme para observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observação das características morfológicas do biofilme formado pelo isolado com forte formação de biofilme ao longo do curso do crescimento bacteriano, este foi cultivado em placas de Petri contendo lamínulas de vidro para adesão do biofilme. O isolado foi repicado em AS por 24 h a 35°C e as colônias crescidas foram inoculadas em ágar BHI e também incubadas a 35°C por 24 h. A cultura bacteriana foi ajustada a escala 0,5 de McFarland e diluída 1:10 em caldo TSA com adição de 0,24% de glicose. Alíquotas de 2 mL

foram colocadas em cada placa de Petri contendo três lamínulas de vidro, e incubadas estaticamente a 35°C durante 4, 8, 12 e 24 h. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com salina (0,85% NaCl), a fim de remover todas as células planctônicas. As células aderentes foram fixadas com glutaraldeído 5% durante 5 h. Após a fixação, a placa foi lavada três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Para observação por MEV, *S. aureus* foram fixados com 2,5 % glutaraldeído em tampão 0,1 M Na- cacodilato (pH 7,2) por 30 min a temperatura ambiente e pós-fixada com solução de 1% OsO₄ contendo 2.5 mM CaCl₂ no mesmo tampão. As células foram desidratadas em séries crescentes de acetona e secas através do método de ponto crítico com CO₂ (CPD 030, Balzers, Switzerland). As amostras foram montadas em “stubs” de alumínio, revestida com uma camada de 20 nm de ouro e examinada em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM6390LV) na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz.

4.3. Detecção genotípica da formação do biofilme e do Sistema regulatório Agr

4.3.1. Extração do DNA bacteriano

Para a extração do DNA bacteriano, foi realizada metodologia padronizada e estabelecida pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ (TITO et al., 2015). Cada isolado foi cultivado em 5 mL de Caldo BHI à temperatura ambiente por 12-16 horas a 100 *x g*. Em seguida 1,5 mL da cultura foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, centrifugados por 5 minutos a 8.000 *x g* e o sobrenadante descartado, esta etapa foi repetida três vezes (volume final de 4,5 mL da cultura foi utilizado). As células foram ressuscitadas em 600 µL de solução de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em Vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 minutos, adição de igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 8.000 *x g* por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e foram adicionados 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 8.000 *x g* por 30 min, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco à temperatura ambiente em uma capela de

exaustão, os sedimentos foram então suspensos em 30 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM).

O DNA extraído foi avaliado quali e quantitativamente através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelado com SYBR *Green* I (Invitrogen®) pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). A determinação da concentração e da pureza do DNA também foi avaliada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA).

4.3.2. Detecção dos genes de formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* e tipificação de Agr

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação dos genes envolvidos na produção do EPS, *icaA*, *icaD* (VASUDEVAN et al., 2003) e da proteína Bap, *bap* (CUCARELLA et al., 2004), e para o gene do sistema regulatório de exoproteínas, *agr* (RNA III) (REINOSO, 2004) em todos os *S. aureus*. Para tipificação de grupos do sistema Agr foram utilizados oligoiniciadores específicos para cada grupo com base no domínio hipervariável do locus *agr*, segundo Shopsin et al. (2003). Um oligoiniciador sensu, *pan-agr* (5-ATGCACATGGTGCACATGC-3), correspondendo a sequências conservadas do gene *agrB*, foi utilizado em todas as reações. Quatro oligoiniciadores anti-sensu, cada um específico para a amplificação de um único grupo de *agr* com base no polimorfismo do locus *agr* foram utilizados como segue: *agr I*, 5-GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3; *agr II*, 5-GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC-3; *agr III*, 5-CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC-3; e *agr IV*, 5-CGATAATGCCGTAATAC CCG-3. Foram realizadas PCR duplex para a identificação dos tipos *agr I* (440 pb) e *agr II* (572 pb) e para *agr III* (406 pb) e *agr IV* (588 pb).

Para detecção destes genes foram realizadas reações de PCR, cujas concentrações foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl₂ - Invitrogen®), 0,3 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), água ultrapura para completar um volume total de reação (20 µL) e 2 µL do DNA total. Para a tipificação do sistema Agr os parâmetros de amplificação utilizados foram uma fase de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 55°C) e extensão (1 min a 72°C) e se repetiu por 25 vezes. Os oligoiniciadores e ciclos para detecção dos demais genes estão expostos no quadro 2.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 60 min.) e revelados com corante SYBR *Green* I (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

Quadro 2. Oligoiniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus aureus*

Gene (fragmento)	Oligoiniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>icaA</i> (1315pb)	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C	1
<i>icaD</i> (381pb)	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	1
<i>bap</i> (971pb)	CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC	2
<i>agr</i> (200pb)	CAT AGC ACT GAG TCC AAG GA CAA TCG GTG ACT TAG TAA AAT G	3

*1. (92°C 45s, 49°C 45s., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min; 2. 94°C 2 min. (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 75s) x 40 e 72°C 5 min.; 3. 94°C 3min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min.

Duas (2) cepas, N-353 e N-361, foram escolhidas aleatoriamente para sequenciamento do gene *agr II*. Os produtos de PCR foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e, em seguida, submetido ao sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems do Laboratório de Biotecnologia da Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. As sequências foram editadas utilizando o programa Bioedit (HALL et al., 1999) e Mega versão 4.0 (KUMAR et al., 2004) e posteriormente foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997).

4.4. Avaliação da resistência fenotípica aos beta-lactâmicos

Todos os 20 isolados de *S.aureus* foram submetidos aos testes de difusão em disco e detecção dos genes de resistência aos betalactâmicos. Foram realizados os testes de difusão em disco através da semeadura dos isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície de placas contendo ágar Müeller-

Hinton (MH-Himedia), seguido da deposição dos discos de cefoxitina (30 µg), oxacilina (10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg) e penicilina (10 UI). Após incubação a 35°C ± 2°C por 18 h, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados. Foram consideradas sensíveis à cefoxitina, oxacilina, amoxicilina + ácido clavulânico e penicilina, cepas com halos de inibição, respectivamente de ≥ 22 mm, ≥ 18 mm, ≥ 20 mm e ≥ 29 mm. Através da utilização do disco penicilina (10 UI) foi avaliada a “zona edge” para avaliação da produção de beta-lactamase. Se esta borda, ou margem, era difusa, o isolado foi considerado não produtor de beta-lactamase. Mas, se a borda era delimitada, o isolado foi considerado produtor de beta-lactamase (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

Foi realizada a técnica de PCR para detecção do gene *mecA* utilizando oligoiniciadores desenhados por Murakami et al., (1991) e por Melo et al., (2014), e para detecção do gene *blaZ* (quadro 3), que codifica a produção de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp. (ROSATO et al., 2003) utilizando as mesmas concentrações de oligoiniciadores e reagentes já citados anteriormente no item 4.3.2.

Os testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), segundo CLSI (2014), foram realizados apenas para os isolados N-354, N-365 e N-341. Para isso, a solução estoque de cefoxitina (1,0mg/ml) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/ml; 0,5µg/ml; 1,0µg/ml; 2,0µg/ml; 4,0µg/ml, 8,0µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml, 256µg/ml e 512µg/ml em caldo MH. Uma alíquota de 5µl de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland foi adicionada a 95µl de caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico e incubadas a 35°C por 20 h. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos poços. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano e o valor da concentração do caldo posterior ao último que apresentou turvação, foi considerada a concentração inibitória mínima da cefoxitina (CIM) (MENDONÇA et al., 2012). Para confirmar a CIM foram acrescidos aos poços 5 µl de resazurina (Eastman Company) 0,01% e a viragem de cor para rosa indicou viabilidade celular (MANN & MARKHAM, 1998). Para determinação da CBM, culturas com concentrações de cefoxitina superiores à CIM foram inoculadas em AMH. Após 24 horas de incubação a 35°C foi verificada a concentração de antibiótico capaz de eliminar todas as células viáveis (MENDONÇA et al., 2012).

Quadro 3. Oligoiniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência de *Staphylococcus aureus*

Gene (fragmento) Referência	Oligoiniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>mecA</i> (533 pb) – Murakami et al. (1991)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1
<i>mecAsciuriInt</i> (574 pb) – Melo et al. (2014)	ACG TTA CAA GAT ATG AAG ACA TTA ATA GCC ATC ATC	2
<i>blaZ</i> (861 pb) – Rosato et al. 2003	TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG CAT TAC ACT CTT GGC GGT TT	3

*1. 94 °C 4 min (94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 4 min; 2. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min; 3. 94°C 5min. (94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min.

4.5. Determinação da concentração inibitória mínima de cefoxitina no biofilme (CIMB)

Para este teste foram selecionadas as cepas N-354, N-365 e N-341. Devido a ausência de teste padrão para determinação da CIMB e a fim de estabelecer um procedimento adequado as nossas condições experimentais, foi estabelecido um protocolo modificado a partir de Flemming et al., 2009, Pierce et al., 2008 e Mann & Markham, 1998. Os isolados foram repicados em AS por 24 h a 35°C e as colônias crescidas foram inoculadas em ágar BHI, e também incubada a 35°C por 24 h. As culturas bacterianas foram ajustadas a escala 0,5 de McFarland e diluídas 1:10 em caldo TSA com adição de 0,24% de glicose. Alíquotas de 200µL desta suspensão foram inoculadas do poço 1 ao 11 da microplaca de poliestireno estéril com 96 poços e incubadas por 24 h à 35°C sem agitação. Após incubação, este material foi desprezado e os poços foram lavados 2 vezes com 200µL de solução salina estéril. Após isso, a solução estoque de cefoxitina (1,0mg/ml) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,5µg/ml; 1,0µg/ml; 2,0µg/ml; 4,0µg/ml, 8,0µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml a 256µg/ml em caldo MH. Um volume de 100µL do caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico foram distribuídas nos poços de 1 ao 10 desta microplaca de poliestireno. No poço 11 foi acrescentado somente caldo MH e este foi utilizado como controle positivo de formação do biofilme. Após incubação a 35°C por 20 h, os poços foram lavados 2 vezes com 200µL de solução salina estéril. Foi adicionado 100µL de resazurina 0,01% (Eastman Company) aos poços de 1 ao 12 desta microplaca de poliestireno. A microplaca foi enrolada em papel alumínio e incubada à 35°C por 1-2 h. Após incubação, foi aspirado 75-80µL do sobrenadante desta microplaca, colocado em microplaca de poliestireno estéril e realizada a leitura de absorbância à 490 nm em leitor de ELISA (BIO RAD MODEL 680). A partir das leituras colorimétricas resultantes e depois de subtrair os

valores correspondentes aos controles negativos (poços na coluna 12 contendo apenas resazurina), as CIMBs de cada isolado foram determinadas. A CIMB foi considerada a menor concentração de cefoxitina que resultou em redução de 50% ou menos da absorvância de resazurina quando comparada ao controle positivo formado pelo biofilme formado na ausência de cefoxitina. Foram utilizadas as cepas ATCC 35984, produtora de biofilme e resistente à meticilina, e ATCC 12228, não produtora de biofilme e sensível à meticilina.

4.6. Estudo da expressão gênica da formação do biofilme em isolados de *Staphylococcus aureus*

Para este estudo, foram selecionados os isolados N-354 (*icaA*⁺/*icaD*⁺/*bap*⁻/*agr*⁺), N-365 (*icaA*⁺/*icaD*⁺/*bap*⁻/*agr*⁺) e N-341 (*icaA*⁺/*icaD*⁺/*bap*⁺/*agr*⁺), com formação de biofilme fraca, moderada e forte, respectivamente. Nas etapas que se seguem foram adotados vários procedimentos para garantir um ambiente livre de RNases (anexo I).

4.6.1. Extração do RNA total

As cepas passaram por dois repiques sucessivos em AS, a fim de reativar suas propriedades de formação do biofilme, e após isso foram repicados em ABHI por 24 h a 35 ° C. Colônias crescidas em ABHI foram ajustadas para a escala 0,5 de McFarland e diluídas 1:10 em CTSA mais 0,24% de glicose. Os tubos com crescimento bacteriano foram ajustados para um volume final de 10 mL e incubados estaticamente a 35°C durante 4, 8, 12 e 24 h. Após a incubação, os tubos foram lavados duas vezes com água dietilpirocarbonato (DEPC 0,1 %), a fim de remover todas as células planctônicas. As células aderentes foram ressuspensas com água DEPC 0,1 % gelada por raspagem até que a camada de células visível se desprendesse do fundo do tubo. As suspensões foram incubadas com 2 vezes o seu volume de RNA *Protect Bacteria* (Qiagen®), vortexados por 5 segundos, incubados durante 5 min a temperatura ambiente. A mistura foi sedimentada por centrifugação a 10.000 *x g* durante 10 min e os sedimentos foram armazenados a -80 ° C até a extração do RNA.

Para extração de RNA foi utilizado o kit *Rneasy Protect Bacteria Mini Kit* (Qiagen®) segundo instruções do fabricante (anexo II). Após isolamento do RNA foi realizado tratamento com DNase para eliminação de traços de DNA presentes na amostra e para este procedimento foi utilizado o kit *RQ1 Rnase-Free Dnase* (Promega®) (anexo III). Para confirmar a ausência de DNA nas amostras de RNA total extraído uma reação de PCR do

gene 16S rRNA (ATSHAN et al., 2013) foi realizada utilizando as condições semelhantes da qPCR.

Para a determinação da concentração e da pureza do RNA foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), a partir da absorvância a 260 nm, e razões 280/260 nm e 260/230 nm, respectivamente. A quantificação do RNA foi realizada também através de fluorímetro QUBIT® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão MOPS 1X corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®).

4.6.2. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *AMV Reverse Transcriptase* A3500 (Promega®) a partir de 1 µg de RNA total, acrescido de 1 mM de dNTP, 5 mM de MgCl₂, 0,5 µg de *Random* Oligoiniciadores, 20U de *Recombinant Rnasin*, 15U de *AMV Reverse transcriptase* e *RT Buffer* 1x. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min, 42°C por 15 min, 95°C por 5 min e a 5°C por 5 min para síntese do cDNA. A concentração e a pureza do cDNA foram checadas por espectrofotometria como descrito anteriormente. Após isso, o cDNA foi diluído com água RNase-free e armazenado à -20°C até o seu uso.

4.6.3. Oligoiniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real (qPCR)

Os oligoiniciadores utilizados para análise da expressão do gene *hld* foram desenhados utilizando o software Primer Express 3.0 baseado em uma sequência do gene de *S. aureus* disponível no *GenBank* (DQ157979.1). Foram utilizados também oligoiniciadores já descritos na literatura para este modelo de estudo. As características de todos os oligoiniciadores foram testadas usando o software Oligo Analyse 1.0.2 e a especificidade foram testadas inicialmente pela ferramenta Primer BLAST http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome. Os oligoiniciadores estão apresentados no quadro 4.

Quadro 4. Oligoiniciadores empregados nos ensaios de amplificação da qPCR

Gene (fragmento)	Oligoiniciadores (5' - 3')	Referência
<i>icaA</i> (151 pb)	GAGGTAAAGCCAACGCACTC CCTGTAACCGCACCAAGTTT	Atshan et al., 2013
<i>icaD</i> (211 pb)	ACCCAACGCTAAAATCATCG GCGAAAATGCCCATAGTTTC	Atshan et al., 2013
<i>16S rRNA</i> (191 pb)	GGGACCCGCACAAGCGGTGG GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA	Atshan et al., 2013
<i>gyrB</i> (242 pb)	GTCGAAGGGGACTCTG GCTCCATCCACATCGG	Sihto et al., 2014
<i>hld</i> (74 pb)	TTCACTGTGTCGATAATCCATTTTACT GGAGTGATTTCATGGCACAAG	Marques (presente estudo)

4.6.4. Padronização das reações de qPCR

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* e *5X HOT FIREPol® Eva Green® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne)*. O volume final da reação foi de 20 µL, contendo: 1X de SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) adicionado do par de oligoiniciadores e da amostra de cDNA nas concentrações padronizadas. Os ensaios foram realizados em triplicata no aparelho *Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

As condições de termociclagem foram: 95°C por 5 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Ao final dos 40 ciclos foi adicionada uma curva de dissociação dos produtos amplificados com a finalidade de verificar a especificidade de amplificação.

A fim de otimizar as concentrações dos oligoiniciadores, estes foram testados nas concentrações de 200 nM, 400 nM, 600 nM e 900 nM (tabela 1). Foram consideradas concentrações ótimas de oligoiniciadores as concentrações mínimas que obtiverem o menor Cq (*quantification cycle*) e o máximo ΔRn (*Normalized Reporter*) na ausência de dímeros.

Tabela 1. Teste de otimização das concentrações dos oligoiniciadores utilizados na qPCR

Anti-sensu	200 nM	400 nM	600 nM	900 nM
Sensu				
200 nM	200/200	200/400	200/600	200/900
400 nM	400/200	400/400	400/600	400/900
600 nM	600/200	600/400	600/600	600/900
900 nM	900/200	900/400	900/600	900/900

Para determinar as eficiências da amplificação dos genes alvos e do gene de referência foram construídas curvas padrões para cada *amplicon* a partir de uma amostra conhecida. O ensaio foi realizado em triplicata e foi utilizado uma amostra de DNA e outra de cDNA. A amostra de DNA foi extraída, utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega®) segundo as instruções do fabricante (anexo IV), a partir de um cultivo bacteriano com um número conhecido de células foi utilizada para construir uma curva-padrão com 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 cópia dos genes em estudo, a fim de analisar as eficiências das reações de cada oligoiniciador. Após isso, uma curva-padrão com diluições seriadas de cDNA (15; 1,5; 0,15; 0,015 e 0,0015 ng/uL) foi construída para cada oligoiniciador.

4.6.5. Análise da expressão gênica

No total foram analisados cinco genes, sendo três alvos (*icaA*, *icaD* e *hld*) e dois que foram utilizados como controles interno (*gyrB* e *16S rRNA*). As reações de qPCR foram realizadas utilizando o kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e *5X HOT FIREPol® Eva Green® qPCR Mix Plus (ROX)* (Solis Biodyne). As condições de mix e termociclagem foram as mesmas descritas no item anterior, sendo para estas utilizado 4,5 ng de cDNA/reação.

Para a análise da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A quantificação relativa foi dada pela razão entre o valor médio do gene alvo e o valor médio do gene referência (*16S rRNA*) em cada amostra. A quantidade relativa de produto gerado pela qPCR para cada conjunto de oligoiniciadores foi determinada com base no valor de Cq. O aumento ou a diminuição na expressão gênica foi determinado por $2^{-\Delta\Delta Cq}$, onde: $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{(alvo)} - \Delta Cq_{(controle)}$. Os resultados foram expressos como o

número de vezes em que a expressão gênica das células bacterianas formadoras de biofilme (tempo de crescimento de 8, 12 e 24 horas) aumentou ou diminuiu em relação à expressão gênica observada nas células não formadoras de biofilme (tempo de crescimento de 4 horas – amostra calibradora).

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas de média, desvio padrão, variância e significância considerando $p \leq 0,05$ foram efetuadas utilizando software *BioEstat 5.3*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Formação de biofilme e amplificação dos genes *icaA*, *icaD* e *bap*

Todas as cepas de *S. aureus* (n=20) identificadas pelas técnicas fenotípicas e moleculares foram produtoras de biofilme quando submetidos à técnica de detecção em microplaca, sendo 55% (11/20) fortes produtores, 30% (6/20) produtores moderados e 15% (3/20) fraco produtores (figura 5).

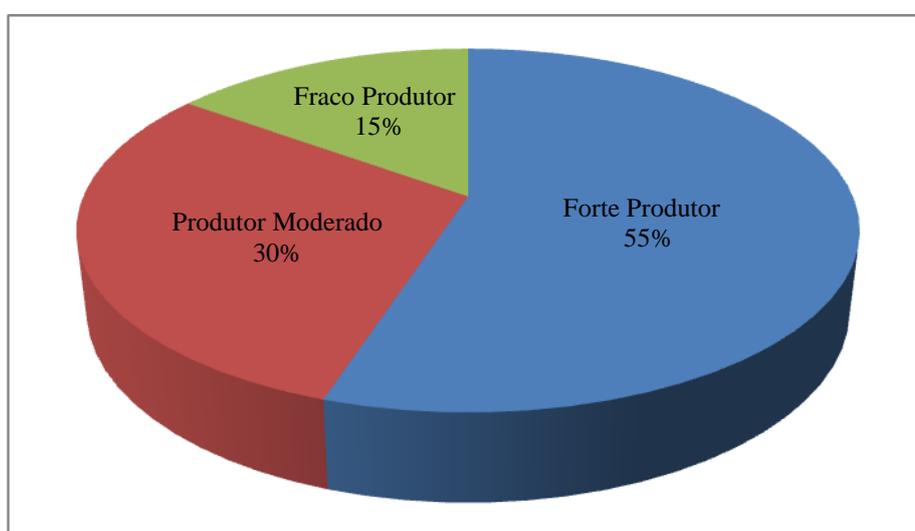


Figura 5. Gráfico apresentando o percentual de cepas de *Staphylococcus aureus* com formação de biofilme forte, moderada e fraca.

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 eficazes 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). Turkyilmar & Eskiýmirliler (2006) estudaram a formação de biofilme em 180 isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de amostras animais de diferentes quadros clínicos. Estes autores encontraram produção deste fator de virulência em 55,5% no teste em microplaca. Mork et al. (2005) ressaltam a importância da produção de biofilme como fator de patogenicidade, o qual garante a instalação e manutenção bacteriana no tecido glandular mamário. A camada de EPS dificulta

a fagocitose por células do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, a sua produção também está associada às infecções por ordenhadeiras mecânicas, pois este mucopolissacarídeo facilita a adesão bacteriana à biomateriais, o qual não é removível mesmo após lavagens sucessivas (DEGO et al., 2002).

Após a detecção dos genes envolvidos na produção do biofilme, 85% (17/20) foram positivos para o gene *icaA*, 95% (19/20) foram positivos para o gene *icaD*, 80% (16/20) foram positivos para ambos os genes e apenas 5% (1/20) foi positivo para o gene *bap* (tabela 2, figura 6). Todas as cepas produtoras de biofilme apresentaram pelo menos um dos três genes estudados. Contudo, não houve relação entre a intensidade de produção de biofilme e o número de genes amplificados, fato evidenciado pela ocorrência de dois isolados fraco-produtores que foram positivos para os genes *icaA* e *icaD*. Corroborando com estes dados, Singh e colaboradores, em 2013, avaliando 140 isolados de estafilococos isolados de cães detectou que 98% foram capazes de produzir biofilme. Neste mesmo estudo, o gene *icaA* e *icaD* foi detectado em 77,9% e 75,7%, respectivamente, dos isolados e não houve relação entre a presença de *icaA* ou *icaD* e a formação forte ou moderada de biofilme (SINGH et al., 2013).

Tabela 2. Produção de biofilme e presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina

<i>S. aureus</i>	Produção de Biofilme	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>
N-346, N-348, N-351, N-352, N-353, N-359, N-361, N-367	Forte	+	+	-
N-341	Forte	+	+	+
N-340	Forte	-	+	-
N-370	Forte	+	-	-
N-345, N-360, N-363, N-364, N-365	Moderado	+	+	-
N-386	Moderado	-	+	-
N-354	Fraco	+	+	-
N-385	Fraco	+	+	-
N-366	Fraco	-	+	-

*+: positivo, -: negativo.

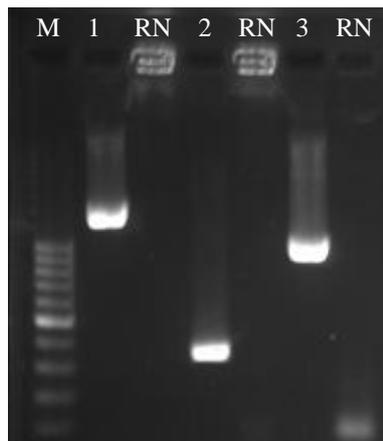


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos genes *icaA* (1315 pb), *icaD* (381 pb) e *bap* (971 pb). M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Thermo Scientific), RN: reação negativa, 1: produto de amplificação do gene *icaA*, 2: produto de amplificação do gene *icaD*, 3: produto de amplificação do gene *bap*.

Arciola et al. (2001) relataram que não foi observada qualquer relação entre a intensidade de produção de EPS e a presença destes genes. Eles consideraram que este fato poderia ser explicado pela não expressão dos genes destes isolados nas condições as quais foram submetidos, sendo possivelmente necessária uma maior concentração de açúcar no ágar ou maior tempo de incubação. Outro fator a ser considerado é que a intensidade da produção do biofilme pode também depender de características fenotípicas próprias dos estafilococos (ARCIOLA et al., 2001).

A baixa incidência do gene *bap* prediz que o mecanismo *ica*-dependente, produtor de PIA, pode ser o principal responsável pela adesão e formação do biofilme nas cepas estudadas o que corrobora com Vautor et al. (2008) e Melchior et al. (2009) que em estudos com 262 e 99 isolados de *S. aureus*, respectivamente, não possuíam a proteína Bap. Contudo, é interessante perceber que o único isolado que possui o gene *bap* nesse estudo (N-341) é forte produtor de biofilme. Em trabalho desenvolvido por Tormo e colaboradores (2005) foi observado que todos os isolados testados de estafilococos que albergam o gene *bap* são fortes produtores de biofilme, apesar do fato da maioria não possuir o *operon icaADBC*. Estes autores concluíram a proteína Bap é capaz de mediar um mecanismo de desenvolvimento de biofilme alternativo ao mecanismo de PIA/PNAG. Bap promove tanto a adesão inicial a superfícies abióticas quanto a agregação intercelular, assegurando sua participação no processo de formação do biofilme em *S. aureus*.

5.2. Gene *agr* (*RNAIII*) e tipificação do sistema Agr

Todos os isolados de *S. aureus* foram positivos para o gene *agr RNAIII* (figura 7). O RNAIII é um efetor intracelular do sistema *quorum-sensing* em *Staphylococcus aureus*. É um dos maiores RNAs reguladores (514 nucleotídeos de comprimento) que são conhecidos por controlar a expressão de um grande número de genes de virulência. Assim, RNAIII não é essencial para o crescimento de *S. aureus in vitro*, mas modula a expressão de genes envolvidos na sua patogênese (BOISSET et al., 2007). No entanto, a função do sistema *agr* na formação de biofilmes ainda permanece desconhecida. Autores sugerem que a vasta gama de genes regulados pelo *agr* poderiam influenciar a fixação de *S. aureus* e desenvolvimento do biofilme sob certas condições específicas (YARWOOD et al., 2004, TOLEDO-ARANA et al., 2005). Boles & Horswill (2008) demonstraram que a repressão do sistema *agr* é necessária para a formação do biofilme e que a reativação de *agr* em biofilmes estabelecidos através da adição de AIP ou depleção de glicose provoca a sua dispersão.

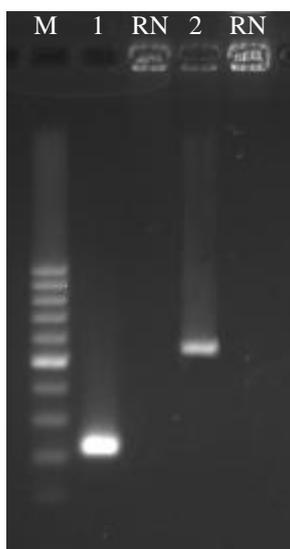


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos genes *agr* (*RNA III*) (200 pb) e *agr II* (572 pb). M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Thermo Scientific), RN: reação negativa, 1: produto de amplificação do gene *agr* (*RNA III*), 2: produto de amplificação do gene *agr II*.

Conforme já foi dito, o sistema Agr pode ser dividido em quatro grupos principais com base no polimorfismo na sequência de aminoácidos do peptídeo autoindutor e do seu receptor correspondente (AgrC). Em nosso estudo, após a tipificação do gene *agr*, foi possível

determinar uma prevalência de 70% (14/20) do grupo Agr tipo II (figura 7), enquanto os outros 30% (6/20) não foram tipificáveis pela técnica de detecção utilizada. Foi realizado o sequenciamento de duas cepas e utilizando a ferramenta BLASTn foi observada uma identidade de 96% e 97% para as cepas N-353 e N-361, respectivamente, com a sequência do Agr tipo-II de *Staphylococcus aureus* AK15Y (*GenBank* JX398934.1) e *e-value* igual 0,0 para ambas. Os resultados do sequenciamento obtidos revelaram que o fragmento amplificado foi o esperado e que as cepas estudo são Agr tipo-II.

Em dois trabalhos realizados no Brasil, por Almeida et al. (2013) e Fabres-Klein et al. (2015), foi possível encontrar prevalência de 50% de cepas Agr tipo II e 50% Agr tipo I em rebanhos de ovinos com mastite clínica e subclínica no estado de Pernambuco e 63% de cepas Agr tipo II e 22% de cepas Agr tipo I em rebanhos bovinos com mastite subclínica no Estado de Minas Gerais, respectivamente. Melchior et al. (2009) também encontraram prevalência do tipo II em 81% dos isolados de *S. aureus* isolados de mastite bovina na Holanda, enquanto 9% pertenciam ao grupo Agr tipo I. Os autores mostraram ainda que cepas Agr tipo II produzem mais biofilme quando presentes no leite do que as cepas Agr I e sugeriram uma melhor adaptação das cepas Agr tipo II à este ambiente. Os estudos de Fabres-Klein et al. (2015) também sugerem que cepas de *S. aureus* isoladas de leite bovino, para se adaptar ao meio repleto de leite encontrado no úbere, aumentam a produção do biofilme e promovem a sobrevivência das bactérias.

Desde a sua identificação, o sistema Agr vem sendo caracterizado como parte central do desenvolvimento da patogênese estafilocócica. A literatura descreve que quando o sistema Agr esta desativado, *S. aureus* adere a superfícies e forma biofilme, e quando o sistema Agr está ativado, nas fases pós-exponencial e estacionária de crescimento, as células podem se destacar do biofilme e retornar ao estado planctônico (THOENDEL et al., 2012). Por isso, a próxima etapa do presente estudo foi selecionar 1 isolado formador de biofilme para a determinação da sua curva de crescimento e posterior avaliação fenotípica pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) nas diferentes fases estipuladas.

5.3. Caracterização da curva de crescimento e MEV de *S. aureus*

Para a cepa N-341 formadora de biofilme foi determinado que a fase Lag estabeleceu-se até as 4 h, seguida da fase de crescimento exponencial que atingiu seu platô em 12 h, a fase estacionária foi de 12 a 24 h, seguida da fase de morte. A observação morfológica através de MEV demonstrou que este isolado exibiu uma estrutura denominada “meshwork-like”

associada a superfície e com várias lacunas às 8 horas de crescimento, estruturas estas que não foram aparentes às 4h. Com 12 horas de crescimento estas lacunas diminuíram de tamanho e a camada de células tornou-se mais densa, indicando o possível estabelecimento do biofilme. Também foi observado que no tempo de 24 horas a superfície estava repleta de aglomerados densos de células (figura 8), provavelmente indicando a próxima fase da formação do biofilme que seria o despreendimento das mesmas. Com este modelo pôde-se detectar mudanças graduais na complexidade do biofilme durante as diferentes fases do crescimento de *S. aureus*, e demonstrar que o nosso modelo para a formação do biofilme é satisfatório.

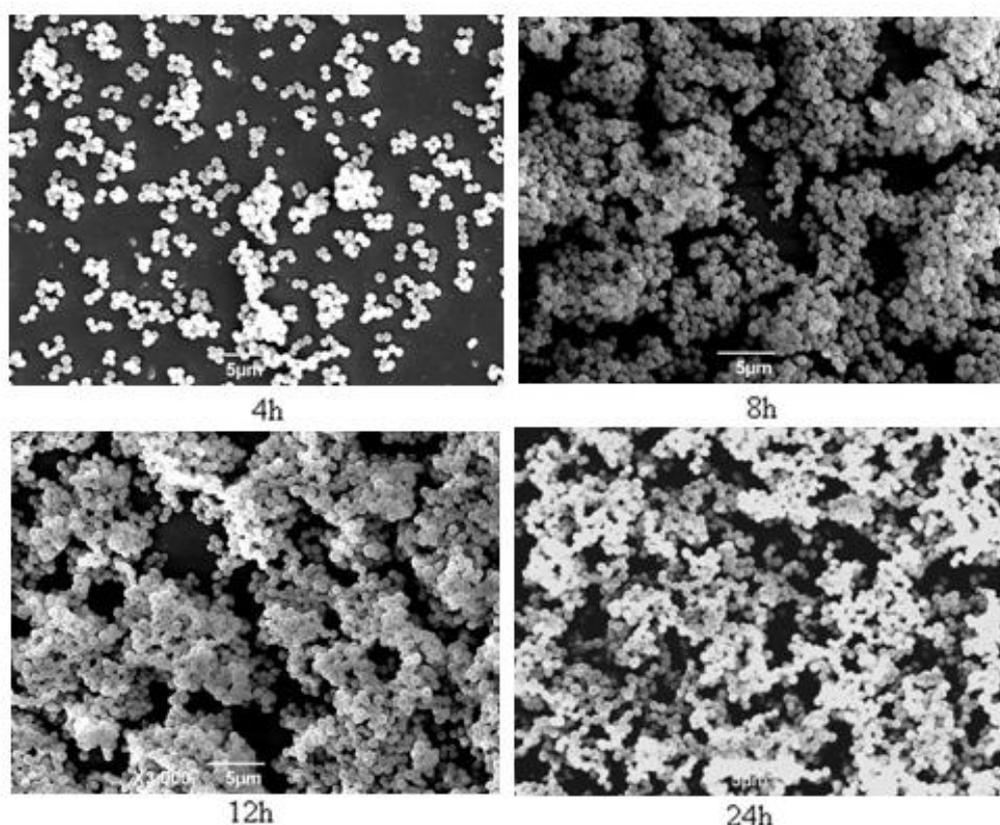


Figura 8. Micrografia eletrônica de varredura da cepa N-341 mostrando as mudanças morfológicas ao longo do crescimento. Estrutura denominada “meshwork-like” associada à superfície com várias lacunas foi observada às 8 horas de crescimento, estas estruturas não foram aparentes às 4h. Com 12 horas de crescimento as lacunas diminuíram de tamanho e a camada de células tornou-se mais densa e no tempo de 24 horas a superfície estava repleta de aglomerados densos de células.

5.4. Resistência aos beta-lactâmicos

Com intuito de avaliar a resistência aos betalactâmicos, os 20 *S. aureus* foram submetidos à prova de difusão em disco aos antibióticos, penicilina, oxacilina, cefoxitina e amoxicilina+ácido clavulânico. Um total de 75% (15/20) apresentou halo de sensibilidade superior à 29 mm à penicilina. No entanto o CLSI (2013), que estabelece padrões para bactérias isoladas de animais, indica que isolados de estafilococos produtores de beta-lactamase podem mostrar-se fenotipicamente sensíveis à penicilina. Por este motivo, é recomendado que estes isolados sejam testados para a produção de beta-lactamases, antes de reportá-los como tal. O teste fenotípico recomendado para a detecção da produção de beta-lactamases em *S. aureus* é a interpretação do crescimento na borda do halo de inibição. Se esta borda, ou margem, é difusa, o isolado não produz beta-lactamases. Mas, se é bem delimitada, o isolado pode ser considerado produtor de beta-lactamases e deve ser reportado como resistente. Este teste é considerado mais sensível, em *S. aureus*, que o teste do nitrocefim (CLSI VET-A4, 2013). Dos isolados sensíveis, 100% (15/15) foram positivos ao teste de zona *edge* devendo ser reportados como resistentes à penicilina. Elevada resistência à penicilina em ECPs isolados de casos de mastite bovina também foi relatada por outros autores (KREWER et al., 2013; NADER FILHO et al., 2007; FREITAS et al., 2005) e este antibiótico é raramente considerado uma opção no tratamento da mastite, apesar de ainda existirem produtores que insistem em utilizá-la.

Todos os isolados foram sensíveis à oxacilina e cefoxitina, corroborando com outros autores que afirmam ser baixa a prevalência de resistência à oxacilina em *S. aureus* isolados de mastite bovina (KREWER et al., 2013; BARDIAU et al., 2013). A suscetibilidade à amoxicilina associada ao inibidor de beta-lactamase também foi de 100%, o que sugere que a produção de beta-lactamases é o mecanismo implicado na resistência à penicilina, pois dentre os isolados considerados resistentes à penicilina, 70% (14/20) apresentaram o gene *blaZ* e 100% (20/20) foram negativos para o gene *mecA*, testado através da utilização de dois oligoiniciadores diferentes (tabela 3, figura 9).

Tabela 3. Tipificação do sistema Agr e presença dos genes *blaZ* e *mecA* em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina

<i>S. aureus</i>	Tipos de Agr	<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>
N-348, N-352, N-353, N-359, N-360, N-361, N-363, N-364, N-365, N-366, N-367, N-370	II	+	-
N-386	II	-	-
N-351, N-354	NT	+	-
N-340, N-341, N-345, N-346, N-385	NT	-	-

*NT: Não tipificáveis, +: positivo, -: negativo.

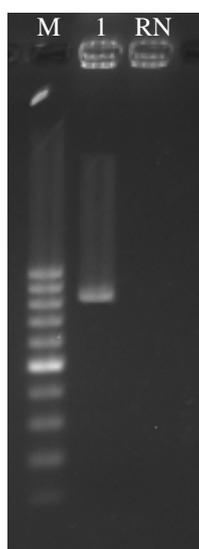


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do gene *blaZ* (861 pb). M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Thermo Scientific), RN: reação negativa, 1: produto de amplificação do gene *blaZ*.

A presença dos genes *agr* e *blaZ* em *S.aureus* vem sendo estudada e reportada por diversos autores (GÓMEZ et al., 2014; MELCHIOR et al., 2009). Em estudo desenvolvido por Melchior et al. (2009) na Holanda, os mesmos concluíram que não foi detectado *agr* tipo II concomitantemente com *blaZ*. Já no presente estudo a presença de ambos os genes foram detectados em 85,7% dos isolados apontando para a necessidade de mais estudos relacionados a essa realidade, pois o gene *blaZ* pode ser de origem plasmidial, o que pode facilitar transmissão entre os isolados.

A CIM e CBM para cefoxitina foram analisados para os isolados N-354, N-365 e N-341. O isolado forte produtor de biofilme, N-341, apresentou a maior CIM e CBM (1 µg/mL e

64µg/ml, respectivamente), seguido pelo produtor moderado N-365 (<0,25 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente). O isolado fraco produtor de biofilme, N-354, apresentou o menor CIM e CBM (<0,25 µg/mL para ambos). O isolado N-341 apresentou alto CBM (64 µg/mL), este foi idêntico ao CBM da cepa padrão ATCC 35984 que é produtora de biofilme e resistente a meticilina. Como, o isolado N-341 é negativo para os genes *blaZ* e *mecA*, a elevada concentração bactericida mínima da cefoxitina pode estar associada à proteção que o biofilme oferece às células bacterianas. Wells et al. (2011) discutiram que não existe uma metodologia universalmente aceita para estudar a sensibilidade aos antibióticos nas bactérias em biofilmes. Desta forma, vale ressaltar que o EPS secretado pelas bactérias pode atuar como uma barreira que pode desempenhar um papel nesta resistência, evitando a absorção e a penetração de agentes antimicrobianos. Além disso, a matriz de EPS poderia neutralizar ou se ligar a estes compostos, promovendo a sua diluição para concentrações sub-inibitórias antes que eles atinjam as células (RAZA et al. 2013). Outro fator é que os biofilmes são compostos de subpopulações de células latentes e ativas, e esta diferença na fisiologia bacteriana também pode influenciar a eficácia dos antibióticos (HOIBY et al., 2010).

5.5. Determinação da concentração inibitória mínima no biofilme (CIMB)

As cepas N-354, N-365 e N-341 foram submetidas a determinação da CIMB. Os resultados mostram uma elevada CIMB em relação ao CIM avaliado nas células planctônicas e estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Resultados de CIM e CIMB de cefoxitina em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina

<i>S. aureus</i>	CIM	CIMB
N-354	< 0,25 µg/mL	1 µg/mL
N-365	< 0,25 µg/mL	8 µg/mL
N-341	1 µg/mL	> 256 µg/mL
ATCC 35984	16 µg/mL	> 256 µg/mL
ATCC 12228	< 0,25 µg/mL	< 0,5 µg/mL

*CIM: Concentração Inibitória Mínima;
 CIMB: Concentração Inibitória Mínima no Biofilme;
 ATCC 35984: produtora de biofilme e resistente à meticilina;
 ATCC 12228: não produtora de biofilme e sensível à meticilina.

O tratamento antimicrobiano da mastite bovina é feito com base em testes de suscetibilidade aos antimicrobianos de acordo com as normas do CLSI. No entanto, vários estudos têm mostrado que há uma discrepância entre os resultados deste teste de sensibilidade padrão e a taxa de cura real do antimicrobiano aplicado no tratamento. Uma evidência crescente sugere que a formação de biofilme por *S. aureus* está associada com este problema. No momento, os ensaios de suscetibilidade aos antimicrobianos para bactérias que crescem em biofilmes disponíveis não são consideradas confiáveis o suficiente para a sua aplicação na rotina (MELCHIOR et al., 2007).

Os mecanismos de resistência nos biofilmes bacterianos são complexos. O principal mecanismo de resistência envolve a matriz do biofilme, ela pode diminuir a difusão do antibiótico para as camadas mais internas do biofilme, fazendo com que essas bactérias tenham menor exposição aos compostos antimicrobianos. Além disso, o esgotamento de nutrientes ou oxigênio dentro do biofilme faz com que as células tenham baixa atividade metabólica e uma taxa de crescimento reduzida, tornando assim as bactérias do biofilme resistentes aos antibióticos, já que muitos antibióticos (tais como os beta-lactâmicos) são ativos contra células em divisão. Desta maneira, os antibióticos não conseguem penetrar adequadamente no biofilme e tem uma atividade limitada à superfície (LIU et al., 2014). Uma terceira hipótese é de que as bactérias em biofilme são mais suscetíveis a sofrerem adaptações genéticas de acordo com as condições ambientais a que estão submetidas. Isso porque já foi observado que a frequência de mutação de um micro-organismo em biofilme é significativamente maior do que na sua forma planctônica (TARASZKIEWICZ et al., 2013).

Estudos indicam que as bactérias que crescem nos biofilmes podem se tornar 10 - 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos em comparação com as planctônicas (HOIBY et al., 2011). Essa resistência nos norteia sobre a importância do uso de bactérias em biofilmes nos testes de suscetibilidade em laboratórios clínicos, a determinação da CIMB é útil para se obter um melhor resultado de quimioterapia antimicrobiana, em comparação com o teste de sensibilidade tradicional baseado em bactérias planctônicas (WU et al., 2015).

Testes de sensibilidade aos antibióticos realizado em *S. aureus* isolados de mastite bovina na Austrália e forte produtores de biofilme, revelou múltiplas resistências aos antibióticos desenvolvidas quando as bactérias foram cultivadas como biofilmes. Três isolados que quando submetidos aos testes de sensibilidade em células planctônicas foram sensíveis à vancomicina, quando submetidos aos testes de detecção de sensibilidade em células no biofilme foram resistentes. De modo a determinar se a resistência desenvolvida era transitória ou persistente, *S. aureus* foram avaliados após subculturas nos dias 7, 14, 21 e 30.

A resistência aos antibióticos persistiu até 3-4 semanas, revertendo a suscetibilidade, na 4ª semana de pós-propagação das subculturas como células planctônicas (BABRA et al., 2013).

Melchior e colaboradores (2007) desenvolveram um ensaio para determinar a CIMB em um teste de suscetibilidade do biofilme prolongado, que compreende 2 a 4 dias consecutivos de desafio antimicrobiano. Os resultados mostraram diferenças evidentes entre estirpes e vários agentes antimicrobianos no que diz respeito ao prolongado efeito de duração do desafio antimicrobiana na erradicação de *S. aureus* em crescimento de biofilme. O teste de suscetibilidade do biofilme por tempo estendido também indica que cada estirpe bacteriana exige um tempo de duração do tratamento com antimicrobiano específico e que não pode ser derivada a partir de um teste padrão de suscetibilidade (MELCHIOR et al., 2007).

A seleção de antibióticos para o tratamento da mastite, baseados na suscetibilidade de *S. aureus* tanto em células planctônicas quanto na sua formação em biofilme, pode render melhores resultados na terapêutica antimicrobiana especialmente nos casos mais difíceis de mastite bovina, como já foi sugerido para infecções por MRSA em humanos (BABRA et al., 2013; KHAN et al. 2011).

Tendo em vista que, a otimização de dosagem dos antibióticos é extremamente importante para melhorar os resultados e para evitar um maior desenvolvimento da resistência antimicrobiana e que as bactérias em biofilme exibem um elevado CIMB, Wu e colaboradores (2015), sugeriram uma elevação de 5-6 doses do antibiótico em relação ao pré-estabelecido, desde que abaixo da faixa de segurança das funções renal e hepática. Além disso, destaca-se que é importante observar o tempo de duração adequada do tratamento com antibióticos (WU et al., 2015).

Dada a dificuldade em se tratar de infecções bacterianas em biofilmes na clínica, estudos mais recentes sugerem que o tratamento somente com antibióticos é inadequado. (WU et al., 2015; TARASZKIEWICZ et al., 2013). Por isso, fatores que inibem o crescimento do biofilme ou perturbam sua manutenção - tais como: enzimas, sais de sódio, ácidos, entre outros - estão sendo procurados e poderiam ser utilizados como estratégia para aumentar a eficiência dos tratamentos já existentes (TARASZKIEWICZ et al., 2013). Estes dados ressaltam a importância em se desenvolver estudos mais detalhados à cerca da natureza dos biofilmes, o que trará benefícios ao combate a esse tipo de infecção.

5.6. Análise da expressão dos genes *icaA*, *icaD* e *hld* durante a formação do biofilme em isolados de *Staphylococcus aureus*

A extração de RNA foi realizada das células cultivadas em biofilme nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas de crescimento de três isolados bacterianos representativos: os isolados N-354 (*icaA*⁺/*icaD*⁺/*bap*⁻/*agr*⁺), N-365 (*icaA*⁺/*icaD*⁺/*bap*⁻/*agr*⁺) e N-341 (*icaA*⁺/*icaD*⁺/*bap*⁺/*agr*⁺), com formação de biofilme fraca, moderada e forte, respectivamente. O RNA extraído apresentou boa qualidade observada através de técnica de eletroforese (figura 10). O rendimento das reações de transcriptase-reversa utilizando 1 µg de RNA variou entre 20 e 50 ng/µL. Estas concentrações são aceitáveis para este tipo de reação e foram adequadas para o nosso estudo.

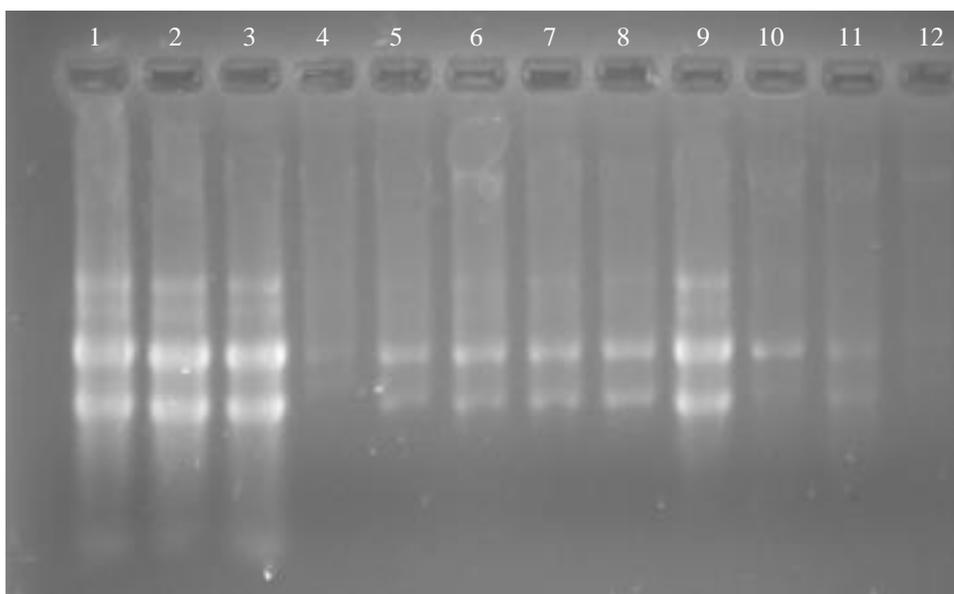


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA total. 1: amostra N-354 4h; 2: amostra N-365 4h; 3: amostra N-341 4h; 4: amostra N-354 8h; 5: amostra N-365 8h; 6: amostra N-341 8h; 7: amostra N-354 12h; 8: amostra N-365 12h; 9: amostra N-341 12h; 10: amostra N-354 24h; 11: amostra N-365 24h; 12: amostra N-341 24h.

Os oligoiniciadores da qPCR foram utilizados na amplificação utilizando a PCR convencional, confirmando a especificidade de cada oligoiniciador pela geração de uma única banda com os seguintes fragmentos *icaA*: 151 pb, *icaD*: 211 pb, *hld*: 74 pb, *gyrB*: 242 pb e *16S rRNA*: 191 pb (figura 11).

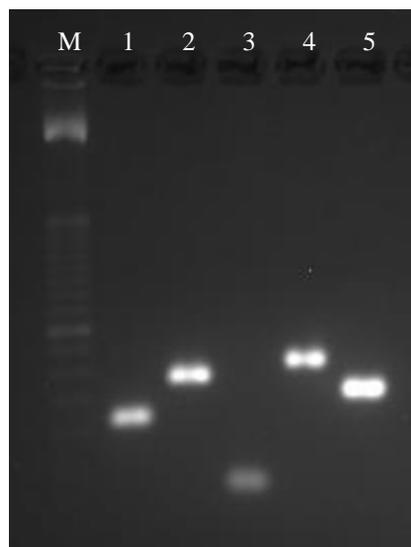


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de qPCR dos genes *icaA* (151 pb), *icaD* (211 pb), *hld* (74 pb), *gyrB* (242 pb) e *16S rRNA* (191 pb). M: marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen), 1: produto de amplificação do gene *icaA*; 2: produto de amplificação do gene *icaD*; 3: produto de amplificação do gene *hld*; 4: produto de amplificação do gene *gyrB*; produto de amplificação do gene *16S rRNA*.

Para a quantificação dos transcritos através da técnica de qPCR, inicialmente foram analisadas a especificidade dos oligoiniciadores utilizados. A figura 12 apresenta a curva de dissociação e as temperaturas de dissociação (T_m 's) de cada produto de amplificação testado, onde se percebe a presença de um pico único, confirmando a amplificação de apenas um fragmento de DNA, sem a apresentação de dímeros de oligoiniciadores.

Após testes de otimização dos oligoiniciadores foi possível estabelecer as concentrações ótimas a serem utilizadas, levando em consideração as concentrações que obtiverem o menor C_q (*quantification cycle*) e o máximo ΔR_n (*Normalized Reporter*). Para os genes *icaA*, *icaD*, *hld* e *gyrB* a concentração ideal estabelecida foi 900 nM para oligoiniciadores Sensu e Anti-sensu. Para o gene *16S rRNA* a concentração ideal estabelecida foi 400 nM para oligoiniciadores Sensu e Anti-sensu. Nestas concentrações, os oligoiniciadores apresentaram um bom desempenho.

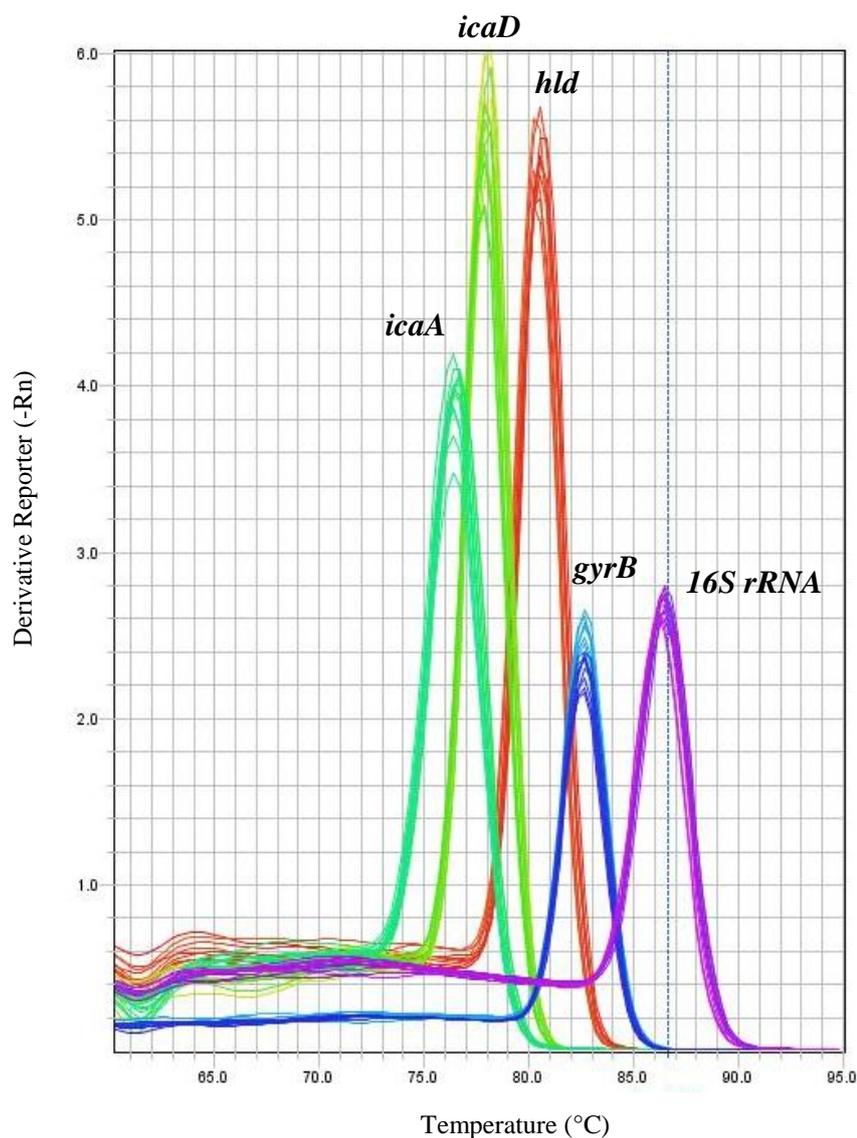


Figura 12. Curva de dissociação dos genes *icaA*, *icaD*, *hld*, *gyrB* e *16S rRNA* avaliados por qPCR.

Os genes *gyrB* e *16S rRNA* foram testados para serem utilizados como controle interno. O gene *16S rRNA* não apresentou variação de C_q nas condições testadas observadas através da curva sendo por isso selecionado como controle interno. Analisando a curva padrão em relação à eficiência (ϵ), coeficiente de correlação (R^2) e *slope* foi confirmado o bom desempenho do sistema para a detecção dos alvos. A eficiência da PCR em tempo real foi calculada de acordo com a fórmula $(10^{-1/slope} - 1) \times 100$. As curvas padrões dos genes experimentais e do controle interno *16S rRNA* mostraram resultados semelhantes de eficiência (>90%), o que possibilitou a quantificação relativa através do método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (figura 13).

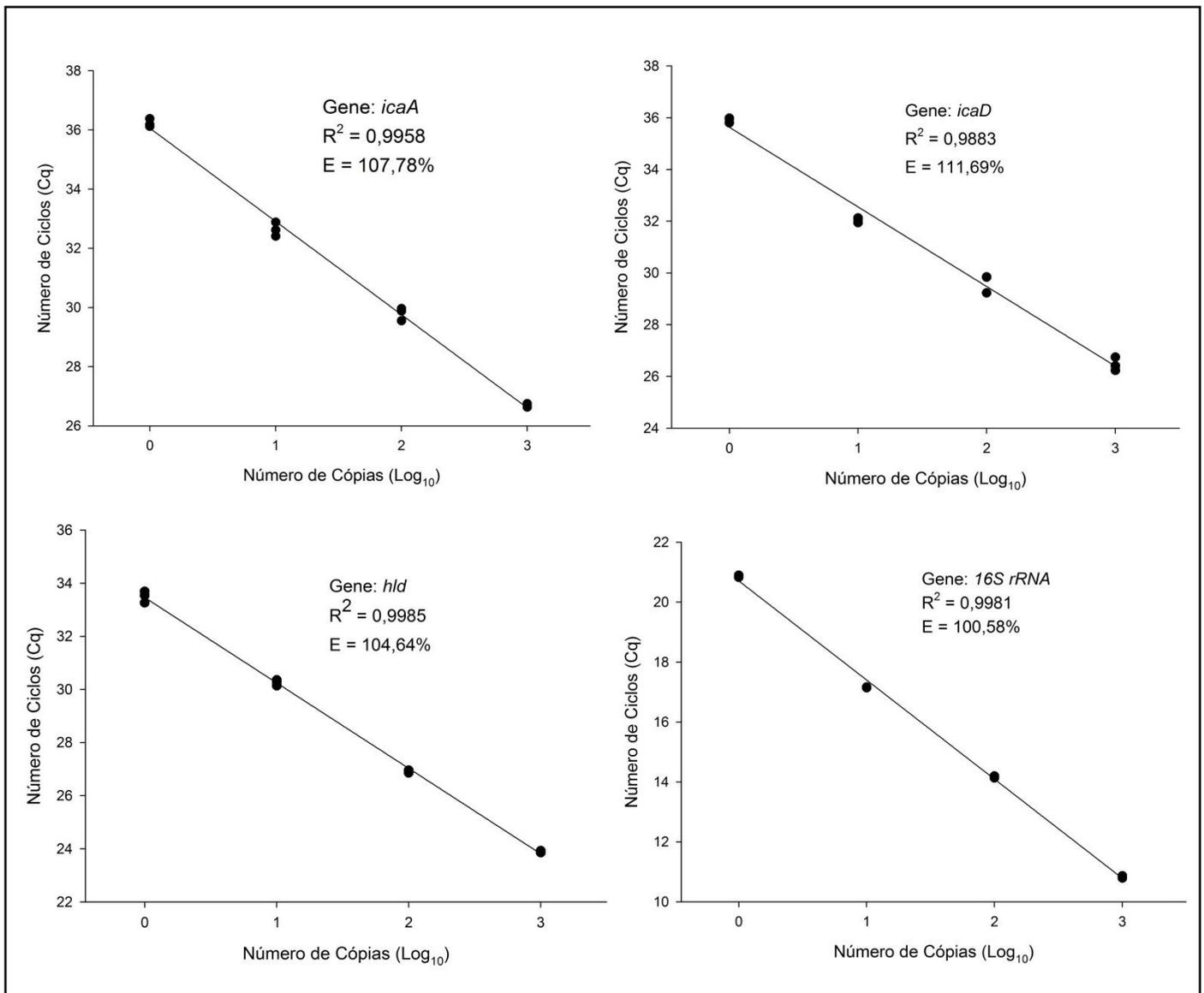


Figura 13. Eficiência de amplificação dos genes *icaA*, *icaD*, *hld* e *16S rRNA* de *Staphylococcus aureus*.

Ainda não há um consenso sobre o processo de formação de biofilmes em *S. aureus* e os estudos sobre os perfis de expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme ainda são em número limitado (ATSHAN et al., 2013). A regulação da expressão de proteínas celulares envolvidas na formação de biofilmes é complexa. Estudos têm sido desenvolvidos a fim de obter mais informações sobre mecanismos envolvidos na expressão de proteínas de fixação e de EPS e sua consequente influência na formação de biofilmes de estafilococos (ATKIN et al., 2014).

Neste estudo, com o objetivo de compreender a expressão de alguns genes relacionados à formação do biofilme, a Quantificação Relativa (QR) da expressão dos genes *icaA*, *icaD* e *hld* foram realizadas em três amostras de *S. aureus*, com distintos perfis de produção de biofilme, nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas, sendo o tempo de 4 h usado como calibrador.

A QR da expressão dos genes em estudo de cada isolado sob diferentes tempos de crescimento foi comparada com a expressão dos genes no tempo de crescimento de 4 h, cuja QR = 1.

A análise da expressão transcricional da cepa N-354 (*icaA*⁺/*icaD*⁺/*bap*⁻/*agr*⁺), caracterizada como fraca produtora de biofilme, mostrou que a QR do gene *icaD* foi maior no tempo de 8 h de crescimento, sendo 1,28 vezes maior que o calibrador e a expressão deste gene diminuiu nos tempos de 12 h e 24 h de crescimento. A expressão do gene *icaA* foi maior no tempo de 4 h. A expressão de *hld* foi 1,25 vezes maior que o calibrador no tempo de 24 h, durante a fase estacionária (figura 14).

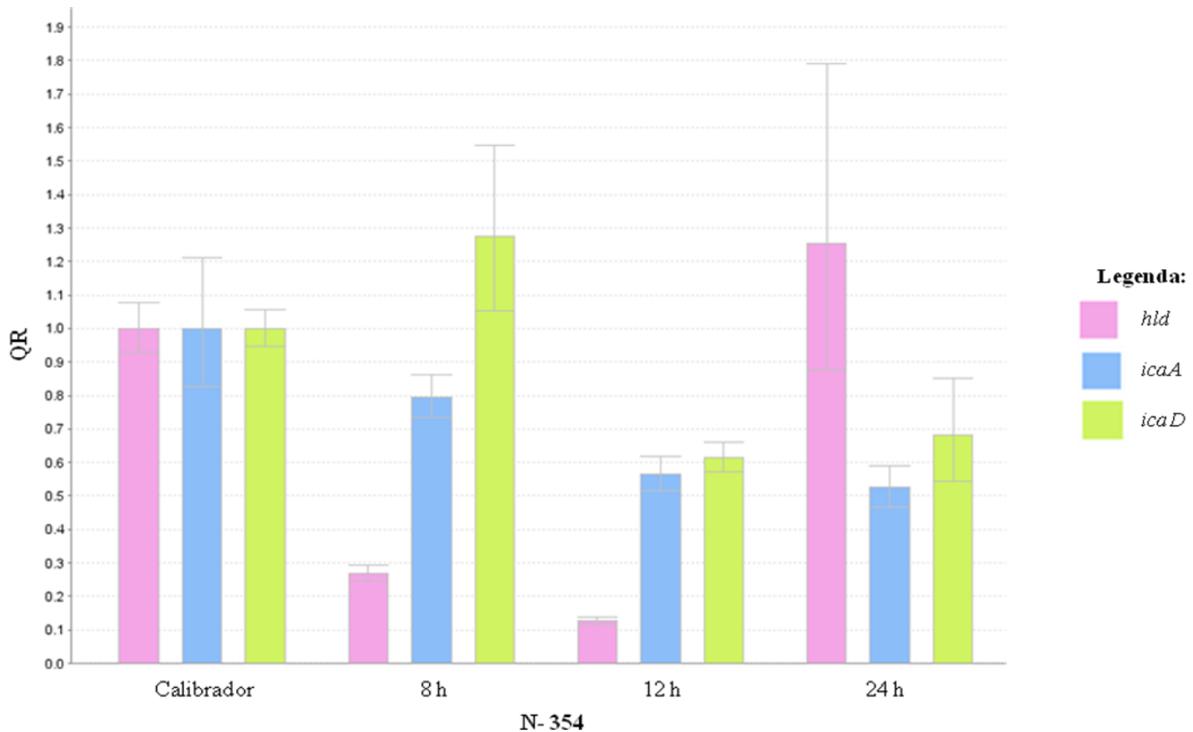


Figura 14. Expressão transcricional dos genes *icaA*, *icaD* e *hld* da cepa de *Staphylococcus aureus* N-354, fraca produtora de biofilme, isolada de mastite bovina.

Na cepa N-354, em 8 horas, pode-se perceber a importância dos genes *ica* na formação do biofilme. Em 24 horas, fica evidenciada a queda da expressão desses genes, ao passo que o gene *hld* aumenta alcançando seu pico de expressão. O gene *hld* é transcrito em um RNAm, o RNA III, que além de codificar a delta-toxina é a molécula efetora do sistema regulatório Agr (GEISINGER et al., 2012). Por isso, quando o sistema Agr está ativo a molécula RNA III é produzida, regulando positivamente a expressão de genes que codificam exotoxinas e proteases e negativamente proteínas associadas à parede celular de *S. aureus*.

Estudos demonstraram que cepas de *S. aureus* com o *locus agr* inativado formaram biofilmes mais espessos quando comparados às estirpes selvagens (TAN et al., 2015). O sistema Agr controla a produção de enzimas que degradam a matriz do biofilme. A ativação do sistema Agr está associada à inibição da maturação do biofilme. A reativação de Agr em biofilmes já formados resulta no destacamento das células do biofilme maduro (BOLES & HORSHWILL, 2012).

A semelhança da cepa N-354, a QR da expressão dos genes *icaA* e *icaD* da cepa N-341 também foi maior no tempo de crescimento de 8 h, sendo QR = 4,17 e 2,01 respectivamente (figura 15). Esta cepa é forte produtora de biofilme e apresentou níveis de expressão de *icaA* e *icaD* maior que a cepa N-354 considerada fraca produtora de biofilme. O gene *hld* apresentou QR = 1,35; 0,5 e 0,69 nos tempos de 8, 12 e 24, respectivamente. A expressão do gene *hld* foi maior no tempo de 8 h, contudo decresceu no tempo de 12 h, voltando a subir em 24 h. É provável que a expressão do gene *hld* alcance seu pico num tempo posterior ao tempo máximo avaliado neste experimento.

A expressão transcricional dos genes *icaA* e *icaD* pelas cepas N-354 e N-341 evidencia que a produção de polissacarídeos mediada pela expressão dos genes do *operon icaADBC* é um importante mecanismo relacionado à capacidade de adesão e formação de biofilmes em cepas *ica*-dependentes, e contribui nas fases iniciais de crescimento bacteriano. Este achado corrobora com Resch e colaboradores (2005) que evidenciaram o aumento da expressão dos genes *ica* de *S. aureus* nas fases iniciais de formação do biofilme, entre 6 e 8 horas e constatou sua diminuição nas fases tardias de crescimento. Beenken e colaboradores (2004) detectaram que apenas um gene do *locus ica* (*icaD*) teve sua transcrição aumentada no biofilme, e isto ocorreu na fase exponencial de crescimento.

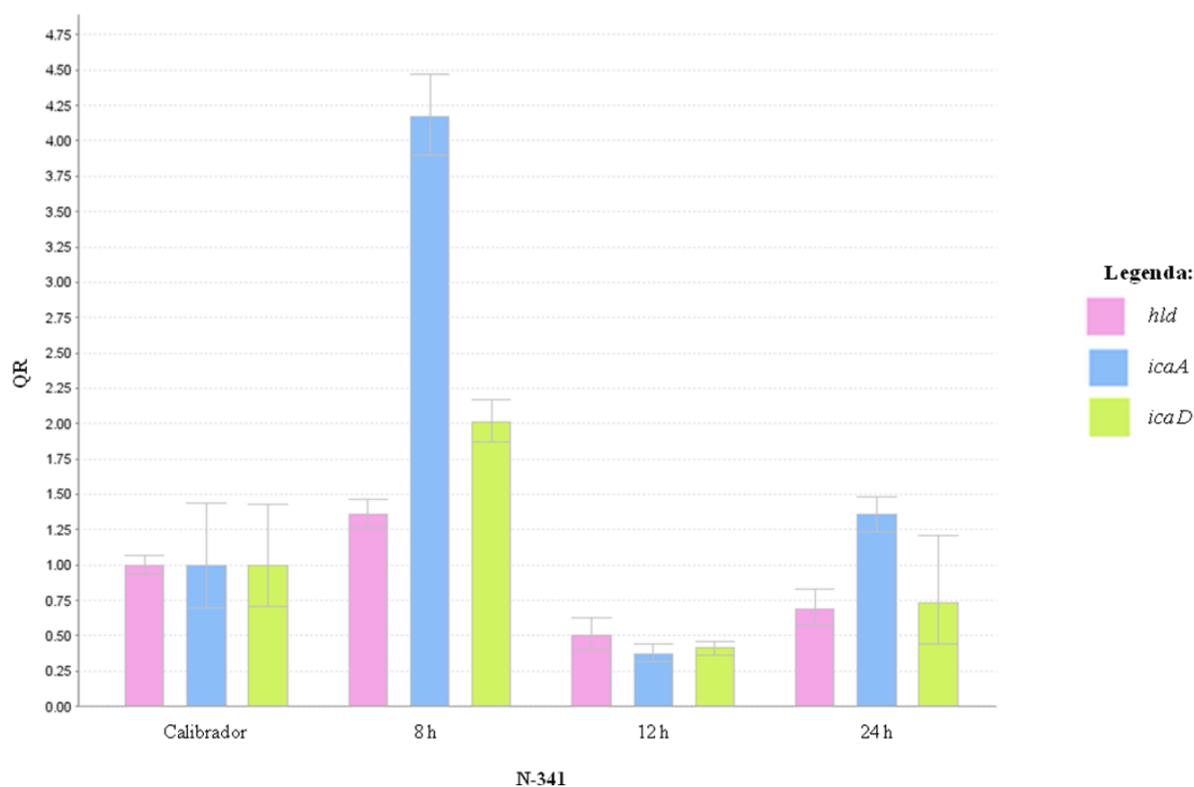


Figura 15. Expressão transcricional dos genes *icaA*, *icaD* e *hld* da cepa de *Staphylococcus aureus* N-341, forte produtora de biofilme, isolada de mastite bovina.

Em trabalho mais recente desenvolvido por Yibao Ma e colaboradores (2012) foi detectado um aumento na expressão de *icaA* de 88% na fase logarítmica de crescimento e redução de 40% na fase estacionária em relação ao controle. Estes dados sugerem que o gene *ica* está associado com a colonização inicial de estafilococos, mas não com a sua persistência (VANDECASTEELE et al., 2003).

Atshan e colaboradores (2013) avaliaram 4 cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) através de RT-qPCR e mostraram que a expressão dos genes *icaA* e *icaD* mudam continuamente ao longo do tempo. Das 4 cepas avaliadas, 2 tiveram maiores níveis de expressão de *icaA*, 1 teve maior expressão de *icaD* e 1 apresentou mesmo resultado de expressão entre os genes *icaA* e *icaD*.

A proteína ICAA é responsável pela síntese de PNAG e a proteína ICAD aumenta a eficiência de biossíntese da proteína ICAA. Os resultados sugerem que o isolado forte produtor de biofilme (N-341) tem a transcrição de ambos os genes (*icaA* e *icaD*) aumentada em relação ao isolado fraco produtor de biofilme (N-354). Ainda ressalta-se que para o

isolado N-341 o gene *icaA* é mais importante para a agregação celular inicial, enquanto que para a cepa N-354 o gene *icaD* tem maior importância, característica que se mantém ao longo da curva de crescimento.

Pelo que se é conhecido, este é o primeiro trabalho a evidenciar a diferença de expressão transcricional dos genes *icaA* e *icaD* entre cepas com produção de biofilme variada.

Com relação à cepa N-365, embora seja produtora moderada de biofilme, teve um comportamento diferente das demais, apresentou baixa expressão dos genes *icaA* e *icaD*, contudo o gene *hld* teve expressão 6,51 vezes maior que o calibrador, no tempo de 24h (figura 16).

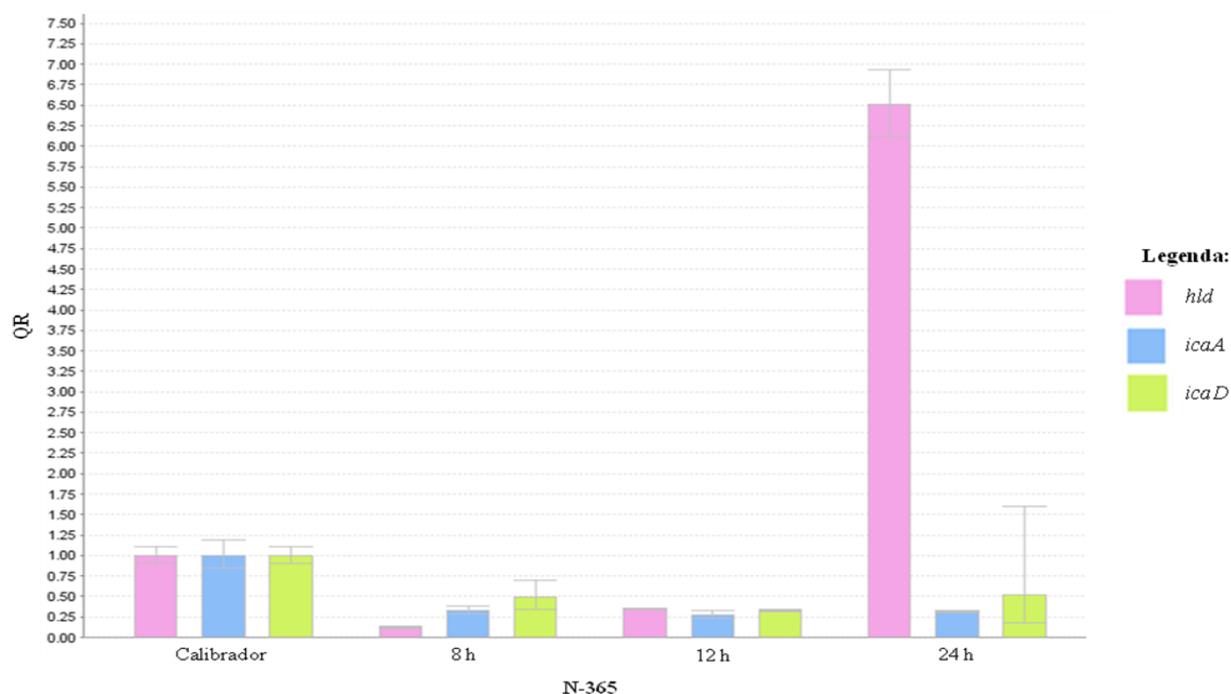


Figura 16. Expressão transcricional dos genes *icaA*, *icaD* e *hld* da cepa de *Staphylococcus aureus* N-365, produtora moderada de biofilme, isolada de mastite bovina.

Considerando que esta cepa é fenotipicamente formadora de biofilme, mas teve baixas taxas de expressão dos genes *icaA* e *icaD*, uma hipótese é de que a formação do biofilme ocorra pela produção de proteínas que facilitem a agregação célula-célula, ao invés do exopolissacarídeo investigado. Uma vez que a etapa de adesão é de significativa importância dentro do estabelecimento do processo infeccioso, é plausível que o microrganismo

desenvolva diferentes vias para produção de adesinas. No caso de um biofilme de natureza proteica, a bactéria precisaria de proteases para realizar seu destacamento, etapa que ocorre na fase estacionária de crescimento celular e que coincide com a alta expressão de *hld* no tempo de 24h de crescimento. O sistema agr ativo leva como já foi dito anteriormente, a ativação da síntese de exoproteínas necessárias ao destacamento celular para posterior adesão das células em novos sítios e progressão da infecção.

Em algumas cepas de *S. aureus* a formação de biofilmes ocorre de maneira independente à expressão do *operon icaADBC*, pois a produção de uma grande variedade de outras proteínas de adesão, tais como a SasG ou Spa, permite o estabelecimento das bactérias em superfícies inertes, e, conseqüentemente a formação de biofilmes (MARTÍ et al., 2010).

Já foi comprovado que a proteína de superfície de *S.aureus*, SasG, bem como a sua homóloga em *Staphylococcus epidermidis*, Aap, podem mediar às interações intercelulares e desenvolvimento do biofilme na ausência do *operon ica* (FORMOSA-DAGUE et al., 2016). SasG é uma proteína formada por um domínio C-terminal e um domínio N-terminal. Este último domínio compreende as regiões A, que tem sido implicada na adesão às células descamadas do tecido epitelial, e regiões repetidas B, que são responsáveis pela agregação célula-célula durante a formação do biofilme. A formação de biofilme mediada por SasG requer a clivagem do domínio N-terminal A. Esse modelo de proteína é conhecido como fecho-de-zinco, em que o zinco medeia os eventos de auto-associação entre trechos repetidos do domínio B em SasG. Estima-se que o número mínimo de trechos repetidos de B em SasG necessário para formação do biofilme são cinco (GRUSZKA et al., 2012).

A Proteína A em *S. aureus* é responsável pela capacidade de agregação e fenótipo para formação de biofilme. Em trabalho de Merino e colaboradores (2009) foi demonstrado que a deleção do gene *spa* diminuiu significativamente a capacidade de *S. aureus* colonizarem catéteres implantados, sugerindo que o desenvolvimento de biofilme mediado pela Proteína A pode ter uma função crítica durante o processo de infecção de *S. aureus* (MERINO et al., 2009). A Proteína A é produzida durante as fases iniciais de crescimento bacteriano quando o RNAm é eficientemente traduzido e protegido da degradação; na transição da fase pós-exponencial para a fase estacionária a síntese de RNAm, molécula efetora do sistema Agr, é induzida, esta molécula se liga ao RNAm de *spa* levando a oclusão da ligação do sítio do ribossomo e inibição da tradução, o que favorece uma rápida degradação de RNAm de *spa* (THOENDEL et al., 2012).

Neste trabalho, sugere-se que a alta expressão de *hld* da cepa N-365 na fase estacionária seja necessária para ativar a síntese de proteases extracelulares requeridas para o

despreendimento de biofilme de natureza proteica, conforme proposto por BOLES & HORSWILL (2008). Em *S. aureus*, o sistema Agr controla a expressão de pelo menos 10 proteases extracelulares, que podem mediar à dispersão do biofilme (THOENDEL et al., 2012). Martí e colaboradores (2010) desenvolveram um trabalho onde verificaram que *agr* tem um efeito positivo sobre a expressão de proteases durante a fase estacionária e que estas proteases controlam a formação do biofilme podendo inclusive, inibir a sua formação.

É importante salientar, que estes resultados estão limitados a uma única estirpe, e é certamente possível que N-365 tenha um meio alternativo para promover o acúmulo intercelular que atenua a necessidade de PIA. Contudo, é necessário aprofundar os estudos a fim de verificar se este biofilme é de origem proteica e se existem outros fatores de ligação que seriam auxiliares na acumulação das células do biofilme em diferentes pontos temporais do crescimento bacteriano.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, os 20 isolados avaliados foram produtores de biofilme, sendo 16 positivos para ambos os genes *icaA* e *icaD* e os demais apresentaram apenas um destes genes.

Apenas um isolado apresentou o gene *bap*.

O gene *agr RNA III* foi detectado em todos os isolados e o sistema regulatório Agr tipo II apresentou prevalência de 70%.

A cepa de estudo para a técnica de MEV, N-341, mostrou mudanças graduais no arranjo bacteriano durante a formação de biofilme que atingiu seu pico na fase estacionária da curva de crescimento.

No que tange aos testes de suscetibilidade aos beta-lactâmicos, a resistência à penicilina foi evidente, sendo considerada a produção de beta-lactamase como o provável mecanismo envolvido nesta resistência, devido à ausência do gene *mecA* e a sensibilidade à amoxicilina+ácido clavulânico observada em todos os isolados.

Para este estudo, a elevada CBM detectada para cefoxitina no isolado N-341 pode estar associada à proteção oferecida pelo biofilme, episódio evidenciado pelo fato dos isolados apresentarem valores de CIMB superiores aos CIMs avaliados nas células planctônicas.

A análise transcricional evidenciou maior expressão dos genes *ica* no tempo de 8 h de crescimento e *hld* em 24 h, a exceção da cepa N-365 que apresentou baixa produção dos genes *ica*.

Estudos adicionais devem ser realizados a fim de avaliar a composição bioquímica da estrutura do biofilme observado na cepa N-365 de modo a confirmar uma possível natureza proteica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATOOM, A.A.; CUNNINGHAM, S.A.; IHDE, S.M.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2868–2873, 2011.

ALMEIDA, L.M.; ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; MENDONÇA, C.L.; MAMIZUKA E.M. Comparative analysis of *agr* groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 493-498, 2013.

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

AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; LEIVA, J.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J.L.; HERNÁNDEZ-YAGO, J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 43-55, 1999.

APPLIED BIOSYSTEMS. Real-time PCR systems: Chemistry Guide. 138p, 2005. Disponível em: <www.appliedbiosystems.com>. Acesso em: 13 de julho de 2015.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 6, p. 2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233-4239, 2002.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI S.; RIZZI, S.; DONATI, M.E.; BALDASSARRI, L.; et al. Search for the insertion element IS256 within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. **Biomaterials**, v. 25, p. 4117-4125, 2004.

ARCIOLA, C.R.; GAMBERINI, S.; CAMPOCCIA, D.; VISAI, L.; SPEZIALE, P.; BALDASSARRI, L.; et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. **J Biomed Mater Res A**, v. 75, p. 408-413, 2005.

ARCIOLA, C.R.; VISAI, L.; TESTONI, F.; ARCIOLA, S.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; et al. Concise survey of *Staphylococcus aureus* virulence factors that promote adhesion and damage to peri-implant tissues. **Int J Artif Organs**, v. 34, n. 9, p.771-780, 2011.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular

mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, p. 5967-5982, 2012.

ATKIN, K.E.; MACDONALD, S.J.; BRETNALL, A.S.; POTTS, J.R.; THOMAS, G.H. A different path: Revealing the function of staphylococcal proteins in biofilm formation. **FEBS Letters**, n. 588, p. 1869–1872, 2014.

ATSHAN, S.S.; SHAMSUDIN, M.N.; KARUNANIDHI, A.; BELKUM, A.; LUNG, L.T.T.; SEKAWI, Z.; NATHAN, J.J.; LING, K.H.; SENG, J.S.C.; ALI, A.M.; ABDULJALEEL, S.A.; HAMAT, R.A. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 106-112, 2013.

BABRA, C.; TIWARI, J.G.; PIER, G.; THEIN, T.H.; SUNAGAR, R.; SUNDARESHAN, S.; ISLOOR, S.; HEGDE, N.R.; WET, S.; DEIGHTON, M.; GIBSON, J.; COSTANTINO, P.; WETHERALL, J.; MUKKUR, T. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. **Folia Microbiol**, DOI 10.1007/s12223-013-0232-z, 2013.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 253-e52, 2012.

BARDIAU, M. YAMAZAKI, K.; DUPREZ, J.N.; TAMINIAU, B.; MAINIL, J.G.; OTE, I. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Lett Appl Microbiol**, v. 57, p. 181-186, 2013.

BASTOS, C.P. **Detecção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos** (Tese) – Pelotas: UFPel, 91f., 2013.

BEENKEN, K.E.; DUNMAN, P.M.; MCALEESE, F.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; PROJAN, S.J.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4665–4684, 2004.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; ERCOLINI, D.; PEPE, O.; COPPOLA, S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 192-201, 2010.

BOISSET, M.; GEISSMANN, T.; HUNTZINGER, E.; FECHTER, P.; BENDRINI, N.; POSSEDKO, M.; CHEVALIER, C.; HELFER, A.C.; BENITO, Y.; JACQUIER, A.; GASPIN, C.; VANDENESCH, F.; ROMBY, P. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. **Genes Dev**, v. 21, p. 1353–1366, 2007.

BÖHME, K.; MORANDI, S.; CREMONESI, P.; NO, I.C.F.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CASTIGLIONI, B.; BRASCA, M.; CAÑAS, B.; CALO-MATA, P. Characterization of

Staphylococcus aureus strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Electrophoresis**, v. 33, p. 2355–2364, 2012.

BOLES, B.R. & HORSWILL, A.R. *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoSPathogens**, v. 4, n. 4, 2008. e1000052 doi:10.1371/journal.ppat.1000052.

BOLES, B.R. & HORSWILL, A.R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 9, p. 449–455, 2012.

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.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFALL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, p. 611-622, 2009.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 104–109, 2011.

CALSA-JUNIOR, T.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O. Análise serial da expressão gênica. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 88-100, 2004.

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- α -(1-6)-Glucosamine. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3406–3413, 2007.

CHAGAS, L.G.S.; MELO, P.C.; BARBOSA, N.G.; GUIMARÃES, E.C.; BRITO, D.D. Occurrence of bovine mastitis caused by *Staphylococcus* sp. *Streptococcus* sp. and *Candida* sp. in a rural area of Indianópolis – Minas Gerais, Brazil. **Biosci J**, v. 28, p. 1007–1014, 2012.

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.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E.E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Braz J Microbiol**, v. 40, p. 254-261, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards - 4 Ed, VET01-A4**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards; Second Informational Supplement**, VET01-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standards; Twenty-fourth Informational Supplement**, M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 2014.

COELHO, S.M.O.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; PRIBUL, B.R.; 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**, v. 94, n. 7, p. 3305-3310, 2011.

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

CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infect Immun**, v. 67, p. 5427-5433, 1999.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.N.I.; PENADÉS, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **J Bacteriol**, v. 183, n. 9, p. 2888–2896, 2001.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; ÚBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, 2004.

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**, v. 24, p. 181–198, 2002.

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.

FABRES-KLEIN, M.H.; SANTOS, M.J.C.; KLEIN, R.C.; SOUZA, G.N.; RIBON, A.O.B. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC Vet Res**, v. 11, n. 3, 2015. DOI 10.1186/s12917-015-0319-7.

FLEMMING, K.; KLINGENBERG, C.; CAVANAGH, J.P.; SLETTENG, M.; STENSEN, W.; SVENDSEN, J.S.; FLÆGSTAD, T. High in vitro antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 136–145, 2009.

FORMOSA-DAGUEA, C.; SPEZIALEB, P.; FOSTERC, T.J.; GEOGHEGAN, J.A.; DUFRÊNEA, Y.F. Zinc-dependent mechanical properties of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming surface protein SasG. **PNAS**, v. 113, n. 2, p. 2410–2415, 2016.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. **J Clin Pathol**, v. 42, p. 872-874, 1989.

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, 2005.

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.

GEISINGER, E.; CHEN, J.; NOVICK, R.P. Allele-dependent differences in *Quorum-Sensing* dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v. 194, n. 11, p. 2854–2864, 2012.

GÓMEZ, P.; GONZÁLEZ-BARRIO, D.; BENITO, D.; GARCÍA, J.T.; VINUELA, J.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-FONS, F.; TORRES, C. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. **J Antimicrob Chemother**, doi:10.1093/jac/dku100, 2014.

GOMES, A.L.V. **Expressão de genes relacionados com a indução da resposta imune inata da dengue: implicações no prognóstico** (Tese) – Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 130f., 2011.

GRUSZKA, D.T.; WOJDYLA, J.A.; BINGHAM, R.J.; TURKENBURG, J.P.; MANFIELD, I.W.; STEWARD, A.; LEECH, A.P.; GEOGHEGAN, J.A.; FOSTER, T.J.; CLARKE, J.; POTTS, J.R. Staphylococcal biofilm-forming protein has a contiguous rod-like structure. **PNAS**, doi/10.1073/pnas.1119456109, p. E1011–E1018, 2012.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser**, v.41, p.95-98, 1999.

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.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Mol Microbiol**, v. 20, p. 1083-1091, 1996.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio/Technology**, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiol**, v. 5, p. 1663–1674, 2010.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H.K.; SONG, Z.; MOSER, C.; JENSEN, P.O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, 2011.

HOOKEY, J.V.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 4, p. 1083–1089, 1998.

HOUSTON, P.; ROWE, S.E.; POZZI, C.; WATERS, E.M.; O’GARA, J.P. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. **Infect Immun.**, v. 79, p. 1153-1165, 2011.

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.

KEAYS, T.; FERRIS, W.; VANDEMHEEN, K.L.; CHAN, F.; YEUNG, S.W.; MAH, T.F.; RAMOTAR, K.; SAGINUR, R.; AARON, S.D. A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: A better predictor of clinical response in cystic fibrosis exacerbations. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, p. 122–127, 2009.

KHAN, F.; SHUKLA, I.; RIZVI, M.; MANSOOR, T.; SHARMA, S.C. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections? **Trends Med Res**, v. 6, p. 116–123, 2011.

KIRBY, A.E.; GARNER, K.; LEVIN, B.R. The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 2967–2975, 2012.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C. ; WINN JR. **Diagnóstico Microbiológico**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2012.

KREWER, C.C.; LACERDA, I.P. de; AMANSO, E.S.; CAVALCANTE, N.B.; PEIXOTO, R. de; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; COSTA, M.M. da; MOTA, R.A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesq Vet Bras**, v. 33, n. 5, p. 601-606, 2013.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27(2-3), p. 95–125, 2006.

KUMAR, S., TAMURA, K., & NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

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**, v. 60, p. 379–386, 2010.

LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; SOUZA, G.N.; MACHADO, M.A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A.P.S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.

LATASA, C.; SOLANO, C.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Biofilm-associated proteins. **C R Biol**, v. 329, p. 849-857, 2006.

LEAL, C.A.G. **Desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de patógenos emergentes para aquicultura nacional** (Tese) – Lavras: UFPA, 92p., 2012.

LEITE, B.A. **Estudo da susceptibilidade e resposta dos biofilmes de estafilococos aos agentes antimicrobianos** (Tese) – São Carlos: UFSCar, 151f., 2013.

LIU, H.; ZHAO, D.; CHANG, J.; YAN, L.; ZHAO, F.; WU, Y.; XU, T.; GONG, T.; CHEN, L.; HE, N.; WU, Y.; HAN, S.; QU, D. Efficacy of novel antibacterial compounds targeting histidine kinase YycG protein. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 6003–6013, 2014.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MACK, D.; ROHDE, H.; HARRIS, L.G.; DAVIES, A.P.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K. Biofilm formation in medical device-related infection. **Int J Artif Organs**, v. 29, n. 4, p. 343-359, 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 12ª ed., 1160p., 2010.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A New method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p. 538-544, 1998.

MARQUES VF, SOUZA MMS, MENDONÇA ECL, ALENCAR TA, PRIBUL BR, COELHO SMO, LASAGNO M, REINOSO EB. 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. **Pesq Vet Bras**, v. 33, n. 2, p. 161-170, 2013.

MARTÍ, M.; TROTONDA, M.P.; TORMO-MÁS, M.A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; CHEUNG, A.L.; LASA, I.L.; PENADÉS, J.R. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 55-64, 2010.

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

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. **Vet Microbiol**, v. 125, p. 141–149, 2007.

MELCHIOR, M.B.; VAN OSCH, M.H.J.; GRAAT, R.M.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.J.; NIELEN, M.; GAASTRA, W.; FINK-GREMMELS, J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Vet Microbiol**, v. 137, p. 83–89, 2009.

MELO, D.A.; COELHO, I. S.; MOTTA, C.C.; ROJAS, A.C.C.M.; DUBENCZUK, F.C.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. **Braz J Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 1075-1082, 2014.

MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, A.D.; ALENCAR, T.A.; COELHO, I.S.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesq Vet Bras**, v. 31, n. 9, p. 859-864, 2012.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J.A.; FOSTER, T.J.; PENADES, J.R.; LASA, I. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 832–843, 2009.

MONTANARO, L.; SPEZIALE, P.; CAMPOCCIA, D.; PIRINI, V.; RAVAIOLI, S.; CANGINI, I.; et al. Polymorphisms of *agr* locus correspond to distinct genetic patterns of virulence in *Staphylococcus aureus* clinical isolates from orthopedic implant infections. **J Biomed Mater Res A**, v. 94, p. 825-832, 2011.

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.

MOTTA, C.C.; ROJAS, A.C.M.; DUBENCZUK, F.C.; BOTELHO, L.A.B.; MOREIRA, B.M.; COELHO, S.M.O.; COELHO, I.S.; SOUZA, M.M.S. Verification of molecular characterization of coagulase positive *Staphylococcus* from bovine mastitis with matrix-assisted laser desorption ionization, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) mass spectrometry. **Af. Journ. Microbiol. Res.**, v. 8, n. 48, p. 3861-3866, 2014.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2240-2244, 1991.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, p. 1-4, 2007.

O’GARA, J.P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 270, p. 179-188, 2007.

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.

OLIVEIRA, T.M.S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações** (Dissertação) – Aveiro (Portugal): Universidade de Aveiro, 111f., 2010.

PIERCE, C.G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A.R.; WORMLEY JR., F.L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc.**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

POTTER, A.; CEOTTO, H.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; dos SANTOS, K.R.; NES, I.F.; BASTOS M.C. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. **J Microbiol**, v. 47, p. 319-326, 2009.

RAZA, A.; MUHAMMAD, G.; SHARIF, S.; ATTA, A. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: a review. **Mol Microbiol Res**, v. 3, p. 1–8, 2013.

REINOSO, E.B. **Análisis epidemiológico y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* de distintos orígenes** (Tese) Rio Cuarto, Argentina - UNRC, 199p., 2004.

RESCH, A.; ROSENSTEIN, R.; NERZ, C.; GOTZ, F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2663–2676, 2005.

RYDER, V.J.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A.J. Increased Mutability of Staphylococci in Biofilms as a Consequence of Oxidative Stress. **PLOS ONE**, v. 7, e47695, 2012.

ROHDE, H.; BURANDT, E.C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, v. 28, p. 1711-1720, 2007.

ROSATO, A.E; KREISWIRTH, B.N; GRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; AECHER, G.L. *mecA-BlaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, p. 1463-1466, 2003.

SAEI, H.D. *coa* types and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. **Comparative Clinical Pathology**, v.21, p. 301-307, 2012.

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

SAVAGE, V.J.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A.J. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Journ. Antimicrob. and Antichem. Agents.**, v. 57, n. 4, p. 1968-1970, 2013.

SCHMITTGEN, T. & LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCHMITTGEN, T. & ZAKRAJSEK, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 46, p. 69-81, 2000.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B.; ALCABES, P.; SAID-SALIM, B.; LINA, G.; MATSUKA, A.; MARTINEZ, J.; KREISWIRTH, B.N. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 456–459, 2003.

SIHTO, H.M.; TASARA, T.; STEPHAN, R.; JOHLER, S. Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in *Staphylococcus aureus* exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. **FEMS Microbiol Lett**, v. 356, p. 134–140, 2014.

SINGH, A.; WALKER, M.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 93, 2013.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. A 23S rDNA-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.

SUDGEN, D. & WINTER, P. **Molecular Biomethods Handbook**. Humana Press: Springer, 2008.

TAN, X.; QIN, N.; WU, C.; SHENG, J.; YANG, R.; ZHENG, B.; MA, J.; LIU, L.; PENG, X.; JIA, A. Transcriptome analysis of the biofilm formed by methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, 5:11997, DOI: 10.1038/srep11997, 2015.

TARASZKIEWICZ, A.; FILA, G.; GRINHOLC, M.; NAKONIECZNA, J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **BioMed Research International**, Article ID 150653, 13 pages, 2013.

THOENDEL, M.; KAVANAUGH, J.S.; FLACK, C.E.; HORSWILL, A.R. Peptide signaling in the Staphylococci. **Chem Rev**, v. 111, n. 1, p. 117–151, 2012.

TITO, T.M.; RODRIGUES, N.M.B.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S.; ZONTA, E.; COELHO, I.S. Choice of DNA extraction protocols from Gram negative and positive bacteria and directly from the soil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 12, p. 863-871, 2015.

TOLEDO-ARANA, A.; MERINO, N.; VERGARA-IRIGARAY, M.; DÉBARBOUILLÉ, M.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. **J Bacteriol**. v. 187, n. 15, p. 5318–5329, 2005.

TOLEDO-SILVA, G. **Análise da expressão gênica diferencial em ostras-do-pacífico *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*** (Dissertação) - Florianópolis: UFSC 94p., 2009.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GÖTZ, F.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v. 151, p. 2465-2475, 2005.

TURKYILMAR, 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.

VANDECASTEELE, S.J.; PEETERMANS, W.E.; MERCKX, R.R.; RIJNDERS, B.J.A.; ELDERE, J. VAN. Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, p. 114–119, 2003.

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.

VAUTOR, E.; MAGNONE, V.; RIOS, G.; LE BRIGAND, K.; BERGONIER, D.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; BARBRY, P.; THIÉRY, R.; PÉPIN, M. Genetic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminant species: A single-dye DNA microarray approach. **Vet Microbiol**, v. 133, p. 105-114, 2008.

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.

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.

WELLS, C.L.; HENRY-STANLEY, M.J.; BARNES, A.M.T.; DUNNY, G.M.; HESS, D.J. Relation between antibiotic susceptibility and ultrastructure of *Staphylococcus aureus* biofilms on surgical suture. **Surgical infections**, v. 12, n. 4, p. 297-305, 2011.

WU, H.; MOSER, C.; WANG, H.Z.; HOIBY, N.; SONG, Z.J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, p. 1–7, 2015.

YARWOOD, J.M.; BARTELS, D.J.; VOLPER, E.M.; GREENBERG, E.P. *Quorum sensing* in *Staphylococcus aureus* biofilms. **J Bacteriol**, v. 186, p. 1838–1850, 2004.

YIBAO MA; YUANXI XU; YESTREPSKY, B.D.; SORENSON, R.J.; CHEN, M.; LARSEN, S.D.; SUN, H. Novel Inhibitors of *Staphylococcus aureus* Virulence Gene Expression and Biofilm Formation. **PLOS ONE**, v. 7, e47255, 2012.

ZIEBUHR, W.; KRIMMER, V.; RACHID, S.; LÖSSNER, I.; GÖTZ, F.; HACKER, J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. **Mol Microbiol**, v. 32, p. 345-356, 1999.

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.

ANEXOS

Anexo I – Procedimentos para garantir um ambiente livre de RNases.

Anexo II – Protocolo de Extração de RNA (*Rneasy Protect Bacteria Mini Kit* - Qiagen®)

Anexo III – Protocolo de Tratamento do RNA com DNase (Promega®)

Anexo IV – Protocolo de extração de DNA (*Wizard Genomic DNA Purification Kit* - Promega®)

Anexo I

Procedimentos para garantir um ambiente livre de RNases

1. Utilizar luvas tomando o cuidado de trocá-las sempre que tocar em superfícies contaminadas.
2. Todas as soluções devem ser preparadas com água livre de nucleases ou água DEPC (veja nota). As soluções podem ser estocadas em pequenas alíquotas e descartadas após o uso.

NOTA: Água DEPC 0,1% é preparada adicionando-se 1 mL de DEPC (dietilpirocarbonato) em 1000 mL de água. O frasco deve ser agitado vigorosamente para que o DEPC entre em contato com as moléculas de água, e iniba as RNases. Após 12 h esta solução deve ser autoclavada por 15 min a 120 °C para inativar os resíduos de DEPC. Deve-se levar em conta que a reação de desativação do DEPC gera grande quantidade de gás.

3. As vidrarias devem ser tratadas com água DEPC 0,1% “overnight” e depois autoclavadas a 120 °C por 15 min. Ou tratadas em Forno Pasteur, neste caso recomenda-se a permanência da vidraria por 4 h a 300 °C ou 5 h a 200 °C.

4. A cuba utilizada na eletroforese de RNA deve passar pelo seguinte tratamento:

Lavar com solução detergente e rinsar com água DEPC 0,1%;
Lavar com etanol 100 % e rinsar com solução de peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂);
Deixar a cuba a temperatura ambiente por 10 min. e rinsar com água DEPC.

5. A cuba e os pentes utilizadas na eletroforese devem ser pré-incubados em água DEPC 0,1% “overnight” antes da realização da eletroforese de RNA.

6. É recomendado o uso de MOPS 1X [3- (N morfolino) -propano-sulfônico ácido] no tampão de corrida e na preparação do gel de agarose (veja nota).

NOTA:

Tampão MOPS 10x pH = 7,0 (MOPS 0,2 M; acetato de sódio 0,05 M; EDTA 0,01 M)

- MOPS	41,6 gramas
- Acetato de sódio 3M pH = 7,0	16,6 mL
- EDTA 0,5 M pH = 8,0	20 mL
- Água DEPC	900 mL

Ajustar pH = 7,0 e completar volume para 1 L com água DEPC.

Adicionar 1 mL de DEPC, homogeneizar e ajustar para um volume final de 1000 mL.

Incubar “overnight” e autoclavar a 120 °C por 15 min.

Anexo II

Protocolo de Extração de RNA (*Rneasy Protect Bacteria Mini Kit* - Qiagen®)

1. Descongelar os “pellets” (formado por células mais reagente Protect) à temperatura ambiente e em seguida, ressuspendê-los em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl a 10 mM, 1 mM de EDTA dissódico, pH 8,0) + 8 µL de lisostafina (cf = 20 µg/mL).
2. Misturar em vortex por 10s. Incubar à temperatura ambiente durante 10 min. Incubar em incubadora shaker (ou vortex por 10s a cada 2 min de incubação).
3. Adicionar 700 µL de tampão RLT (veja nota) e vortexar vigorosamente. Se o material em partículas for visível, este deve ser sedimentado por centrifugação, e apenas o sobrenadante deve ser usado em passos subsequentes.

Para tubos de até 2 mL, centrifugar durante 2 min à velocidade máxima.

Nota: Certifique-se de que β-mercaptoetanol (β-ME) foi adicionado ao tampão RLT antes do uso. Adicionar 10 µL de β-ME por 1mL de tampão RLT. Tampão RLT é estável durante 1 mês após adição de β-ME.

4. Adicionar 500 µL de etanol (96-100%) ao lisado. Misture por pipetagem. Não centrifugar.
5. Aplique o lisado contendo etanol, inclusive qualquer precipitado que pode ter formado, a uma coluna RNeasy colocada em um tubo de 2 mL. O volume máximo é de 700 µL. Feche o tubo gentilmente e centrifugue por 15 s em $>$ ou $= 8.000 \times g$. Descarte o filtrado.

Reutilize o tubo de coleta no passo 6.

6. Adicionar 700 µL de tampão de RW1 à coluna RNeasy. Fechar delicadamente o tubo e centrifugar por 15 s em $>$ ou $= 8.000 \times g$. Descartar o filtrado e o tubo de coleta.
7. Transferir a coluna de RNeasy para um novo tubo de 2 mL. Pipetar 500 µL de tampão RPE (veja nota) na coluna RNeasy. Fechar o tubo suavemente e centrifugar por 15 s em $>$ ou $= 8.000 \times g$. Descartar o filtrado.

Reutilizar o tubo de coleta no passo 8.

Nota: Tampão RPE é fornecido como um concentrado. Certifique-se de que o etanol foi adicionado ao tampão RPE antes do uso. Adicionar 4 volumes de etanol (96-100%), para obter uma solução de trabalho.

8. Adicionar mais 500 µL de tampão RPE para a coluna RNeasy. Fechar o tubo gentilmente, e centrifugar durante 2 min a $>$ ou $= 8.000 \times g$ para permitir que o tampão RPE passe através da coluna, e para secar a RNeasy membrana de sílica-gel.

Nota: Após a centrifugação remover a coluna RNeasy do tubo de coleta com cuidado para que a coluna não entre em contato com o filtrado, pois isto resultará em contaminação com etanol.

9. Para eluir, transferir a coluna de RNeasy para um novo tubo de 1,5 mL. Pipetar 30 µL de água “RNeasy-free” diretamente na membrana de sílica-gel. Fechar o tubo delicadamente e centrifugar por 1 min a $>$ ou $= 8.000 \times g$ para eluir.

10. Para ter maior rendimento pode-se eluir um segundo volume de água RNeasy-free em outro tubo coletor.

O RNA dever ser armazenado em ultra-freezer – 80°C.

Anexo III

Protocolo de Tratamento do RNA com DNase (RQ1 *Rnase-Free Dnase* - Promega®)

1. Preparar a seguinte reação:

RNA em água	1-8 μL (1 μg de RNA)
Buffer 10x DNase	1 μL
DNase RQ1	1 μL
Água nuclease-free	ajustar para um VF = 10 μL

2. Incubar a 37 °C por 30 min.
3. Adicionar 1 μL de Solução Stop.
4. Incubar a 65 °C por 10 min.

Prosseguir com RT-PCR.

Anexo IV

Protocolo de extração de DNA (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit* - Promega®)

1. Centrifugar 1 mL de cultura overnight por 2 min. a 16.000 $x g$.
2. Descartar o sobrenadante.
3. Suspender as células em 400 μL de EDTA 50 mM.
4. Adicionar 120 μL de lisostafina (10 mg/mL).
5. Incubar por 60 min. a 37 °C. Homogeneizar a cada 20 min.
6. Centrifugar por 2 min. a 16.000 $x g$ e remover o sobrenadante.
7. Adicionar 600 μL de solução de lise nuclear. Pipetar gentilmente para misturar.
8. Incubar por 5 min. a 80 °C. Deixar a temperatura ambiente.
9. Adicionar 3 μL de solução RNase, homogeneizando por inversão. Incubar por 60 min. a 37 °C. Colocar no gelo até chegar a temperatura ambiente.
10. Adicionar 200 μL da solução de precipitação proteica. Vortexar em alta velocidade por 20 seg.
11. Incubar no gelo por 5 min.
12. Centrifugar a 16.000 $x g$ por 3 min.
13. Transferir o sobrenadante para um tubo novo contendo 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente. Misturar suavemente por inversão.
14. Centrifugar por 2 min. a 16.000 $x g$.
15. Adicionar 600 μL de etanol 70% gelado. Misturar por inversão.
16. Centrifugar a 16.000 $x g$ por 2 min.
17. Descartar o sobrenadante com cuidado, invertendo o tubo de forma que o precipitado não desprenda e caia no descarte;
18. Deixar o “pellet” secar no ambiente com o tubo aberto por 10 min.
19. Adicionar 50 μL de solução de reidratação ao tubo contendo o “pellet”. Incubar por 1 h a 65 °C. Periodicamente bater suavemente no tubo para misturar a solução.

Armazenar o DNA a -20 °C.