UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Fatores de virulência e genes regulatórios *agr* de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastites bovina e ovina

Lara Mendes de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE
Orientadora: Prof^ª Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2009

Lara Mendes de Almeida

Fatores de virulência e genes regulatórios *agr* de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastites bovina e ovina

Comissão julgadora da dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Dra. Elsa Masae Mamizuka
Orientador/ presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, de de 2009.

Ao Carlos

Aos meus filhos, Natalie e Felipe

Agradecimentos

À Profª Dra. Elsa Masae Mamizuka, pela oportunidade, por sua orientação sempre paciente e pela compreensão e carinho em momentos difíceis.

Aos veterinários Franklin Bispo dos Santos, sua orientadora Profª Titular Elizabeth Oliveira da Costa e ao Prof. Doutor Luiz Francisco Zafalon pela coleta e disponibilidade das amostras provenientes de bovinos do Estado de SP analisadas neste estudo. À Profª Doutora Carla Lopes de Mendonça (UFRPE), pelas amostras de ovinos da região do agreste do Estado de PE.

Ao John Anthony McCulloch, por suas explicações sempre claras e problematizadoras, por ter compartilhado o trabalho de padronização de suas técnicas e pela colaboração em alguns ensaios dessa pesquisa.

Ao Nilton Lincopan, por questionar, algumas vezes, o foco e os meios de desenvolvimento dessa pesquisa, sugerindo outros caminhos interessantes e por sua generosidade no dia a dia.

À Profª Marina Martinez, por suas aulas no curso de Microbiologia que me incentivaram a voltar à pesquisa. Aos seus alunos, Ana Carolina, Elisabeth, Carla, Renata e Lucas pelo apoio na realização de muitos experimentos.

À banca examinadora de qualificação, composta pelo Prof. Luiz Francisco Zafalon e pela Profª Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, pelas leituras cuidadosas e sugestões.

À Renata Pacheco, pela generosidade ao compartilhar técnicas bem padronizadas.

Aos meus colegas de laboratório, Mariama, Mônica, Álvaro, Charline, Patrícia, Lilian e Franciele pelo convívio carinhoso e pelas possibilidades de troca.

Ao meu pai, Fernando, pelas conversas sobre Ciências Naturais, e à Rose.

À minha mãe, Fátima e ao Djalma.

Aos funcionários do departamento, pelo atendimento a inúmeras solicitações administrativas e pela ajuda na organização do laboratório.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização deste estudo.

Lista de abreviaturas e siglas

<i>agr</i>	Regulador de Genes Acessórios
AIP	Peptídeo Auto-indutor
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BAP	Proteína associada à formação de biofilme
<i>bap</i>	Gene codificador da proteína associada à formação de biofilme
BBP	Proteína ligadora de sialoproteína óssea
<i>bbp</i>	Gene codificador da proteína ligadora de sialoproteína óssea
BHI	Infusão de Coração e Cérebro
BORSA	<i>Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
CCS	Contagem das Células Somáticas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLFA	<i>Clumping factor A</i>
<i>clfA</i>	Gene codificador do <i>Clumping factor A</i>
CLFB	<i>Clumping factor B</i>
<i>clfB</i>	Gene codificador do <i>Clumping factor B</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CNA	Proteína ligadora de colágeno
<i>cna</i>	Gene codificador da proteína ligadora de colágeno
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EBP	Proteína ligadora de elastina
<i>ebp</i>	Gene codificador da proteína ligadora de elastina
EDTA	Ácido Etileno-Diamino Tetra-Acético
ENO	Proteína ligadora de laminina
<i>eno</i>	Gene codificador da proteína ligadora de laminina
ETA	Toxina Esfoliativa A
<i>eta</i>	Gene codificador da Toxina Esfoliativa A
ETB	Toxina Esfoliativa B

<i>etb</i>	Gene codificador da Toxina Esfoliativa B
FIB	Proteína ligadora de fibrinigênio
<i>fib</i>	Gene codificador da proteína ligadora de fibrinigênio
FNBA	Proteína A ligadora de fibronectina
<i>fib</i>	Gene codificador da proteína ligadora de fibrinigênio
FNBA	Proteína A ligadora de fibronectina
<i>fnbA</i>	Gene codificador da proteína A ligadora de fibrinigênio
FNBB	Proteína B ligadora de fibronectina
<i>fnbB</i>	Gene codificador da proteína B ligadora de fibrinigênio
HLA	Hemolisina A ou Alfa-toxina
<i>hla</i>	Gene codificador da Hemolisina A
HLB	Hemolisina B ou Beta-hemolisina
<i>hlb</i>	Gene codificador da Beta-Hemolisina
HLG	Hemolisina Gama
<i>hlg</i>	Gene codificador da Gama-Hemolisina
ICAA	Proteína A de adesão intercelular
<i>icaA</i>	Gene codificador da proteína A de adesão intercelular
ICAD	Proteína D de adesão intercelular
<i>icaD</i>	Gene codificador da proteína D de adesão intercelular
KDa	Kilodalton
LUKDE	Leucocidina LukED
<i>lukED</i>	Gene codificador da Leucocidina LukED
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensível à Meticilina
ORF's	<i>Open Reading Frames</i>
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Oxacilina
pb	Pares de Base
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel por Campo Pulsado

PTs	Toxinas Pirogênicas
PTSAgs	Toxinas Pirogênicas com Atividade de Superantígenos
PVL	Leucocidina Panton-Valentine
SAGs	Superantígenos
SAPIs	Ilhas de Patogenicidade
SEA-SEE	Enterotoxinas A-E
<i>sea-see</i>	Genes codificadores das Enterotoxinas A-E
SSSS	Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica
TCR	Receptor de Células T
TSST-1	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
<i>tst</i>	Gene codificador da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
RNA	Ácido Ribonucléico
SCC <i>mec</i>	Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i>
Tris	Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1, 3-diol)

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1	Mastite.....	1
1.1.1	Mastite clínica e subclínica.....	1
1.1.2	Células somáticas.....	2
1.1.3	Mastite em bovinos leiteiros.....	2
1.1.4	Mastite em ovinos leiteiros.....	3
1.2	Colonização da glândula mamária e estabelecimento da mastite por <i>S. aureus</i>	5
1.2.1	Imunidade da glândula mamária.....	6
1.3	Estafilococos coagulase positivos.....	7
1.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à oxacilina (ORSA).....	9
1.3.3	<i>Borderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (BORSA).....	10
1.4	Locus <i>agr</i> e a regulação da expressão dos genes de virulência.....	13
1.5	Adesinas.....	14
1.6	Genes relacionados à produção de biofilme.....	18
1.7	Toxinas estafilocócicas.....	20
1.7.1	Citotoxinas.....	21
1.7.1.1	Alfa-toxina.....	21
1.7.1.2	Beta-hemolisina.....	22
1.7.1.3	Delta-hemolisina.....	24
1.7.1.4	Leucotoxinas bi-componentes.....	25
1.7.2	Toxinas com atividade de superantígenos.....	29
1.7.2.1	Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs).....	30
1.7.2.2	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1).....	33
1.7.2.3	Toxinas Esfoliativas (ETs).....	34
2.	Objetivos.....	36
3.	Material e métodos.....	37
3.1	Amostras bacterianas.....	37
3.2	Metodologia.....	37
3.2.1	Identificação fenotípica das amostras de estafilococos coagulase positivos.....	37
3.2.2	Extração do DNA cromossômico.....	38
3.2.3	Confirmação genotípica da espécie por meio da detecção do gene <i>nuc</i>	39
3.2.4	Eletroforese em gel de agarose.....	40
3.2.5	Determinação das linhagens de <i>S. aureus</i> e demais espécies coagulase positivas por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	40
3.2.6	Antibiograma.....	42
3.2.7	Confirmação da resistência à oxacilina.....	42
3.2.8	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina.....	43

3.2.9	Determinação da presença do gene <i>mecA</i>	43
3.2.10	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das estruturas gênicas relativas a fatores de virulência (toxinas).....	44
3.2.11	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes de adesinas e dos genes relacionados à produção de biofilme.....	45
3.2.12	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para tipagem do sistema <i>agr</i>	47
4.	Resultados.....	48
4.1	Identificação fenotípica das cepas de estafilococos coagulase positivos.....	48
4.2	Confirmação genotípica da espécie por meio da detecção do gene <i>nuc</i>	48
4.3	Determinação das linhagens de <i>S. aureus</i> e demais coagulase positivos por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	48
4.3.1	Amostras bovinas provenientes das fazendas do Município de Nova Odessa - SP.....	48
4.3.2	Amostras ovinas provenientes da região do agreste do Município de Garanhuns - PE.....	52
4.4	Antibiograma.....	53
4.5	Confirmação da resistência à oxacilina.....	54
4.6	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina.....	54
4.7	Determinação da presença do gene <i>mecA</i>	54
4.8	Fatores de virulência, grupo <i>agr</i> e os perfis clonais (PFGE) de <i>S. aureus</i> e outras espécies coagulase positivas provenientes de leite e óstios bovinos e de insufladores.....	55
4.8.1	Genes relacionados à adesão e formação de biofilme.....	56
4.8.2	Genes codificadores de citotoxinas e toxinas com atividade de superantígenos.....	56
4.9	Fatores de virulência e os perfis clonais (PFGE) dos demais estafilococos coagulase positivos provenientes de bovinos... ..	57
4.10	Fatores de virulência, grupo <i>agr</i> e os perfis clonais (PFGE) de <i>S. aureus</i> provenientes de ovinos.....	58
4.10.1	Genes relacionados à adesão e formação de biofilme.....	58
4.10.2	Genes codificadores de citotoxinas e toxinas com atividade de superantígenos.....	59
5.	Discussão.....	60
6.	Conclusões.....	75
7.	Referências bibliográficas.....	77
8.	Anexo.....	94

Lista de figuras

Figura 1	Perfis de restrição (PFGE) do DNA das cepas resistentes à oxacilina com utilização da enzima de restrição SMAI.....	49
Figura 2	Perfis de restrição (PFGE) do DNA das cepas provenientes de amostras de leite mastítico bovino das fazendas A e B com utilização da enzima de restrição SMAI.....	50
Figura 3	Perfis de restrição (PFGE) do DNA das cepas provenientes de amostras de leite mastítico bovino da fazenda C com utilização da enzima de restrição SMAI.....	50
Figura 4	Dendrograma das cepas coagulase positivas provenientes de bovinos e insufladores – SP.....	51
Figura 5	Dendrograma das cepas <i>S. aureus</i> provenientes de ovinos – PE.....	52
Figura 6	Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina apresentados pelas cepas BORSA.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1	Iniciadores para amplificação dos genes <i>nuc</i>	39
Tabela 2	Iniciadores para amplificação do gene <i>mecA</i>	43
Tabela 3	Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de toxinas.....	45
Tabela 4	Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de adesinas e biofilmes.....	46
Tabela 5	Iniciadores para tipagem do sistema regulatório <i>agr</i>	47
Tabela 6	Perfis de susceptibilidade dos isolados provenientes de bovinos e ovinos.....	53
Tabela 7	Distribuição dos perfis de susceptibilidade dos isolados provenientes de leite e óstios bovinos e de insufladores das fazendas do município de Nova Odessa – SP.....	53
Tabela 8	Distribuição dos genes codificadores dos fatores de virulência e grupo <i>agr</i> entre os perfis clonais (PFGE) de <i>S. aureus</i> e outras espécies coagulase positivas provenientes de leite e óstios bovinos e de insufladores....	55
Tabela 9	Distribuição dos genes codificadores dos fatores de virulência e grupo <i>agr</i> entre os perfis clonais (PFGE) de <i>S. aureus</i> provenientes de ovinos.....	58

RESUMO

A mastite é um sério problema em rebanhos leiteiros com consideráveis conseqüências econômicas. Embora alguns patógenos possam causar essa doença, *Staphylococcus aureus* é o mais importante agente etiológico em mastites bovinas e ovinas. O surgimento de linhagens resistentes a diferentes antibióticos e a presença de múltiplos fatores de virulência dificultam o tratamento das infecções causadas por essa espécie. Neste estudo, foram analisados 70 isolados de estafilococos coagulase positivos de origem animal: 52 provenientes de amostras de leite de bovinos portadores de mastite subclínica, do óstio dos tetos desses animais e de insufladores de três fazendas de exploração leiteira do Estado de São Paulo. Os outros 18 isolados foram provenientes de ovinos da região do agreste do Estado de PE, sendo 6 de casos de mastite clínica e 12 de casos de mastite subclínica. Por meio da eletroforese de campo pulsado (PFGE), pôde-se concluir que houve alta diversidade genética entre as linhagens de *S. aureus* isoladas das diferentes fontes analisadas das três fazendas do Estado de SP. No entanto, um perfil clonal comum foi identificado nas amostras de leite de duas dessas fazendas e, em uma terceira fazenda, houve a predominância de outro perfil clonal de *S. aureus* entre os isolados de leite bovino proveniente de animais portadores de mastite subclínica. Em relação às outras espécies coagulase positivas, todas originadas de óstios bovinos, foi possível determinar os perfis clonais dos isolados *S. schleiferi* spp *coagulans* e *S. delphini* e identificar a ocorrência de dois perfis distintos entre as linhagens de *S. intermedius*. Os isolados *S. aureus* provenientes de ovinos mostraram baixa diversidade genética com três perfis clonais comuns aos casos de mastite clínica e subclínica. Observou-se, em relação à combinação dos fatores de virulência de bovinos e ovinos, a ocorrência do gene *cflA* em 100% das amostras, o que indica o seu envolvimento no processo de colonização da glândula mamária, independente do hospedeiro. Dois clones bovinos destacaram-se por apresentar multiplicidade dos genes codificadores dos fatores de virulência. No entanto, houve pouca ocorrência dos genes relacionados ao processo toxigênico entre os isolados dessa espécie animal, ao contrário das cepas provenientes de ovinos. Em relação ao sistema regulador *agr*, o grupo II foi associado aos perfis clonais que apresentaram maior combinação dos genes codificadores dos fatores de virulência em isolados *S. aureus* provenientes de bovinos. Já o grupo III e *agr* negativos, aos isolados portadores de poucos desses genes. A presença do gene *eta*, pouco freqüente em linhagens animais, foi associada tanto com cepas bovinas *agr* negativas como do grupo II. Assim como nos isolados bovinos, o grupo II de *agr*, em ovinos, também foi relacionado com o perfil que apresentou maior combinação dos fatores de virulência, incluindo a associação dos genes *sec* e *tst*, mas também com perfis portadores de poucos genes de adesinas ou de nenhum gene para exotoxinas. O mesmo foi observado para o grupo I em linhagens ovinas. As cepas resistentes à oxacilina (BORSA), provenientes de isolados bovinos e de insufladores, apresentaram concentração inibitória mínima $\geq 1 - \leq 16$ µg/ml com múltipla resistência a outros antimicrobianos, mas foram negativas para o gene *mecA*, o que indica que sejam portadoras de outros mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, diferente da produção de PBP2a.

Palavras-chave: Mastite. *Staphylococcus aureus*. Virulência. Resistência.

ABSTRACT

Mastitis is a serious problem in dairy herds with considerable economic consequences. Although some pathogens may cause this disease, *Staphylococcus aureus* is the most important etiologic agent in bovine and ovine mastitis. The appearance of antibiotic resistant strains and the presence of multiple factors of virulence, make the treatment of the infections caused by these species very difficult. In this study, we analyzed 70 isolates of coagulase positive *Staphylococcus sp* of animal origin: 52 from milk samples of subclinic mastitis, bovine teats and milking ladders collected in three dairy farms from São Paulo State. The other 18 isolates were from the agreste region ovine in the State of Pernambuco, with 6 strains from cases of clinic mastitis and 12 cases of subclinic mastitis. By pulsed-field electrophoresis (PFGE), we found high genetic diversity among *S. aureus* strains from different sources analyzed in the three farms from São Paulo State. However, a common *S. aureus* cloning profile was identified in the milk samples from two farms and, the third farm, presented a predominance of different profile from two previous farms. The six coagulase positive isolates from bovine teats were identified as *S. schleiferi* spp *coagulans* (1), *S. delphini* (1) and *S. intermedius* (4). This last specie presented two distinct profiles among strains. The ovine *S. aureus* strains showed a low genetic diversity presenting three common profiles in both clinic and subclinic mastitis. The *cflA* gene occurred in 100% of the bovine and ovine strains, showing its involvement in the process of colonization of the mammary glands independent of host species. Two bovine clones was notable for presenting multiplicity of virulence factors genes. However, there was a low occurrence of toxin encoding genes among bovine strains, unlike the ovine strains. The group II *agr* regulatory systems of *S. aureus* from bovine strains was associated to a wider combination of the virulent factors encoding genes. However, group III and negative *agr* was associated to few combination genes. Although the gene *eta* is, in general, less frequent in animal strains, in this study it was associated in both *agr* negative and group II *agr* bovine strains. In ovine, *agr* group II, as in the bovine isolates, it was also related to a wider combination of virulence factors, including the association of *sec* and *tst* genes. It was also found a few genes encoding adhesion and exotoxins in this group, occurring the same in *agr* group I in ovine strains. The borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) strains isolated from bovine ostium, milk and milking apparatus line presented minimum inhibitory concentration $\geq 1 - \leq 16$ $\mu\text{g/ml}$ with multiple resistance to other antimicrobial, but they were negative to the *mecA* gene, suggesting they are carrying other resistance mechanisms to beta-lactam antibiotics, different from the production of PBP2a.

Keywords: Mastitis. *Staphylococcus aureus*. Virulence. Resistance.

1. Introdução

1.1 Mastite

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária que afeta a produção leiteira tanto em qualidade como em quantidade resultando em alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, assim como em alterações patológicas no tecido glandular (BLOOD & RADOSTITS, 1991). Essa doença é a principal afecção dos animais destinados à produção leiteira pela sua alta frequência, pelos aspectos econômicos a ela relacionados - diminuição da produção e menor rendimento dos subprodutos lácteos para a indústria de laticínios - e pelos aspectos de Saúde Pública, pois o leite pode veicular uma série de microrganismos capazes de ocasionar infecções e toxinfecções alimentares (LANGONI, 2007).

A mastite pode ter diversas causas: traumática, infecciosa, metabólica, fisiológica e alérgica. Entre essas, a infecciosa é considerada a mais importante por não ser autolimitante e por ser contagiosa, podendo disseminar-se rapidamente a outros animais do rebanho e, dessa forma, adquirir importância para a Saúde Pública pela possibilidade de veiculação de microrganismos causadores de mastite, toxinas e resíduos de antimicrobianos no leite (COSTA, 1998).

1.1.1 Mastite clínica e subclínica

De acordo com a intensidade do processo inflamatório, as mastites são classificadas em clínica e subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por modificações visíveis no leite, como a presença de grumos de fibrina ou pus e, muitas vezes, alterações na glândula mamária como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor. A mastite subclínica, ao contrário, não apresenta sintomas clínicos evidentes, tendo o leite aspecto macroscópico normal sem sinais visíveis de inflamação do úbere (BLOOD & RADOSTITS, 1991).

1.1.2 Células somáticas

As células somáticas são principalmente de dois tipos: células epiteliais e células brancas, de origem sanguínea. As células epiteliais existem normalmente no leite e são predominantes em glândulas mamárias não infectadas. Elas não têm papel imunológico, mas podem liberar substâncias chamadas citocinas que atraem células brancas. As células brancas predominantes em uma glândula normal são os macrófagos e, na glândula infectada, neutrófilos e células T. Em mastites agudas, os neutrófilos podem representar praticamente 100% das células encontradas na secreção mamária. Em casos crônicos o quadro é diferente, com as células T apresentando maior participação. As células epiteliais já estão presentes na glândula mamária e seu aparecimento é consequência do processo natural de desprendimento de células velhas. As demais têm origem sanguínea e são atraídas para o interior da glândula mamária por meio da inflamação produzida por uma infecção. O processo inflamatório produz substâncias que são quimiotáticas para os neutrófilos. Essas substâncias se ligam ao endotélio vascular nos locais próximos à infecção fazendo com que os neutrófilos que apresentam receptores para elas em suas membranas deslizem sobre a parede interna do vaso sanguíneo atravessando o endotélio transferindo-se para o leite (VAZ, 2007).

Para o diagnóstico das mastites clínicas, além de exames minuciosos da glândula mamária, utiliza-se a caneca de fundo negro ou prova de Tamis para a observação dos primeiros jatos de leite quanto à presença de grumos, coágulos de pus, sangue ou leite aguado. Já para os casos de mastite subclínica, o diagnóstico pode ser realizado a partir de métodos indiretos como a contagem das células somáticas (CCS) e o *California Mastitis Test* (CMT) (LANGONI, 2007).

1.1.3 Mastite em bovinos leiteiros

Os processos inflamatórios da glândula mamária são freqüentes e adquirem importância em bovinos por causarem grandes prejuízos à pecuária leiteira em virtude da redução da produção de leite, gastos com medicamentos e com assistência veterinária, descarte de leite contaminado após tratamento e descarte precoce de animais doentes (COSTA *et al.*, 1999). O controle da mastite infecciosa bovina baseia-se em medidas

preventivas, tratamento imediato dos casos clínicos e , nos casos subclínicos, tratamento no período seco (COSTA *et al.*, 1994).

É comum a prevalência de *Staphylococcus aureus* em mastites bovinas. As infecções causadas por esse patógeno persistem por um longo tempo, de modo que as glândulas mamárias infectadas atuam como reservatórios a partir dos quais o microrganismo pode distribuir-se a outros bovinos dentro do rebanho e, ocasionalmente, a outros rebanhos (BRAMLEY & DODD, 1984). É de amplo conhecimento que a transmissão de *S. aureus* ocorre principalmente durante a ordenha com vacas cronicamente infectadas que atuam como os principais reservatórios desse processo (ROBERSON *et al.*, 1994) e, mesmo quando medidas de controle são implementadas, novas infecções intramamárias causadas por esse microrganismo continuam a ocorrer, impossibilitando sua erradicação (ZADOKS *et al.*, 2002). Embora as linhas de ordenha mecânica sejam importantes fontes nesse processo de transmissão de *S. aureus* em rebanhos leiteiros - uma vez que esses equipamentos podem estar contaminados com a bactéria proveniente da pele do teto ou do leite (SANTOS *et al.*, 2003; FOX *et al.*, 1991) - existem, ainda, outras fontes de *S. aureus* como a ração, a pele bovina e outros animais (ROBERSON *et al.*, 1994).

1.1.4 Mastite em ovinos leiteiros

A mastite dos pequenos ruminantes tem como origem predominante as infecções bacterianas. As ovelhas apresentam com maior frequência que fêmeas de outras espécies o quadro mais grave de mastite, a mastite flegmonosa, cuja evolução tende à gangrena e, portanto, é descrita por muitos autores como mastite gangrenosa (SMITH, 1994; ANDERSON *et al.*, 2005), podendo se manifestar de forma aguda e subaguda. *Staphylococcus aureus* é um agente comum desse tipo de mastite, podendo o mesmo hospedeiro apresentar quadros distintos frente ao patógeno e responder de maneira diferente em cada glândula mamária (LIBERA *et al.*, 2007). No entanto, essa independência entre as mamas, quando infectadas pelo mesmo agente, torna-se relativa (SANTOS *et al.*, 2007). Foi observado nesse estudo de indução experimental de mastite em ovinos que a mama contralateral à inoculação, a mama controle, também diminuiu a produção de leite apresentando alterações em sua composição.

Os animais acometidos pela mastite gangrenosa aguda apresentam inicialmente um quadro sistêmico com febre seguida de hipotermia, inapetência, desidratação, congestão da mucosa ocular, taquicardia, taquipnéia, hipomotilidade à atonia ruminal, fezes diarréicas, perda de peso e até morte do animal. No início, a pele da glândula mamária se apresenta eritematosa, com aumento de temperatura e o edema pode ser local ou mesmo atingir a região abdominal ou xifóidea para, posteriormente, tornar-se cianótica (MENZIES & RAMANOON, 2001; ANDERSON *et al.*, 2005). A patogenia da afecção em ovinos pode levar à perda da mama e até mesmo à morte do animal (RADOSTITIS *et al.*, 2002; PUGH, 2005).

CONTRERAS *et al.* (2007), em um trabalho de revisão, descreveram a frequência dos agentes causadores de mastite em pequenos ruminantes e destacaram *Staphylococcus spp* como mais freqüente. Mesmo sendo mais comum a presença de estafilococos coagulase negativos, é preocupante a ocorrência de *S. aureus*, pois esse microrganismo pode causar mastite gangrenosa devido à produção de toxinas específicas responsáveis por lesões graves na mama, como a alfa-toxina que produz necrose nos alvéolos (SANTOS *et al.*, 2007). *S. aureus* é bastante comum na pele e nas mucosas de ovelhas, sendo as infecções relacionadas a esta bactéria, muitas vezes, atribuídas à falta de higiene durante a ordenha, à sucção excessiva do cordeiro ou ao contato com pastagens contaminadas (ANDERSON *et al.*, 2005). As toxinas de *S. aureus* podem provocar trombose vascular, gangrena e desprendimento de tecidos subjacentes. Geralmente, a infecção causa um processo inflamatório local que altera o fluxo sanguíneo mamário gerando uma diminuição da produção de leite e alterações na coloração do úbere decorrentes da isquemia. (SMITH, 1994; ANDERSON *et al.*, 2005). Outro fator que contribui com a invasão bacteriana e inibição da resposta imune do hospedeiro é a grande variedade na produção de hemolisinas por *S. aureus* (SILVA *et al.*, 2005).

Há prejuízos qualitativos e quantitativos à produção de leite com conseqüências tanto para animais especializados para esta função, quanto para os não especializados (CLEMENTS *et al.*, 2003; BLAGITZ, 2007). Como conseqüência da presença de *S. aureus*, o leite consumido pelo homem pode apresentar toxinas e/ou a própria bactéria com potencial zoonótico (CONTRERAS *et al.*, 2007).

1.2 Colonização da glândula mamária e estabelecimento da mastite por *S. aureus*

A aderência de *S. aureus* ao canal do teto do úbere é considerada a primeira etapa da infecção da glândula mamária (SUTRA & POUTREL, 1994). No período entre ordenhas, esse canal encontra-se normalmente fechado por um anel muscular bloqueado por um tampão de queratina derivada das células da parede do próprio canal. Essa queratina é encontrada tanto na cisterna do teto como no ducto papilar tendo a função de vedação deste. A ação da queratina apresenta um efeito relativo conforme o lipídio associado a essa proteína. Estudos eletroforéticos mostraram que frações que migraram para o anodo tinham maior capacidade de destruir colônias de *S. aureus*, enquanto frações catódicas foram apenas bacteriostáticas (SENFT *et al.*, 1990).

A ordenha ou o ato de mamar remove o tampão de queratina tornando flácido o esfíncter e mais vulnerável a infecções o canal do teto. Após o término da ordenha, a musculatura retoma seu tônus e o tampão é novamente formado. No entanto, alguns fatores podem impedir este retorno à normalidade: sequência de ordenhas realizadas com ordenhadeira com excesso de vácuo ou com pulsação excessivamente rápida, produtos químicos como desinfetantes com ação cáustica, baixa temperatura, dentre outros. Consequentemente, podem provocar uma hiperqueratose na extremidade do canal do teto, o que dificulta o seu fechamento. Esta lesão caracteriza-se por um anel esbranquiçado e ligeiramente elevado ao redor do orifício, podendo haver necrose da abertura, com rachaduras que se irradiam do ponto inicial do tecido necrosado e que podem servir de abrigo para os agentes patogênicos (VAZ, 2007).

Por outro lado, *S. aureus* tem a capacidade de produzir um amplo número de fatores de virulência (FITZGERALD *et al.*, 2000). Alguns podem ser mais importantes que outros no desenvolvimento de diferentes doenças ou em diferentes estágios da patogênese de determinadas infecções (KALOREY *et al.*, 2007). Esse patógeno pode apresentar adesinas específicas que se ligam a uma diversidade de proteínas hospedeiras, principalmente na matriz extracelular do hospedeiro, como colágeno, fibrinogênio e fibronectina (NOVICK *et al.*, 2000). A interação com os tecidos do hospedeiro representa um papel crítico no estabelecimento da infecção da mastite por *S. aureus* (KERRO DEGO *et al.*, 2002).

1.2.1 Imunidade da glândula mamária

Uma vez que o agente patogênico atravessa o canal do teto e alcança a cisterna mamária, passam a atuar, especialmente, os fatores solúveis e as células fagocíticas da imunidade inespecífica. A enzima lactoperoxidase, um dos fatores solúveis, é uma substância que ajuda na prevenção e controle de infecções mastíticas, mas, ao contrário de seu efeito bactericida em Gram-negativos, é bacteriostática para Gram-positivos (KUMAR & BHATIA, 1994).

O complemento é considerado um fator quimiotático para o recrutamento de células fagocíticas para o local da infecção. No entanto, um de seus componentes, o C5a, é pouco estimulado por *Staphylococcus sp* e o C3, apesar de ser eficiente em opsonizar isolados de *S. aureus* de casos de mastites bovinas, não promove alterações significativas na fagocitose das bactérias, o que sugere que sua ligação com componentes de superfície de *S. aureus* não contribui para a defesa da glândula mamária bovina (KEHRLI, 2001 citado por CARVALHO, 2005).

Com relação às citocinas IL-8 e TNF- α , ao contrário do que ocorre em *E. coli*, sua produção não é observada em infecções causadas por *S. aureus*, o que explica em parte a maior capacidade dessa espécie em estabelecer infecções crônicas (BANNERMAN *et al.*, 2004). Já IL-2 e G-CSF são importantes para o controle de infecções causadas por *S. aureus*, pois em bovinos aumentam o número de linfócitos e a produção de anticorpos (NICKERSON, 1991). Citocinas da família dos fatores estimulantes de colônias (CSF) atuam na regulação positiva da resposta imune, aumentando em quantidade e qualidade os leucócitos recrutados para o sítio inflamatório, mas, apesar da contagem de células somáticas (CCS) de bovinos tratados com G-CSF ter aumentado no estudo de SORDILLO & DALEY (1995), não foi observada nenhuma relação entre esse aumento com as unidades formadoras de colônia de *S. aureus*.

Um recente estudo (BOYSSO *et al.*, 2008) mostrou que o tratamento de células endoteliais bovinas com TNF- α ou IL-1 β aumentou a capacidade dessas células para eliminar tanto *S. aureus* como *S. epidermidis*, sendo este patógeno oportunista mais sensível ao mecanismo de eliminação das células endoteliais, enquanto aquele foi capaz de se multiplicar no citoplasma dessas células. Observou-se, também, que linhagens

citotóxicas de *S. aureus* escaparam da atuação dos lisossomos, ao contrário de linhagens não citotóxicas, eliminadas por vias de degradação lisossomal.

Outro fator solúvel importante é a lactoferrina. Um aumento na produção dessa substância pelas células epiteliais glandulares é relacionado com a exposição dessas células a *E. coli* e *S. aureus*. De qualquer forma, a quantidade de lactoferrina em leite de vacas é bem inferior à encontrada em leite de búfalas, por exemplo (WELLNITZ & KERR, 2004).

As defesas celulares inespecíficas da glândula mamária normal são representadas pelos macrófagos e células fagocíticas que, como as demais células brancas, são capazes de reconhecer estruturas bastante conservadas na superfície das bactérias dentro de uma classe de patógenos. No entanto, a resposta celular na glândula mamária é muito inferior em eficácia em relação à resposta observada, por exemplo, no sangue ou nos demais tecidos do organismo. Vários fatores parecem contribuir para isto, mas o mais aceito é que no leite as células esgotam sua capacidade fagocítica ao englobarem micelas de caseína e glóbulos de gordura (VAZ, 2007).

Em relação à imunidade específica, sabe-se que, na glândula mamária, a quantidade de células produtoras de anticorpos é reduzida. As imunoglobulinas presentes no leite são do tipo IgG1, IgG2, IgA e IgM, esta última em reduzidas concentrações. Em bovinos, *Staphylococcus aureus* induz uma resposta intensa de IgG1 e IgA durante toda a lactação (BUTLER, 1999). Embora a concentração de IgG1 seja alta tanto no sangue como no leite, em ruminantes, essa imunoglobulina não é a mais eficaz, pois, como IgA, não atua como opsonina em função dos neutrófilos desses animais não possuírem receptores específicos, o que dificulta a opsonização dos antígenos bacterianos. Os receptores presentes nos neutrófilos de ruminantes são específicos para IgG2, que normalmente ocorre em baixas concentrações (VAZ, 2007).

1.3 Estafilococos coagulase positivos

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente encontrados na pele, membranas e mucosas de aves e mamíferos (KLOOS & BANNERMAN, 1999). O gênero *Staphylococcus* foi proposto em 1884 por Rosenbach e inserido dentro da família

Micrococaceae. Recentemente, estudos de biologia molecular, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S promoveram a inclusão do gênero *Staphylococcus* em uma nova família, a Staphylococaceae (GARRITY, 2006). Atualmente, já são 41 espécies descritas dentro do gênero (BANNERMAN, 2003; EUZÉBY, 2007), sendo a maioria negativa para a presença da coagulase. A síntese dessa enzima - propriedade que caracteriza e identifica as outras espécies do gênero - é restrita ao *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN, 2003).

Em amostras clínicas humanas, a detecção da coagulase é suficiente para a identificação e distinção de *S. aureus* dos estafilococos coagulase negativos. No entanto, esse procedimento fenotípico não diferencia *S. aureus* das outras espécies coagulase positivas do gênero. Para amostras veterinárias, essa distinção é importante para evitar falsas identificações de *S. aureus*, uma vez que *S. intermedius* e *S. hyicus*, também coagulase positivos, são freqüentemente isolados de várias espécies animais.

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás, não fotossintéticos, não esporulados, catalase positivos e capazes de crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento de 7 a 48° C com ótima de 37° C e pH na faixa de 4 a 10, com ótimo de 6 a 7 (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus pode causar uma gama de infecções em gado e é o mais comum agente etiológico de mastite bovina contagiosa, causando significativas perdas na indústria leiteira (SEARS & MCCARTHY, 2003). É também o microrganismo patogênico mais freqüentemente isolado no leite cru (ZECCONI & HAHN, 2000). Destaca-se como microrganismo causador de mastite contagiosa pela maior ocorrência nos rebanhos mundiais e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). Infecções intramamárias por *S. aureus* geralmente respondem mal a tratamentos antimicrobianos e se tornam crônicas (SOL *et al.*, 2000).

S. aureus causa uma variedade de doenças em múltiplas espécies de hospedeiros incluindo humanos e animais (HERRON-OLSON *et al.*, 2007). No entanto, estudos têm mostrado um limitado número de genótipos associados à persistência da mastite em bovinos leiteiros ressaltando a idéia de que certos genótipos de *S. aureus* são particularmente bem sucedidos como causadores dessa doença (KAPUR *et al.*, 1995; REINOSO *et al.*, 2004; HAVERI *et al.*, 2005).

1.3.2 *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (ORSA)

Logo após a criação da meticilina, beta-lactâmico sintético resistente à ação das beta-lactamases, foi descrito por JEVONS (1961) o primeiro caso de resistência a esse antibiótico em *S. aureus*. Os estafilococos resistentes à oxacilina, antibiótico análogo à meticilina, são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos atualmente disponíveis, dificultando o tratamento contra infecções estafilocócicas (CHAMBERS, 1997).

O mecanismo que confere resistência à oxacilina e aos demais antibióticos beta-lactâmicos é caracterizado pela expressão de uma proteína ligadora de penicilina (*penicillin binding protein*) modificada - a PBP2'ou PBP2a - extremamente funcional, mas com afinidade reduzida por beta-lactâmicos, conferindo à bactéria a capacidade de sintetizar a parede celular mesmo na presença de meticilina. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, carregado em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). A estrutura desse consiste em dois componentes genéticos. O primeiro é o gene *mec* composto pela IS431, o gene *mecA* e seus reguladores, um operon com um repressor (*mecI*) e um transdutor de sinal (*mecRI*), esses dois últimos, elementos regulatórios transcritos de forma divergente. Os genes *ccr*, responsáveis pela transposição do SCC*mec*, são o segundo componente desse elemento genético móvel. (ITO *et al.*, 2003).

Recentemente, a transmissão de uma linhagem MRSA entre vacas e humanos, a CC1, previamente descrita nesses, foi relatada por JUHÁSZ-KASZANYITZKY *et al* (2007). Outros três casos envolvendo a linhagem ST188 e oito casos envolvendo a CC97 - relativamente incomuns em humanos, mas que ainda não tinham sido relatadas em animais - colocam em questão a idéia de que somente isolados animais causam doenças animais e que isolados humanos são restritos a essa espécie e apenas causam doenças humanas (SEARS & MCCARTHY, 2003).

Linhagens MRSA também são uma preocupação em outras espécies, como cães, cavalos e porcos, que freqüentam as fazendas leiteiras (LOEFFLER *et al.*, 2005; WEESE *et al.*, 2005; HUIJSDENS *et al.*, 2006), pois esses animais podem atuar como reservatórios de isolados humanos podendo promover a evolução de linhagens resistentes e patogênicas. A disseminação de resistência entre linhagens *S. aureus* é facilitada pelo fato dos genes codificadores de tais mecanismos serem tipicamente codificados por elementos genéticos móveis, como os cassetes cromossômicos estafilocócicos (SCC*mec*), plasmídios e transposons (LINDSAY & HOLDEN, 2006).

1.3.3 Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA)

As linhagens BORSA são caracterizadas por apresentarem uma concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina próxima ao *breakpoint* de resistência (CLSI, 2007). São isolados *mecA* negativos e apresentam baixo nível de resistência à oxacilina com CIMs entre 1-8 µg/ml (BARG *et al.*, 1991). Essa redução de susceptibilidade pode resultar de mecanismos intrínsecos relacionados à capacidade de ligação alterada das proteínas ligadoras de penicilinas ou de mecanismos extrínsecos que dependem da atividade das beta-lactamases (MASSIDDA *et al.*, 2006).

A natureza não intrínseca dessa redução de sensibilidade foi confirmada pela inabilidade de detectar a PBP2a em linhagens BORSA por ensaios convencionais de PBP (MONTANARI *et al.*, 1990) ou por hibridização com sondas específicas para o gene *mecA* que codifica a PBP2a (CHAMBERS *et al.*, 1989; KNAPP *et al.*, 1996). Segundo a descrição inicial de MCDUGAL & THORNSBERRY (1986), essas linhagens produzem grandes quantidades de beta-lactamases e são completamente sensíveis às penicilinas resistentes às penicilinases (PRPs) na presença de inibidores de beta-lactamases. Não são heteroresistentes e nem apresentam múltipla resistência. Segundo esses autores, as beta-lactamases, quando produzidas em excesso, apresentam uma atividade parcial de hidrólise da meticilina e PRPs relacionadas.

Outra explicação foi proposta por MASSIDDA *et al.* (1992; 1996). Em adição às clássicas penicilinases, uma beta-lactamase seria capaz de hidrolizar lentamente as PRPs e outros substratos não afetados pelas penicilinases. Essa atividade de meticilinase foi

demonstrada primeiramente por esses autores e, posteriormente, por GAL, Z. *et al* (2001) por espectrofotometria. De qualquer forma, o suposto gene codificador dessa enzima ainda não foi identificado. A atividade enzimática dessa beta-lactamase - ligada à membrana que hidrolisa a meticilina e a oxacilina eficientemente - não é causada pela penicilinase codificada pelo gene *blaZ*, uma vez que a clonagem desse gene de uma linhagem *borderline* em um vetor e sua transferência para uma linhagem de *E. coli* não tornou esse hospedeiro capaz de hidrolisar penicilinas resistentes às penicilinas (MASSIDDA *et al.*, 1994). Isolados *Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus* (BORSA) são hiperprodutores de beta-lactamases, pertencem quase que exclusivamente ao grupo fágico V do complexo 94/96 e possuem um plasmídeo que codifica uma penicilinase estafilocócica do tipo A, resultando em excesso de produção de beta-lactamase (MASSIDDA *et al.*, 1996; CHAMBERS *et al.*, 1997).

O plasmídeo, denominado originalmente de pBW15, foi descrito por conter quatro fragmentos *HindIII* (de 7.0, 5.3, 3.5 e 1.4 kb) com um tamanho total estimado em 17.2 kb. Experimentos de hibridização mostraram que o gene *blaZ* estava contido no maior desses quatro fragmentos e uma transferência desse plasmídeo para linhagens *S. aureus* sensíveis conferiu resistência à penicilina (BARG & MCMURRAY, 1990; MASSIDDA *et al.*, 1994). Em outro estudo (MASSIDDA *et al.*, 2006), o pBORa53, um plasmídeo parecido com o pBW15 derivado de uma linhagem BORSA já estudada, foi caracterizado e sequenciado e revelou a presença do complexo do gene *bla* - constituído por *blaZ*, *blaR1* e *blaI* – e de dois determinantes de resistência ao cádmio, *cadD* e *cadX*, codificadores de um novo tipo de resistência a esse elemento químico. O plasmídeo pBORa53, de tamanho 17,334 pb, contém 14 ORFs e uma cópia completa do transposon Tn552, o qual compreende os três genes do complexo *bla*. Entre as outras 11 ORFs identificadas estão os dois determinantes de resistência ao cádmio.

Plasmídios como o pBW15 pertencem a um grupo de elementos genéticos que carregam determinantes de resistência a metais pesados como o cádmio, mercúrio e arsênio e um transposon Tn552 ou derivados desse, que codificam penicilinas. A caracterização do pBORa53 indica que plasmídios do grupo pBW15 têm uma estreita relação com linhagens BORSA, pois diferem de todos os outros plasmídios relacionados à produção de beta-lactamases. O sequenciamento do indutor *BlaR1* de pBORa53 mostrou 99% de

identidade com seu correspondente homólogo do Tn552 (ROWLAND & DYKE, 1990), no entanto, ainda não foi esclarecido se as substituições encontradas em *BlaRI* afetam a produção de beta-lactamase.

Com a intenção de melhor caracterizar linhagens BORSAs já descritas como produtoras de beta-lactamase e comparar sua produção de metilicilina com outras linhagens não *borderline*, KESERU *et al.* (2005) encontraram duas enzimas de pesos moleculares 30 e 13 kDa, ambas presentes em frações de membranas de linhagens BORSA e MRSA. A enzima de 30 kDa parecia ser a responsável pela hidrólise da oxacilina, pois não foi encontrada nas membranas das linhagens sensíveis à metilicina. Essas linhagens também não produziram nenhuma beta-lactamase extracelular, ao contrário das linhagens BORSA e MRSA que secretaram uma enzima com peso molecular correspondente à enzima de 30 kDa ligada à membrana. Além disso, quando linhagens BORSAs foram cultivadas na presença de 50 µg/ml de globomicina, substância que inibe o processamento das proteínas de membrana, a proteína de 30 kDa não apareceu em eletroforese e no ensaio houve uma diminuição da atividade de hidrólise da oxacilina, o que sugere uma relação entre essa metilicilina e o fenótipo BORSA. Essa metilicilina foi produzida constitutivamente pelas linhagens BORSAs examinadas nesse estudo e sua produção pôde ser aumentada por adição de 0.5 µg/ml de metilicina nas culturas.

Além da nova metilicilina e da presença do plasmídeo (KESERU *et al.*, 2005 e MASSIDDA *et al.*, 2006), outros mecanismos podem explicar o fenótipo BORSA. Foram notadas diferentes substituições na PBP2 de *S. aureus* em um estudo com a linhagem BORSA CDC-6 (HACKBARTH *et al.*, 1995). Substituições espontâneas nessa proteína ligadora de penicilina podem ser induzidas por seleção no crescimento com ceftizoxima (LESKI & TOMASZ, 2005).

PBP2 é uma proteína de 727 aminoácidos, essencial para a construção do peptidoglicano e que pode ser inibida por beta-lactâmicos. Apresenta um domínio N-terminal transglicosilase que compreende os aminoácidos 76-244 e um domínio C-terminal transpeptidase com os aminoácidos 360-653 (PINHO *et al.*, 2001a, b). Substituições nesses domínios em linhagens BORSA, e não em MSSA e MRSA, poderiam explicar tal fenótipo.

Em um estudo (NADARAJAH *et al.*, 2006), o isolado bovino MSSA RF122 (HERRON-OLSON *et al.*; GenBank accession nº NC_007622) apresentou apenas duas

substituições na PBP2: Pro285 → Ala e Thr43 → Val. Em linhagens sensíveis como essa, as substituições foram incomuns e não promoveram resistência. Neste mesmo estudo, o gene *pbp2* de linhagens que perderam o *blaZ* foram clonados em pRN5548 para expressão em *S. aureus* e observou-se que apenas esse gene é suficiente para conferir o fenótipo BORSA e que diferentes substituições na PBP2 podem promover esse fenótipo.

1.4 Locus *agr* e a regulação da expressão dos genes de virulência

Os fatores de virulência não são expressos constantemente, é vantajoso para a bactéria coordenar o que será produzido e quando. A expressão da maioria dos genes de virulência de *S. aureus* é controlada por um sistema de regulação global composto por dois operons divergentes, denominado *agr* (*accessory gene regulator*). A atuação do sistema *agr* está associada ao *quorum-sensing* em *S. aureus*, mecanismo pelo qual uma bactéria consegue “perceber” a densidade celular do meio em que se encontra. O efeito *quorum-sensing* é conseguido pela bactéria devido a uma comunicação entre as células presentes no mesmo ambiente por meio de moléculas secretadas por uma célula e detectadas por outras, similar ao sistema endócrino em animais (MCCULLOCH, 2006).

O locus *agr* é composto por dois operons divergentes, controlados pelos promotores P2 e P3. O operon que tem o P2 como promotor contém quatro genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* e *argD*. O operon com o promotor P3 contém apenas o gene da δ -hemolisina (*hld*) e o gene para um RNA mensageiro denominado RNAIII, efetor do sistema *agr*. Os produtos dos genes *agrB* e *agrD*, respectivamente as proteínas AgrB e AgrD, se juntam formando um peptídeo auto-indutor (AIP). AgrC é uma proteína transmembrânica com receptor para AIP. Quando AIP liga-se à AgrC, este fosforila a proteína AgrA, ativando-a. A proteína AgrA fosforilada age como indutor dos promotores P2 e P3. O produto da transcrição do operon P3 é um RNA denominado RNAIII, um mRNA que funciona como indutor ou repressor da transcrição de genes acessórios. Este mRNA nunca chega a ser traduzido a proteína, pois ele mesmo é o efetor à resposta do *agr* (YARWOOD & SCHLIEVERT, 2003).

Um polimorfismo na sequência dos genes deste sistema regulador, que correspondem ao peptídeo auto-indutor e seu receptor transmembrânico correspondente, divide as linhagens de *S. aureus* em quatro grupos alélicos específicos denominados *agr* I, II, III e IV, descritos por Ji *et al* (1997). O AIP produzido por um grupo pode interferir na

expressão do *agr* dos outros grupos, promovendo interferência bacteriana. O gene da δ -hemolisina, *hld*, está contido dentro do produto transcricional RNAIII, todavia, o RNAIII logo se enovela em uma conformação não traduzível. Este RNAIII enovelado tem uma ação indutora sobre certos genes acessórios. Para que o gene da δ -hemolisina seja traduzido, o RNAIII se desenovela com o auxílio de algum co-fator ainda desconhecido e então retorna à sua conformação original. O produto final da cascata do locus *agr* é o RNAIII. Um locus *agr* funcional resulta, por meio dessa molécula, em um aumento da transcrição dos genes codificadores dos fatores de virulência (YARWOOD & SCHLIEVERT, 2003).

Os efeitos do RNAIII sobre certos genes, como os envolvidos com a adesão bacteriana, ainda não são totalmente esclarecidos. No entanto, segundo SAKOULAS *et al* (2002) o RNAIII inibiria a transcrição de genes que expressam proteínas envolvidas com a adesão da bactéria. Cepas com uma mutação que leva à disfunção do locus *agr* apresentam maior facilidade de adesão ao poliestireno e à produção de biofilme (VOUNG *et al.*, 2000).

A expressão do sistema *agr* contribui com a patogênese estafilocócica em diferentes momentos da infecção. Considerando a curva de crescimento de *S. aureus*, observa-se - com exceção da enterotoxina A que é produzida durante todas as fases de crescimento - que todas as exoproteínas são secretadas na fase pós-exponencial. Por outro lado, as proteínas associadas à membrana como a proteína A e as adesinas são produzidas durante a fase exponencial e não na fase pós-exponencial (BOHACH *et al.*, 1997). O locus *agr* tem uma atuação positiva na regulação da expressão dos genes de exoproteínas e negativa na síntese de adesinas de superfície celular durante a transição da fase exponencial para pós-exponencial (CHEUNG *et al.*, 2004).

1.5 Adesinas

A fibronectina - alvo para a adesina codificada pelo gene *fnbA* de *S. aureus* - é uma proteína encontrada em toda parte no hospedeiro presente em forma solúvel no sangue e na forma fibrilar nas matrizes celulares (PATTI *et al.*, 1994). A proteína ligadora de fibronectina (FnBP) é um exemplo dos determinantes bacterianos que apresentam múltiplas funções. Nesse caso, a proteína também é uma adesina para o fibrinogênio (WANN *et al.*, 2000). As FnBPs têm sido propostas como fatores de virulência envolvidos com mastite

bovina (SUTRA & POUTREL, 1994). Pelo menos um dos genes codificadores dessa proteína é encontrado na maioria das linhagens de *S. aureus* (SMELTZER *et al.*, 1997).

Por considerar a falta de dados que confirmem a importância das proteínas ligadoras de fibronectina na colonização da glândula mamária, BROUILLETTE *et al* (2003) desenvolveram um estudo que demonstrou uma redução de 30% na capacidade de aderir às células epiteliais mamárias bovinas em *S. aureus* DU5883, linhagem que perdeu as FnBPs, quando comparada ao tipo selvagem 8325-4. Essa linhagem de *S. aureus* que perdeu as FnBPs esteve presente em baixa proporção - em relação ao total composto por ela e o tipo selvagem - em momentos do experimento em que a pressão era menor que a da lactação, bem como na ausência dessa pressão. A baixa porcentagem de DU5883 encontrada em tecidos mamários confirmou, também, a diminuição da capacidade desse mutante em colonizar as glândulas sob uma pressão menor que a da lactação (BROUILLETTE *et al.*, 2003). O experimento mostrou que as FnBPs de *S. aureus* conferem uma vantagem seletiva para a bactéria *in vivo*, pois são fatores de virulência para a colonização de glândulas mamárias em condições anteriores às do fluxo de leite. A capacidade de aderência às células, conferida por FnBPs, previne a eliminação de *S. aureus* durante a lactação.

Em oposição a outros estudos de aderência *in vitro*, este forneceu condições que melhor representam um meio natural encontrado durante uma infecção, como a presença de soro e leite e a incorporação de alguns fatores físicos semelhantes aos da lactação. Dessa forma, considerou a complexidade da inflamação e reações imunes que ocorrem durante o processo infeccioso da doença.

Os resultados de BROUILLETTE *et al* (2003) estão de acordo com alguns estudos anteriores. Um deles (DZIEWANOWSKA *et al.*, 1999), utilizando a mesma linhagem selvagem de *S. aureus* 8325-4, mostrou que um mutante isogênico com ausência dos genes *fnbps* teve uma diminuição de 40% na capacidade de aderir às células epiteliais de glândulas mamárias bovinas quando comparado à linhagem selvagem. Outro estudo (REDY & ROSS, 2001) também mostrou que as FnBPs ajudam na aderência de *S. aureus* às células endoteliais da aorta bovina em condições que antecedem às do fluxo. A capacidade de adesão e permanência da linhagem *S. aureus* 8325-4 - em relação ao mutante que perdeu as FnBPs - foi observada somente quando a circulação do tampão usado no experimento foi interrompida por trinta minutos favorecendo a colonização da bactéria

antes do recomeço do fluxo. Durante a circulação contínua, nenhuma aderência foi observada nas duas linhagens. Considerando que o fluxo de leite também não é contínuo durante a lactação, as observações feitas nesse estudo sugerem que a presença de FnBPs confere à bactéria a oportunidade de adesão entre as ordenhas.

Por outro lado, a importância das FnBPs foi questionada por FLOCK *et al* (1996) em um estudo no qual observou capacidades equivalentes em *S. aureus* 8325-4 e seu mutante isogênico com deleções de *fnbA* e *fnbB* para a colonização de válvulas danificadas. Esse experimento apresentou uma situação diferente da lactação, mas aponta para uma questão que pode ser comum nos processos de colonização de *S. aureus*, o fato de outra adesina poder compensar *in vivo* a ausência de FnBP. Um estudo já mostrou que a falta dessa proteína acentua a virulência de *S. aureus* em modelos de ratos com pneumonia (MC ELROY *et al.*, 2002). No mesmo ano do estudo de FLOCK *et al* foi descoberto que a inativação do gene *fnb* ocorre devido a uma inserção de um transposon, o Tn918, entre o gene *fnb* e seu promotor (GREENE *et al.*, 1996).

Muitos estudos, como os apresentados até o momento, investigam o papel individual dos fatores relacionados à virulência por meio de clássicas inativações de genes, mas podem gerar resultados inconclusivos considerando a multiplicidade dos fatores patogênicos que são expressos por *S. aureus*. Como exemplo desse complexo contexto, QUE *et al* (2001) propõem que as quatro maiores adesinas de superfície, *clumping factor A* (ClfA), *clumping factor B* (ClfB) e as proteínas ligadoras de fibronectina A e B demonstram alta afinidade na ligação com seus alvos específicos *in vitro*, porém limitada relevância em experimentos *in vivo*. Os autores sugerem que uma explicação possível para o paradoxo *in vitro/in vivo* seria a presença de fatores adicionais nos mutantes portadores de genes inativados que poderiam complementar, no processo da doença, a função das adesinas perdidas. Essa hipótese poderia explicar os resultados de MOREILLON *et al* (1995) em um estudo onde foi observado que mutantes com o gene *clfA* deletado mostraram diminuição do potencial infeccioso quando comparados com o progenitor positivo para esse gene, porém com essa diferença registrada somente para um número reduzido de bactérias. Outro estudo (STUTZMANN *et al.*, 2001) que sugere um limitado envolvimento de *clfA* no processo de colonização mostrou que houve um aumento de

aderência bacteriana ao se transferir o gene *clfA* para um hospedeiro, *Streptococcus gordonii*, mas a diferença entre esses organismos modificados e os que tiveram o gene transferido foi insignificante. Resultados como esses colocam em questão o uso dessa adesina como alvo primário em novas estratégias de tratamento antiestafilocócico (QUE *et al.*, 2001) e, embora tenham sido obtidos de experimentos com modelos de endocardite, evidenciam a dificuldade de tornar precisa a importância de algumas adesinas no processo de colonização utilizando-se mutantes específicos para determinados genes, excluindo os múltiplos fatores de *S. aureus*.

QUE *et al* (2001) reavaliaram, ainda, o papel do *clumping factor* e das proteínas ligadoras de fibronectina de *S. aureus*. Esse estudo utilizou, como hospedeiro para os genes *clfA* e *fnbA*, o *Lactococcus lactis*, um recombinante muito menos capaz de induzir endocardites em ratos que *Staphylococcus* e *Streptococcus*. O sistema adotado na pesquisa permitiu a expressão de somente uma adesina na superfície do recombinante. Quando expressava ClfA, *Lactococcus lactis* adquiria a capacidade de aderir ao fibrinogênio e induzir endocardite em níveis similares aos expressos por *S. aureus*, o que levou os autores a identificar ClfA como uma adesina crítica capaz de mediar infecção endovascular. Assim como para ClfA, o recombinante revelou o efeito completo da proteína ligadora de fibronectina, uma vez que nenhuma adesina adicional estava presente em *Lactococcus lactis*. Esses resultados atribuem um papel crítico a essas adesinas em infecções endovasculares, reforçando os experimentos originais de KUYPERS & PROCTOR (1989) em um estudo no qual utilizaram um isolado *S. aureus*, 879R4S, que carregava um único gene *fnb* e um mutante inativado para esse mesmo gene. Foi observado que o mutante teve menor capacidade de aderência do que a outra linhagem.

Um estudo recente (SUNG *et al.*, 2008) mostrou que muitos genes conservados em isolados humanos como *fnbA* e *fnbB* apresentaram variações ou desapareceram em uma ou mais linhagens animais e, quando encontrados, não possuíam os quatro tipos de regiões correspondentes às quatro linhagens humanas seqüenciadas nesse trabalho, sugerindo que os isolados animais possuem regiões específicas próprias. Essas observações estão de acordo com os dados do projeto de seqüenciamento da RF122 (HERRON-OLSON *et al.*, 2007), linhagem animal que apresentou uma única região com variações nos genes *fnbA* e *fnbB*. Nesse estudo, HERRON-OLSON *et al* (2007) utilizaram a linhagem ET3-1, que

representa o clone mais comum de *S. aureus* isolado de casos de mastite bovina do mundo todo, e mostraram por meio de seqüenciamentos que muitos genes - envolvidos com a colonização do hospedeiro, produção de toxinas, regulação dos genes, metabolismo do ferro e resistência a antibióticos - apresentam uma alta relação entre substituições sinônimas e não sinônimas (*dn:ds*) se comparados aos genes dos isolados associados a humanos - o que talvez explique as variações entre as linhagens com relação a esses genes. O estudo descobriu também que o gene *clfA* é um pseudogene na linhagem ET3-1.

Quanto à frequência do gene *cna* - codificador da proteína ligadora de colágeno - em isolados animais, SMELTZER *et al* (1997) relataram que linhagens *S. aureus* geralmente não possuem esse gene. Em outro estudo mais recente (REINOSO *et al.*, 2008), a detecção desse gene pôde ser efetuada somente para cinco linhagens humanas em um estudo de caracterização e comparação genotípica de isolados *S. aureus* de amostras humanas, mastite bovina subclínica e de alimentos. Poucos são os dados na literatura sobre essa adesina e sua atuação no processo de colonização da glândula mamária.

1.6 Genes relacionados à produção de biofilme

A formação de biofilme ocorre por meio de sucessivas etapas. A ligação inicial da bactéria a uma superfície sólida resulta em subsequente proliferação e acúmulo de grupos de células em multicamadas e formação final de um reservatório bacteriano (STOODLEY *et al.*, 2002). Esse reservatório de bactérias estrategicamente posicionadas dificulta a penetração e difusão de antimicrobianos e dos elementos de defesa do organismo (TRABULSI, 2004).

Um grupo de proteínas de superfície está emergindo como um importante elemento no processo de formação de biofilme de diversas espécies bacterianas. O primeiro membro desse grupo de proteínas foi identificado em um isolado *S. aureus* de mastite bovina como uma proteína essencial para a formação de biofilme (CUCARELLA *et al.*, 2001) e foi denominado Bap (*biofilm-associated protein*). Esp, LapA e BapA, ao lado de Bap, são as outras proteínas desse grupo melhor caracterizadas até o momento.

A composição da matriz extracelular é complexa e pode variar entre espécies e até mesmo entre linhagens da mesma espécie dependendo das condições ambientais. Apesar da

sua composição heterogênea, exopolissacarídeos são constantemente descritos como componentes essenciais dessa matriz fornecendo a estrutura onde as células microbianas são inseridas. Proteínas de superfície estão, também, freqüentemente na matriz do biofilme, mas sua presença tem sido principalmente relacionada com a ligação inicial das células microbianas às superfícies. O papel dessas proteínas na adesão intercelular e acúmulo em multicamadas de grupos de células ainda não está esclarecido (LASA & PENADÉS, 2006).

A proteína Bap de *S. aureus* caracteriza-se por multidomínios de proteínas de superfície de bactérias Gram-positivas. O gene *bap* está contido em um transposon junto com o gene transposase e três genes codificadores de proteínas de um *ATP-binding cassette (ABC) transporter*. Isso pode ser interpretado como coincidência ou como uma indicação de que o *(ABC) transporter* pode estar envolvido direta ou indiretamente na secreção de Bap, como ocorre em bactérias Gram-negativas. Em bactérias Gram-positivas, o *(ABC) transporter* não tem sido relacionado à mediação da secreção de Bap, apenas ao transporte de bacteriocinas e ferrormônios (LASA & PENADÉS, 2006). O transposon está inserido em uma ilha de patogenicidade, SaPIbov2 (UBEDA *et al.*, 2003) e sua mobilidade depende da atividade de uma recombinase funcional da família integrase que promove excisão, circularização e integração específica dentro do sítio *att_B* do cromossomo de *S. aureus* (LASA & PENADÉS, 2006).

Estudos de ligação primária, agregação intercelular e formação de biofilme mostraram que Bap promove tanto a ligação primária a superfícies abióticas como a adesão intercelular. Uma vez que a interrupção do gene *bap* provoca a diminuição no acúmulo do principal exopolissacarídeo da matriz do biofilme de *S. aureus*, a primeira interpretação foi que a deficiência de biofilme em linhagens mutantes de *bap* era principalmente causada por diminuição do acúmulo desse exopolissacarídeo, o PIA/PNAG (LASA & PENADÉS, 2006). A inativação do codificador de proteínas envolvidas na síntese de PIA/PNAG - o operon *icaADBC* - em uma linhagem *bap* positiva não teve efeito na formação de biofilme *in vitro* (CUCARELLA *et al.*, 2004). Em direção semelhante a esses resultados, TORMO *et al* (2005) observaram que todos os isolados estafilocócicos testados que continham o gene *bap* eram fortemente produtores de biofilme, apesar da maioria deles não conter o operon *icaADBC*. Esses resultados indicam que a proteína Bap é capaz de mediar um outro mecanismo de desenvolvimento de biofilme, alternativo ao mecanismo regular dependente

de PIA/PNAG (LASA & PENADÉS, 2006). O número de repetições de nucleotídeos dentro de Bap não foi relacionado até esse momento com a habilidade de formar biofilmes *in vitro*. Dessa forma, o fenótipo do biofilme de uma linhagem portadora da proteína Bap com uma única *C-repeat* é indistinguível de um biofilme produzido por uma linhagem que contém uma proteína Bap com trinta *C-repeats* (ARRIZUBIETA *et al.*, 2004).

A aderência de *S. aureus* às proteínas solúveis e componentes da matriz extracelular do hospedeiro é uma das principais etapas da patogênese das infecções estafilocócicas. *S. aureus* apresenta uma família de adesinas denominada MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) que reconhece especificamente componentes da matriz do hospedeiro. Estudos sobre a influência da presença de Bap na aderência de *S. aureus* às proteínas do hospedeiro, culturas de células epiteliais e regiões da glândula mamária têm indicado que linhagens *bap* positivas mostram aderência inferior ao fibrinogênio imobilizado, fibronectina e culturas de células epiteliais (CUCARELLA *et al.*, 2002). Estudos experimentais de infecção da glândula mamária têm indicado que Bap pode atuar como um fator que impede a ligação bacteriana inicial aos tecidos do hospedeiro, embora, ainda que em longo período, a presença de Bap facilite a persistência de *S. aureus* na glândula mamária (CUCARELLA *et al.*, 2004). O mecanismo pelo qual as proteínas da família Bap contribuem para o desenvolvimento do biofilme é desconhecido - apesar da grande proporção e do alto número de *repeats* sugerindo que essas proteínas possam mediar interações intercelulares homofílicas ou heterofílicas. Segundo LASA & PENADÉS (2006), o papel dessas proteínas na virulência ainda está pouco claro.

1.7 Toxinas estafilocócicas

S. aureus sempre foi a espécie do gênero mais importante relacionada a uma série de infecções e intoxicações em humanos e nos animais. Vários fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções causadas pelo microrganismo. Esses fatores incluem as hemolisinas alfa, beta, delta e gama, as leucocidinas e um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos constituído pela toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e pelas enterotoxinas estafilocócicas (EEs) que causam intoxicações alimentares (BANNERMAN, 2003).

1.7.1 Citotoxinas

As exotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* com atividade em membranas compreendem as toxinas alfa, beta, delta e gama e as leucocidinas (BOHACH & FOSTER, 2000).

1.7.1.1 Alfa-toxina

A alfa-toxina - denominada anteriormente de alfa-hemolisina devido à sua capacidade de lisar hemáceas - também atua na membrana celular de leucócitos promovendo a evasão do conteúdo da célula e conseqüente morte celular. É uma proteína citolítica que atua por meio da formação de poros em células sangüíneas e uma das toxinas bacterianas mais potentes. Suspeita-se que os eritrócitos de coelhos possuam um maior número de sítios de alta afinidade para a alfa-toxina, o que explicaria a ação especialmente tóxica dessa hemolisina a essas células, enquanto outras células menos sensíveis à ação da toxina, como os eritrócitos humanos, possuiriam apenas sítios com baixa afinidade (BOHACH & FOSTER, 2000).

Os monômeros de alfa-toxina ligam-se à membrana celular formando hexâmeros ou heptâmeros, o que promove a formação de poros em forma de anel, os canais hidrofílicos (BHAKDI *et al.*, 1991). Alterações no equilíbrio osmótico na entrada e saída de íons da célula e apoptose são efeitos decorrentes da formação desses poros e determinam a morte celular. Eritrócitos, células mononucleares, epiteliais, endoteliais e plaquetas são possíveis alvos da alfa-toxina que pode ser hemolítica, citotóxica, dermonecrótica e letal (BOHACH & FOSTER, 2000). O gene codificador dessa hemolisina, *hla*, já foi clonado e seqüenciado (SAKO *et al.*, 1983) e está sob o controle do sistema regulador *agr*. Alfa-toxina é produzida na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano.

1.7.1.2 Beta-hemolisina

Assim como a alfa-toxina, a beta-hemolisina é uma proteína que atua na membrana citoplasmática de várias células, apesar da denominação específica que recebe. Os poros formados na membrana tornam a célula instável e permitem o extravasamento do conteúdo celular. No entanto, esse processo é decorrente da atividade de esfingomielinase apresentada por beta-hemolisina, diferente da atuação de outras toxinas citolíticas. A hidrólise de esfingomielina, fosfolípido encontrado na membrana, depende da síntese de beta-toxina que ocorre na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano.

A beta-hemolisina - diferenciada da alfa-hemolisina por apresentar lise em eritrócitos de carneiro e não de coelhos - é produzida por aproximadamente 20% dos isolados *S. aureus* e sua identificação é relacionada principalmente a cepas de mastite bovina (BOHACH *et al.*, 1997). A beta-hemolisina, de massa molecular 35 kDa, é também conhecida como toxina *hot-cold* devido a uma característica particular que apresenta quando inoculada em placas contendo ágar sangue de carneiro. A 37°C, a toxina interage com as células sanguíneas vermelhas, mas não ocorre lise. Caso os eritrócitos sejam incubados em seguida a 4°C, observa-se lise das células (HUSEBY *et al.*, 2007).

O local ativo da beta-toxina é o centro inferior da proteína, como em todos os membros da superfamília DNase I. No entanto, um aspecto estrutural que individualiza as esfingomielinases (SMases) em relação aos outros membros dessa superfamília é a ocorrência de um filamento β , duplo e longo, formado pelas fitas β 12 e β 13 que interage com a cadeia N-acil da esfingomielina. Em um estudo, HUSEBY *et al* (2007) testaram a capacidade de clivar a esfingomielina de um recombinante selvagem e dos mutantes H150N e H289N. A mutação His-150 ou His-289 suprimiu a atividade de esfingomielinase. Além disso, a capacidade de executar a lise *hot-cold* em eritrócitos de carneiro foi verificada usando as mesmas linhagens e observou-se uma redução de 60 e 200 dobras nos mutantes, respectivamente. OPENSHAW *et al* (2005) propuseram que o filamento duplo tem um papel significativo na penetração da membrana e preparação da clivagem da esfingomielina. No entanto, HUSEBY *et al* (2007) acreditam que isso seja improvável devido à conservação das características dos resíduos nesse filamento.

As diferenças de sensibilidade dos eritrócitos à beta-toxina relacionam-se com a quantidade de esfingomielina presente na constituição dessas células. MARSHALL *et al*

(2000), usando ensaios biológicos e microscopia eletrônica, demonstraram que tanto linfócitos como neutrófilos também são sensíveis à beta-hemolisina e que a toxicidade da enzima é acentuada pela presença de Mg^{+2} . No entanto, esses dois tipos de células são consideravelmente menos sensíveis que eritrócitos de carneiro, provavelmente devido à presença de menos esfingomielina na membrana dessas células (HUSEBY *et al.*, 2007).

Importantes patógenos animais, como a linhagem de *S. aureus* NCTC 8325-4 (= RN4220), são conhecidos por secretarem grandes quantidades de beta-toxina, acima de 500µg/ml e não eram associados a patologias humanas. HUSEBY *et al* (2007) mostraram, no entanto, que essa toxina afeta linfócitos sanguíneos periféricos humanos, especificamente por morte na proliferação de linfócitos T. Outras células humanas sensíveis à beta-toxina são os monócitos (WALEV *et al.*, 1996), demais linfócitos e leucócitos polimorfonucleados (MARSHALL *et al.*, 2000). A atuação da beta-toxina em linfócitos ocorre provavelmente com o intuito de promover a evasão da bactéria da maquinaria imune do hospedeiro e para auxiliar no processo de obtenção de nutrientes (HUSEBY *et al.*, 2007). BOHACH & FOSTER (2000) relataram que a atuação da beta-hemolisina é dependente da espécie, sendo os eritrócitos de carneiros, vacas e cobaias mais sensíveis que os eritrócitos humanos, enquanto os de murinos e caninos são resistentes à ação da toxina.

Um papel proposto para as hemolisinas como a beta-toxina é o de dotar os organismos com a capacidade de adquirir ferro da forma heme. Fontes potenciais de heme são hemoglobinas e mioglobinas que podem ser encontradas em eritrócitos (HUSEBY *et al.*, 2007). O ferro é um nutriente limitante para todos os organismos e é necessário em muitos processos biológicos. *S. aureus* tem um sistema multicomponente de obtenção de heme de proteínas do hospedeiro de onde extrai o ferro essencial ao seu metabolismo (TORRES *et al.*, 2006).

Os resultados do estudo de HUSEBY *et al* (2007) sugerem que a beta-toxina pode, também, contribuir com a modulação imune do hospedeiro na presença de fatores acessórios de virulência como os superantígenos. Quando linfócitos foram incubados com TSST-1 e beta-toxina, observou-se uma diminuição da quantidade de trítium incorporado no DNA. Para assegurar que era a beta-toxina que estava inibindo a incorporação de [3H] timidina, mutantes com alterações em seus sítios ativos foram construídos, H289N e

H150N. Nenhum desses mostrou clivagem da esfingomielina *in vitro* e, quando testados para hemólise de eritrócitos de carneiro, pouca lise foi observada depois de 48 horas de incubação. A beta-toxina reduziu significativamente a incorporação de timidina na proliferação de células. TSST-1 causou proliferação de linfócitos identificada na forma de um grande número de colônias, provavelmente devido à ocorrência de linfócitos T contendo receptores específicos. Linfócitos incubados sem TSST-1 não formaram essas colônias. O efeito proliferativo caracterizado pela formação de colônias não ocorreu na presença de beta-toxina tanto nos isolados *S. aureus* como em *E. coli*.

As seqüências de aminoácidos codificadas pelo gene da beta-hemolisina (*hly*) são essencialmente idênticas em genomas conhecidos de *S. aureus*. As exceções são as linhagens em que os fagos $\phi 42$ e $\phi 13$ recombinaem com a porção 5' final da beta-toxina produzindo fenótipos *hly* mutantes (COLEMAN *et al.*, 1991). Nas linhagens 8325-4, USA300, MSSA476, MRSA252 e MW2, isso resulta na deleção dos primeiros vinte e quatro resíduos da porção terminal amino da seqüência completa da beta-toxina. Os efeitos dessa troca incluem deleção do sinal de exportação e de $\beta 1$, filamento interno da folha A, explicando desse modo o fenótipo negativo. No caso da linhagem 8325-4, observa-se produção de beta-toxina funcional quando é “curada” dos fagos $\phi 11$, $\phi 12$ e $\phi 13$ (COLEMAN *et al.*, 1986). Nas linhagens N315 e Mu50, a inserção resulta em substituição dos resíduos 1-24 por uma determinada seqüência, longa o suficiente para repor o filamento $\beta 1$, mas isso poderia resultar em substituição dos resíduos hidrofóbicos Leu-10 e Val-13 por arginina e lisina, respectivamente. Não apenas o espaço seria insuficiente para esses largos resíduos, como essas trocas poderiam resultar na finalização de cargas avulsas, que são extremamente desestabilizantes (DAO-PIN *et al.*, 1991), o que novamente produziria o fenótipo negativo.

1.7.1.3 Delta-hemolisina

Em 1947, Williams e Harper propuseram a existência da delta-hemolisina como uma quarta toxina citolítica de *S. aureus*, considerando as descritas até então, alfa, beta e gama. A delta-hemolisina é única em seu pequeno tamanho, estabilidade ao calor, propriedades surfactivas e é lítica para vários tipos de membrana da maioria das espécies animais, incluindo eritrócitos, outras células, organelas e até mesmo protoplastos

bacterianos. A atuação de delta-hemolisina provoca vazamento citoplasmático e lise das células expostas a essa toxina (BOHACH & FOSTER, 2000).

Codificado pelo gene *hld* - localizado próximo à porção final 5' do transcrito RNAIII do locus *agr* - esse peptídeo com vinte e seis resíduos é produzido por praticamente todos os isolados *S. aureus* e em alta porcentagem por outras espécies estafilocócicas. Quanto à localização e orientação da proteína em relação à membrana, pouco se sabe, mas parece que a toxina se insere dentro da bicamada lipídica, desordenando a estrutura da cadeia de lipídeos (BOHACH & FOSTER, 2000).

1.7.1.4 Leucotoxinas bi-componentes

Entre os fatores de virulência de *S. aureus*, as leucotoxinas constituem uma família de toxinas formadoras de poros que, por terem como alvo células fagocíticas, provavelmente interferem nas defesas imunológicas (PREVOST *et al.*, 2001). Gama-hemolisina, leucocidina Pantón-Valentine, LukE-D, a variante LukEv-Dv e lukM-lukF'-PV são exemplos de leucotoxinas bi-componentes, compostas por duas proteínas distintas secretadas independentemente e de ações sinérgicas.

Nenhuma informação sobre a existência de toxinas citolíticas formadoras de poros hetero-oligoméricos em bactérias foi obtida até o momento, exceto em linhagens estafilocócicas (KANEKO & KAMIO, 2004). Membros dessa família de toxinas apresentam uma distribuição epidemiológica e associações clínicas com determinadas doenças humanas ou com mastites de ruminantes leiteiros (BARRIO *et al.*, 2006). As cepas *S. aureus* produtoras da toxina PVL e sua relação com casos de pneumonia adquirida na comunidade são um exemplo dessas associações. Após o primeiro relato feito por LINA *et al* (1999), outros casos foram descritos em instituições na França, Suíça, Holanda e Inglaterra, o que permitiu que os genes *pvl* fossem adotados como marcadores estáveis para cepas CA-ORSA (HOLMES *et al.*, 2005). Outro exemplo é a leucotoxina LukE-D que foi relacionada com cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes com diarreia após o uso de antibióticos (GRAVET *et al.*, 1999). No caso da toxina lukM-lukF'-PV, a associação com humanos não foi feita até o momento, pois os genes codificadores dessa proteína só foram encontrados em linhagens isoladas de mastite de ruminantes e não em linhagens de origem humana (FUEYO *et al.*, 2005).

As duas proteínas constituintes das toxinas bi-componentes são denominadas como subunidades de classe S (31-32 kDa) e de classe F (36-38 kDa). Por convenção, as denominações S e F (*slow and fast*) referem-se à velocidade com que as proteínas são eluídas de uma coluna cromatográfica de troca iônica de carboxi-metil-celulose. Pelo menos cinco classes de subunidades S (LukS-PV, HlgA, HlgC, LukE e LukM) e quatro classes de subunidades F (LukF-PV, HlgB, LukD e LukF'-PV) têm sido descritas em *S. aureus* (PREVOST *et al.*, 2001).

Um componente, membro da classe S, reconhece um receptor celular. Isso não produz nenhuma resposta da célula, mas possibilita que membros da classe F, junto com outros componentes S, associem-se em complexos hexa ou octaméricos que acionam atividades biológicas. A consecutiva associação com a membrana da célula alvo é rapidamente seguida pela ativação de canais de cálcio e pela formação de poros transmembrânicos que são permeáveis a cátions monovalentes como o etídio (PREVOST *et al.*, 2001). O aumento da concentração de Ca^{2+} livre intracitoplasmático é relacionado com a ativação celular, um evento que acontece antes da formação do poro e abaixo das concentrações citotóxicas da toxina (STAALI *et al.*, 1998).

Até o momento, foram caracterizados quatro *loci* codificadores de leucotoxinas bi-componentes: *hlg*, *pvl*, *lukE-lukD* e *lukM-lukF'-PV*, sendo os três primeiros investigados neste trabalho. O locus *hlg*, codificador da gama-hemolisina, é constituído por três ORF's que compreendem os genes *hlgA*, *hlgC* e *hlgB*, identificados por COONEY *et al.* (1993). As subunidades HlgA e HlgC pertencem à classe S e a subunidade HlgB, à classe F. Dessa forma, cepas portadoras do locus *hlg* podem formar duas combinações para a formação de toxinas: HlgB e HlgA ou HlgB e HlgC. No caso da leucocidina Pantón-Valentine ou simplesmente PVL, o locus codificador é o *luk-PV* que possui como subunidade S o LukS-PV e como subunidade F, LukF-PV. Qualquer componente de uma proteína da classe S pode se combinar com outro da classe F. Essas combinações podem ser tóxicas e geram intensa resposta inflamatória (GRAVET *et al.*, 1998). Uma cepa de *S. aureus* portadora do locus *hlg* e, também, do *luk-PV* terá seis possibilidades de combinações para a formação de toxinas. Um exemplo de associação preocupante é a interação de HlgA e LukD, fortemente indutora dos canais de cálcio (GRAVET *et al.*, 1998).

A atuação sinérgica das leucotoxinas é tóxica aos leucócitos polimorfonucleados, monócitos e macrófagos de coelhos e humanos e a associação HlgA e HlgB pode ter efeitos sobre alguns linfócitos T e eritrócitos humanos. A leucocidina LukE-D não tem forte ação hemolítica em eritrócitos humanos e quando comparada a outras leucocidinas é pouco tóxica aos leucócitos também (GRAVET *et al.*, 1998). No entanto, entre as leucocidinas consideradas, LukE-D é a mais rápida na produção de efeitos como acumulação de fluidos, por exemplo. Neutrófilos e macrófagos podem ser lisados pela PVL, mas essa toxina não tem atividade hemolítica. Ao contrário, a gama-hemolisina tem forte atuação em hemáceas de humanos e outras espécies de mamíferos e é pouco leucotóxica. No entanto, o componente LukF-PV pode combinar com HlgC ou HlgA e promover atividade leucotóxica e pouco hemolítica. Apesar dos leucócitos polimorfonucleados, monócitos e macrófagos humanos serem alvos comuns das leucotoxinas estafilocócicas, essas toxinas não afetam sítios onde células típicas do sangue estão presentes. Segundo BOHACH & FOSTER (2000), os alvos primários são as células especializadas na defesa do hospedeiro em tecidos moles como o folículo piloso, intestino e pulmão, até mesmo porque o sistema complemento do sangue parece inativar tanto a PVL como a gama-hemolisina.

Enquanto as atividades citotóxicas de algumas leucotoxinas entre neutrófilos polimorfonucleados humanos têm sido bem caracterizadas (FERRERAS *et al.*, 1998), em neutrófilos polimorfonucleados de isolados de casos de mastite bovina essa caracterização tem ocorrido parcialmente (BARRIO *et al.*, 2006). Em um de seus estudos, BARRIO *et al* (2006) compararam a atividade citotóxica de leucotoxinas que fazem parte do genótipo de linhagens causadoras de mastite - a gama-hemolisina, LukE-D e lukM-lukF'-PV - em seu alvo comum, o neutrófilo. Uma das observações dessa investigação foi a alta atividade da toxina LukM-LukF'-PV em neutrófilos polimorfonucleados bovinos, o que é condizente com um estudo anterior que determinou que isolados de mastite contendo *lukM-lukF'-PV* foram mais ativos em neutrófilos polimorfonucleados bovinos do que em isolados que perderam esses genes (RAINARD *et al.*, 2003). Os genes *lukM-lukF'-PV* foram identificados no cromossomo da linhagem P83, originalmente isolada de um teto bovino infectado (KANEKO *et al.*, 1997). BARRIO *et al* (2006) reforçam ainda que a atuação de LukE-D é caracterizada por ser a menos ativa em neutrófilos polimorfonucleados bovinos. No entanto, uma nova variante dessa toxina, LukEv-Dv, assim como em neutrófilos

polimorfonucleados humanos, mostrou ter maior atividade que LukE-D em leucócitos de coelho. Essa variante foi identificada em uma linhagem de *S. aureus*, a ATCC 27733 (MORINAGA *et al.*, 2003). Tanto LukE-D como LukEv-Dv não possuem um segmento que é fosforilado pela proteína quinase e essencial para a atividade leucocitolítica em PVL (KANEKO & KAMIO, 2004). Dados do seqüenciamento completo dos genomas das linhagens N315 e Mu50 revelaram que *lukEv-Dv* está em uma ilha de patogenicidade no cromossomo dessas linhagens (KURODA *et al.*, 2001).

Ainda nesse estudo sobre a atuação das leucotoxinas em neutrófilos bovinos, BARRIO *et al* (2006) compararam as atividades das combinações homólogas das subunidades S e F e obtiveram o seguinte resultado: LukM-LukF'-PV > HlgA-HlgB > HlgC/HlgB > LukEv-LukDv > LukE-LukD. Os possíveis pares heterólogos de leucotoxinas também foram testados e LukM foi a mais ativa das subunidades S em combinação com todas as subunidades F. HlgB ou LukD mostraram um aumento na atividade em combinação com LukM, comparado com a atividade obtida com os seus homólogos da classe S. Em particular, a associação LukM-LukDv foi a segunda mais ativa, muito perto da atividade de LukM-LukF'-PV. LukDv foi também muito eficiente quando associada com HlgA, mas HlgA e HlgC foram mais ativas com HlgB do que com qualquer outra subunidade da classe F. Em geral, LukE apresentou menor atividade. Esses dados indicam que algumas associações heterólogas são mais ativas que pares homólogos, a mais notável segundo esse estudo foi LukM-LukDv quando comparada com LukEv-LukDv. GRAVET *et al* (1998) já haviam demonstrado que pares heterólogos são ativos em alvos celulares e esse estudo mostrou que isso também se aplica aos neutrófilos polimorfonucleados bovinos.

A leucotoxina LukM-F'-PV parece particular de linhagens causadoras de mastite porque não é atribuída a isolados de outras origens e é associada às linhagens mais citotóxicas em neutrófilos polimorfonucleados bovinos (FUEYO *et al.*, 2005). É também a mais ativa leucotoxina em neutrófilos polimorfonucleados bovinos, outro argumento que sustenta uma contribuição particular desta leucotoxina para a síndrome de mastite de ruminantes. LukE-D e LukEv-Dv são muito menos ativas em neutrófilos bovinos, embora quase todos os isolados de mastite tenham genes para essas toxinas (RAINARD *et al.*, 2003). Esses dados podem sugerir que LukE-D é menos significativa em casos de mastite

que LukM-LukF'-PV ou que, por outro lado, o alvo principal de LukE-D possa ser outro tipo celular (BARRIO *et al.*, 2006).

Os resultados da análise da capacidade citotóxica das leucocidinas no estudo de BARRIO *et al* (2006) sugerem que a gama-hemolisina é mais eficiente em ativar do que lisar neutrófilos polimorfonucleados bovinos, o que parece possível, pois atividades de estimulação e lise da leucocidina PVL podem ser dissociadas sugerindo que essas duas funções das leucotoxinas estafilocócicas sejam formadas por diferentes partes da molécula (MOUSSA *et al.*, 1999).

Comparando as atividades das mesmas leucotoxinas em neutrófilos polimorfonucleados humanos e bovinos, a principal diferença consiste na leucocidina PVL e LukM-LukF'-PV. Aquela é a mais ativa e esta a menos ativa em neutrófilos polimorfonucleados humanos e o contrário ocorre em neutrófilos polimorfonucleados bovinos (GRAVET *et al.*, 1998).

1.7.2 Toxinas com atividade de superantígenos

O termo superantígeno (SAg) foi introduzido em 1989 por MARRACK & KAPPLER para descrever uma acentuada expansão de células T em casos de exposição às toxinas que desencadeavam esse processo. As toxinas com atividade de superantígenos se ligam diretamente à molécula da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) das células apresentadoras de antígenos - uma forma diferente do que ocorre com os antígenos normais - resultando em uma estimulação de muitas células T e, conseqüentemente, em uma produção excessiva de citocinas como as interleucinas I (IL-1) e II (IL-2), gama interferon (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (MARRACK & KAPPLER, 1990).

O reconhecimento do antígeno pelo seu receptor, presente na membrana da célula T, é a primeira etapa da resposta imune celular. O antígeno é apresentado a esses receptores na forma de peptídeos ligados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), ou seja, ligados às proteínas associadas à membrana da célula apresentadora de antígeno. O comportamento dos superantígenos é caracterizado por interações inespecíficas com várias células T. Para a ativação das propriedades dessas toxinas é necessário somente o reconhecimento de uma das porções da cadeia Beta do receptor de

antígeno das células T, a porção V. De forma diferente, os antígenos convencionais, ao entrarem em contato com o MHC das células apresentadoras de antígenos, necessitam do reconhecimento dos cinco elementos do receptor de antígeno das células T, V-Beta, D-Beta, J-Beta, V-Alfa e J-Alfa. Esse reconhecimento promove a ligação entre esse receptor e o MHC e explica por que os superantígenos conseguem estimular em torno de 20% de quase todos os linfócitos T, enquanto os antígenos convencionais estimulam essas células na ordem de 1:10.000 (McCORMICK *et al.*, 2001).

As toxinas com propriedades de superantígenos (SAGs) produzidas por *S. aureus* compreendem as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), a TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin-1*) e as toxinas esfoliativas (ETs). Esses fatores de virulência estão envolvidos na patogênese de doenças estafilocócicas humanas como intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada (SCHMDT & HENSEL, 2004), respectivamente. Entretanto, pouco é conhecido sobre a importância das toxinas com atividade de superantígenos na patogênese de infecções intramamárias bovinas, apesar de mais de 60-70% de *S. aureus* isolados desses casos produzirem essas toxinas ou carregarem seus respectivos genes (TOLLESRUDE *et al.*, 2000; KATSUDA *et al.*, 2005).

1.7.2.1 Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs)

As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* causam intoxicação após a ingestão de alimentos contaminados por essas toxinas. A capacidade de produzir enterotoxinas estafilocócicas não é exclusiva de *S. aureus*. Estudos como o de HIROOKA *et al* (1988) relataram o isolamento de outras espécies coagulase positivas enterotoxigênicas como o *S. intermedius* e *S. hyicus*¹.

Os principais sintomas como náuseas, vômitos, diarreias, dor abdominal e dor de cabeça ocorrem em um período de uma a seis horas após a ingestão da toxina. O quadro clínico é relativamente brando com duração de algumas horas a um dia podendo, às vezes, apresentar maior severidade em função da quantidade ingerida e da susceptibilidade do indivíduo e caracteriza-se por desidratação, cefaléia, sudorese e alteração da temperatura

¹ Recupero nesse texto, em parte, a revisão de literatura feita por CUNHA, M.L.R.S., publicada nos anais do IV encontro de pesquisadores em mastites realizado em Botucatu – SP, 2007.

corpórea. As mortes são raras, mas já ocorreram em crianças e idosos (BENNETT *et al.*, 1999).

A contaminação do leite com *S. aureus* pode ocorrer por duas vias principais, por meio da incorporação de microrganismos que estão presentes no úbere diretamente para o leite ou pelo contato do leite com utensílios e equipamentos contaminados durante as operações de ordenha, coleta e armazenamento (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). Considerando essa última situação, o homem pode atuar como reservatório de *S. aureus* e veiculador do microrganismo em alimentos (JAY, 2005). Segundo HUY (1994), 20 a 50% das pessoas normais apresentam esse microrganismo na cavidade nasal e orofaringe e as cepas que estão no nariz podem passar para as mãos, dedos, pele, contaminando o ar, água, solo, alimento e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o portador (JAY, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas solúveis em água, monoméricas, globulares com peso molecular entre 26 a 29 mil daltons, ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, com duas cisteínas formando ponte de dissulfeto (BERGDOLL, 1989). Apresentam resistência ao calor e às enzimas proteolíticas tripsina, pepsina, renina e papaína, o que permite a sua passagem pelo trato gastrointestinal sem perda de atividade (HUY, 1994). São termoestáveis e sua inativação depende da temperatura, da pureza, composição e pH do meio (NOTERMANS *et al.*, 1988). Segundo o FDA (*Food and drug administration*, 2001), a toxina estafilocócica é sensível entre 98.9°C por 68,5 minutos ou 126,7°C por 6,2 minutos. O consumo de leite proveniente de rebanhos contaminados é um risco potencial à saúde humana, uma vez que a maioria dos casos diagnosticados de mastite é do tipo subclínico, ou seja, os animais não apresentam alterações visíveis na glândula mamária e no leite (FAGUNDES E OLIVEIRA, 2004).

As enterotoxinas estafilocócicas começaram a ser descritas em 1959 por BERGDOLL e colaboradores e, atualmente, constituem um grupo de dezoito toxinas sorologicamente distintas denominadas como EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH, EEI, EEJ, EEK, EEL, EEM, EEN, EEO, EEP, EEQ, EER e EEU (JORGENSEN *et al.*, 2005). As enterotoxinas estafilocócicas são similares na sua estrutura e propriedades biológicas (MARRACK & KAPPLER, 1990). No entanto, diferem em relação à localização genética, sua produção e mecanismo de regulação do gene (CUNHA, 2007). Os

genes *sea* e *see*, responsáveis pela produção das EEA e EEE, respectivamente são carregados em profagos (SCHAD *et al.*, 1997). O gene *seb*, codificador da EEB, pode ser de origem cromossomal (SHAFER & IANDOLO, 1978) ou pode ser carregado por plasmídios (SHALITA *et al.*, 1977). As EEC são um grupo de proteínas de origem cromossomal altamente conservadas e apresentam três subtipos distintos, EEC1 EEC2 e EEC3 com base nas diferenças dos determinantes antigênicos (MARRACK & KAPPLER, 1990). Outras variantes moleculares das EEC têm sido descritas de acordo com o hospedeiro animal a que está relacionada, EEC bovina, EEC canina e EEC ovina (MARR *et al.*, 1993). Os genes *sed* e *sej*, determinantes das toxinas EED e EEJ, são de origem plasmidial. A EEJ apresenta seqüências similares com a EEA, EEE e EED correspondendo a 64, 63 e 51% respectivamente. Análises feitas por BALABAN & RASOOLY (2000) sugerem que o gene *sej* pode estar presente em todos os plasmídios que codificam a EED.

Ainda de acordo com CUNHA (2007), a quantidade em que são expressas também difere conforme o tipo de enterotoxina. Segundo BERGDOLL *et al* (1989), as EEB e EEC são expressas em maiores quantidades do que as outras enterotoxinas, freqüentemente na ordem de 100µg/ml de sobrenadante de cultura, enquanto a produção máxima obtida para EEA, EED e EEE é geralmente menor que 10µg/ml. A quantidade de enterotoxina necessária para causar intoxicação ainda não foi exatamente estabelecida, mas considera-se que o consumo de um alimento contaminado com enterotoxinas estafilocócicas em concentrações de 1ng/g possa levar ao desencadeamento dos sintomas. Entretanto, fatores como idade, massa corpórea e condições físicas do indivíduo influenciam o desenvolvimento dos sintomas (CUNHA, 2007). Segundo BENNETT & MONDAY (2003), o número de células de estafilococos necessárias à produção de enterotoxinas em quantidade suficiente para causar gastroenterite é de aproximadamente 10⁶ UFC/g ou ml, sendo a EEA a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação alimentar seguida da EED (JAY, 2005). A produção simultânea de diferentes tipos de toxinas, capacidade conferida a *S. aureus*, pode aumentar os efeitos toxigênicos isolados, sugerindo que essa co-produção possa desempenhar papel importante na patogenia das infecções intramamárias produzidas por esse microrganismo (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004) como provocar distúrbios na reação de defesa do hospedeiro tornando-se uma das razões de infecções recorrentes e crônicas (HAVERI *et al.*, 2008).

Sabe-se, até o momento, que os genes para superantígenos podem existir em vários tipos de elementos genéticos móveis como fagos, plasmídios ou em ilhas de patogenicidade (SaPI) como, por exemplo, o locus *egc*. A maioria das toxinas codificadas por *egc* exibe atividade mitótica e pode atuar como superantígenos sendo potentes fatores de virulência que podem comprometer a reposta imune e criar vantagens para a bactéria. Isolados *S. aureus* que possuem SaPIbov (*sec*, *sel* e *tst*) podem inibir certos elementos como o *egc1* devido a sua integração no cromossomo (HAVERI *et al.*, 2008). Esses mesmos autores, também, identificaram a co-existência de *egc2*, e não *egc1*, em muitos isolados carreadores da SaPIbov, assim como encontrado em FUEYO *et al.* (2005).

1.7.2.2 Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)

A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), por suas propriedades de superantígeno, estimula os linfócitos T a liberar citocinas que provocam o choque, uma condição sistêmica grave caracterizada por febre alta, vômito, diarreia, hipotensão arterial, descamação da pele, erupções cutâneas e acometimento de pelo menos mais três sistemas orgânicos (PARRILO *et al.*, 1993). Para o desenvolvimento da síndrome do choque tóxico (TSS) é necessário que o hospedeiro esteja colonizado por uma cepa de *S. aureus* produtora de TSST-1 ou toxinas similares e que essas toxinas encontrem uma via de entrada na circulação sanguínea (HERZER, 2001). Com o intuito de realizar um diagnóstico preciso dessa síndrome, foi proposta a incorporação de análises laboratoriais - como isolamento de *S. aureus* de mucosa ou de sítios normalmente estéreis, produção de toxina associada à TSS pela cepa isolada, carência de anticorpos associados à toxina durante a fase aguda da doença – ao lado dos sintomas clínicos apresentados.

Em humanos, a TSS estafilocócica pode se manifestar de duas formas, a menstrual e a não-menstrual. A primeira ocorre em mulheres que possuem a mucosa vaginal colonizada por cepas de *S. aureus* produtoras de TSST-1, toxina com habilidade única entre as demais de cruzar as barreiras mucosas. Já a TSS não-menstrual pode resultar de infecção por *S. aureus* em qualquer local do organismo (McCORMICK *et al.*, 2001). Em bovinos, tanto *S. aureus* isolados de casos clínicos como subclínicos de mastite produzem essa toxina. O primeiro relato de detecção de TSST-1 produzida por *S. aureus* de origem animal foi feito por JONES e WIENEKE (1986).

A TSST-1 é um polipeptídeo de cadeia simples com propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas (CARDOSO *et al.*, 2000). Essa toxina não está envolvida com intoxicação alimentar estafilocócica como as enterotoxinas. Entretanto, essas, por serem superantígenos, podem causar a forma não-menstrual de TSS pela ativação e proliferação de células T (KLOTZ *et al.*, 2003), sendo esse papel atribuído às enterotoxinas dos tipos B (SEB) e C (SEC) (MCCORMICK *et al.*, 2001).

Em *S. aureus* provenientes de bovinos, o gene *tst*, codificador de TSST-1 é encontrado em um elemento genético móvel. A linhagem ET3-1 foi o isolado fonte da descoberta e caracterização da SaPIbov1, uma ilha de patogenicidade associada a isolados *S. aureus* bovinos que codifica os genes para TSST-1 e uma variante da enterotoxina C estafilocócica associada a esses animais (FITZGERALD *et al.*, 2001). As toxinas codificadas pelos genes *sec* e *tst* têm sido associadas à mastite bovina severa (JONES & WIENEKE, 1986; MATSUNAGA *et al.*, 1993).

1.7.2.3 Toxinas Esfoliativas (ETs)

A síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS), uma das manifestações clínicas causadas por cepas produtoras de toxinas esfoliativas, coloca em questão a inclusão dessas toxinas no grupo de superantígenos devido à instabilidade dos sintomas apresentados. Embora ocorra estímulo específico de células T na presença dessa toxina, outros sintomas como eritema, febre e focos purulentos associados à síndrome mediada por superantígenos não ocorrem de forma sistemática. O fato da bactéria não ser isolada em todas as lesões bolhosas, decorrentes da atuação da toxina, ao lado da proliferação das células T, é o que confere a característica de superantígeno às toxinas esfoliativas (VATH *et al.*, 1999).

As toxinas esfoliativas estafilocócicas (ETs) - produzidas por apenas 5% das cepas de *S. aureus* (BOHACH *et al.*, 1997) - funcionam como serino-proteases, têm a quimiotripsina como protótipo contendo dois domínios em forma de barris perpendiculares e alfa-hélice C-terminal. A ETA possui uma única alfa-hélice N-terminal cuja ligação a um receptor celular ativa a protease (BOHACH & FOSTER, 2000). Essas toxinas promovem uma separação intradérmica do estrato granular por meio da clivagem específica da desmogleína-1, proteína desmossomal mediadora da adesão intercelular dos queratinócitos presentes na camada granular. No caso da síndrome da pele escaldada, as manifestações

clínicas podem ocorrer de forma generalizada pela epiderme ou localizada, sendo as lesões, nesse último caso, conhecidas como impetigo, podendo apresentar a formação de bolhas ou não. Quando se observa a ocorrência de bolhas, o líquido intradérmico é estéril e a cepa infectante geralmente é isolada de sítios distantes como garganta ou cavidade nasal (YAMASAKI *et al.*, 2005). A descamação generalizada da pele ocorre em pacientes sem anticorpos para as toxinas esfoliativas, mas lesões localizadas, como o impetigo bolhoso, desenvolvem-se independente da presença do anticorpo no soro.

Foram descritas duas formas antigênicas de ETs, designadas como toxina esfoliativa A (ETA) e toxina esfoliativa B (ETB) e codificadas pelos genes *eta* e *etb*, respectivamente. A ETA é codificada por um gene cromossomal (*eta*) inserido em um segmento de 43 Kb, enquanto o gene *etb* está em um plasmídio de aproximadamente 38,2 a 38,5 Kb. ETA é uma toxina muito estável, resistente ao calor extremo, ao contrário de ETB, sensível ao calor (LISA, 2004). A associação dessas duas proteínas que apresentam mais de 40% de identidade (BOHACH & FOSTER, 2000), em cepas de *S. aureus*, está relacionada a casos de dermatite esfoliativa humana em recém-nascidos, doença de Ritter, geralmente em surtos hospitalares (HELALI *et al.*, 2005). A presença do gene *etb* é fortemente associada à síndrome generalizada, enquanto o gene *eta* relaciona-se com o impetigo bolhoso (YAMASAKI *et al.*, 2005).

Comparada às outras toxinas pirogênicas, a ET é 100 vezes menos potente para induzir a proliferação de células T (MELISH & GLASGOW, 1970) e, por razões ainda não esclarecidas, as toxinas esfoliativas não são co-produzidas com TSST-1 por *S. aureus*, embora isso ocorra com as demais enterotoxinas (GRAVET *et al.*, 2001).

2. Objetivos

Gerais:

Avaliar a diversidade genética, os principais fatores de virulência, genes assessórios *agr* e resistência a antimicrobianos de linhagens de *Staphylococcus aureus* e de outras espécies coagulase positivas isoladas de insufladores, do leite e de óstios bovinos e de leite de ovinos portadores de mastites clínica e subclínica.

Específicos:

- 1- Identificar os perfis clonais das linhagens de *S. aureus* e de outras espécies coagulase positivas por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e relacionar a ocorrência desses com a procedência das amostras.
- 2- Determinar os genes codificadores dos principais fatores de virulência de adesão, citotoxinas e toxinas com atividade de superantígenos de isolados de *S. aureus* e outras espécies coagulase positivas e relacioná-los com os perfis clonais obtidos.
- 3- Relacionar os genes codificadores dos fatores de virulência das linhagens de *S. aureus* com o grupo de genes assessórios *agr*.
- 4- Identificar perfis de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas de insufladores, do leite e de óstios bovinos e de leite de ovinos portadores de mastites clínica e subclínica.
- 5- Avaliar a concentração inibitória mínima à oxacilina das cepas resistentes a este antibiótico.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras bacterianas

Foram analisadas 70 amostras de estafilococos coagulase positivos de origem animal. Dessas, 52 foram isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, do óstio dos tetos desses animais e de insufladores empregados na coleta do leite de três fazendas de exploração leiteira do Município de Nova Odessa do Estado de São Paulo, correspondendo a 28, 16 e 8 isolados, respectivamente. Das 28 amostras de leite mastítico, 26 foram coletadas no período de outubro a dezembro de 2005 nas três fazendas, designadas por A, B e C. Já a coleta das outras duas amostras de leite mastítico e daquelas provenientes de óstios e de insufladores (n = 26) ocorreu apenas na fazenda A e durante um período mais extenso, de outubro/ 2005 a dezembro/ 2006, com exceção de uma única amostra que foi obtida de um insuflador nessa mesma fazenda em um período anterior, abril/ 2004. Essas 26 amostras foram previamente identificadas como ORSA. Quanto as 18 amostras de *S. aureus* isolados de ovinos da região do agreste do Município de Garanhuns do estado de PE, 6 foram isoladas de casos de mastite clínica e 12 de mastite subclínica.

3.2 Metodologia

3.2.1 Identificação fenotípica das amostras de estafilococos coagulase positivos

As amostras provenientes de bovinos e ovinos foram semeadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – DIFCO, Detroit, EUA) a 37°C por 18-24 horas e, posteriormente, em ágar sangue a 5% (*Columbia Blood Agar*, DIFCO, enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado) com incubação a 37°C por 18-24 horas. As colônias foram submetidas ao exame bacterioscópico de esfregaços corados pelo método de Gram e aos testes da catalase e coagulase. A diferenciação de *Staphylococcus aureus* das demais espécies do gênero foi feita com base nos resultados das provas de Voges-Proskauer (VP), DNase e produção de ácidos a partir de uma série bioquímica constituída de onze açúcares: maltose, frutose, sacarose, lactose, manitol, manose, rafinose, trealose, celobiose, xilose e

arabinose. Até a realização das análises fenotípica e genotípica, as amostras bacterianas foram conservadas em ágar TSA (*Tryptone Soya Ágar* – DIFCO, Detroit, EUA) à temperatura ambiente e caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - DIFCO, Detroit, EUA) adicionado de glicerol na concentração de 25%, a -20°C.

3.2.2 Extração do DNA cromossômico

A obtenção do DNA cromossômico das cepas para a realização das técnicas genotípicas foi realizada por meio da técnica de extração fenol-clorofórmio adaptada de SAMBROOK *et al* (1989).

As bactérias foram cultivadas por 24 horas a 37°C em caldo BHI. Dessa cultura, 1ml do meio foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos para a precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 500µl de tampão de lise (50mM Tris, pH 8; 5mM EDTA pH 8; 50mM NaCl). Lisostafina a uma concentração final de 20µl/ml foi adicionada para a digestão da parede celular e a solução incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas. A membrana celular foi rompida com 30µl de uma solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% e para a lise das proteínas presentes foi utilizada a enzima proteinase K (100mg/ml) a uma concentração final de 6µl/ml. Essa solução foi novamente incubada em banho-maria por 2 horas a 56°C. Para a remoção das proteínas do meio foi realizada a separação de fases com 500µl de uma mistura de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos, a fase superior foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 700µl de etanol absoluto gelado e 50µl de NaCl 5M para a precipitação do DNA. Essa solução permaneceu a -20°C por 12 horas e depois foi centrifugada a 15000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e nova centrifugação a 15000 rpm por 20 minutos foi realizada com adição de etanol 70% gelado. Após descarte do sobrenadante, o tubo permaneceu aberto no fluxo até evaporação total do etanol e o *pellet* foi solubilizado em 100µl de tampão TE (10mM Tris; 1mM EDTA - pH 8) e armazenado a -20°C até ser utilizado.

3.2.3 Confirmação genotípica da espécie por meio da detecção do gene *nuc*

Todos os isolados de estafilococos coagulase positivos selecionadas para esse estudo foram submetidas à confirmação da espécie por meio da identificação do gene *nuc* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). O par de *primers* utilizado para a identificação de *S. aureus* foi desenhado com base nas seqüências de DNA genômico da cepa MRSA 252, incluídas no banco de dados GenBank (número de acesso NC_002952). O outro par de *primers* espécie-específico para a confirmação de *S. intermedius* amplifica regiões altamente conservadas nessa espécie, mas não em *S. aureus* (BECKER *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Iniciadores para amplificação dos genes *nuc*

Gene	Iniciador	Seqüência de nucleotídeos
<i>nuc - S. aureus</i>	F	5' - TATGGTCCTGAAGCAAGTG - 3'
	R	5' - GCCACGTCCATATTATCAG - 3'
<i>nuc - S. intermedius</i>	F	5' - CCTGCAATGAGAGGTAAGTT - 3'
	R	5' - CAGACATTCAATATGCGATTG - 3'

Para as reações de amplificação foi utilizado um volume final de 25µL de uma mistura contendo 2µL da solução de DNA extraído conforme descrito em 3.2.2; 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas); 2,5µL do tampão concentrado fornecido com a enzima; os reagentes com suas respectivas concentrações finais: MgCl₂ a 2,5mM, cada dNTP a 200µM e os iniciadores a 250nM. As reações foram amplificadas em um termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 com as seguintes condições: uma denaturação inicial de 5 minutos a 94°C seguida de outros trinta ciclos de denaturação, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item a seguir.

3.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização e análise do fragmento de DNA amplificado na reação da PCR, um gel de agarose foi preparado a 1,5% em tampão 0,5X TBE (Tris base 890mM; EDTA 25mM; ácido bórico 89mM). Para a verificação dos tamanhos dos produtos da PCR, alíquotas dessas amostras, misturadas a uma solução tampão (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%), e um padrão de massa molecular conhecido (1Kb DNA Ladder – Invitrogen™) foram submetidos à separação eletroforética por cerca de 45 minutos a 100 volts. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador UV MacroVue (Pharmacia). O registro foi feito por fotografia digital.

3.2.5 Determinação das linhagens de *S. aureus* e das demais espécies coagulase positivas por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

As cepas de *Staphylococcus aureus* e das outras espécies coagulase positivas foram semeadas em ágar-sangue de carneiro a 5% e incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, foram repicadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3.345xg durante 10 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em 1ml de solução salina estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga previamente pesado. Essa suspensão foi centrifugada a 23.100xg durante 15 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, o sedimento foi novamente ressuspensionado com 1ml de solução salina estéril, centrifugado a 23.100xg durante 15 minutos e o sobrenadante, mais uma vez, descartado. Esse procedimento foi repetido três vezes e o sedimento, então, pesado e ressuspensionado em EDTA 50mM pH 8,0 para uma concentração final de 100µg de massa bacteriana por µl. Desta suspensão, 15µl foram transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 215µl de tampão EC. A essa mistura foram adicionados 250µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, USA) e 20µl de solução de lisostafina (100µg/ml; Sigma, USA). Esta suspensão foi transferida para os moldes onde permaneceu por 30 minutos a 4°C, para que os blocos se solidificassem. Após esta etapa, os blocos foram colocados em uma placa de cultura de células contendo 2ml de tampão EC em cada um dos orifícios. Essa placa foi incubada a 37°C por um período de 5

horas sob agitação suave. Após a incubação, os blocos foram lavados com 2,5ml de tampão CHEF TE e, a seguir, incubados com 1ml de tampão ES adicionado de 50µl de solução de proteinase K (20mg/ml - Invitrogen USA) por 12 horas à temperatura de 50°C. Na sequência, os blocos foram lavados com 2,5ml de tampão CHEF TE e incubados à temperatura ambiente por 1 hora sob leve agitação (4 lavagens com incubações de uma hora cada). Foram armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese (PFALLER, 1993).

Digestão enzimática - A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição FastDigest® *Sma*I (CCC↓GGG) (Fermentas *Life Sciences*, Canadá), que reconhece e cliva sequências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *Staphylococcus spp* (12 a 20 sítios de restrição) (PREVOST *et al.*, 1992; STRUELENS *et al.*, 1992). Para o tratamento com enzimas de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células de 96 orifícios contendo 300µl de tampão DNS. A seguir, esse tampão DNS foi retirado e novamente foram adicionados 300µl do mesmo tampão. Os blocos foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Este processo foi repetido quatro vezes e, após este procedimento, o tampão DNS foi substituído por 100µl de uma solução contendo tampão FastDigest® IX e 1µl da enzima FastDigest® *Sma*I. Em seguida, os blocos foram incubados por 6 minutos a 37°C.

Eletroforese - A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (sigma, USA) em TBE 0,5X (90mM Tris; 90mM ácido bórico; 2mM EDTA *Amersham Pharmacia Biotech*, USA) (SAMBROOK *et al.*, 1989) no equipamento CHEF DR11 System (BIO-RAD, USA) com intervalos de tempo de pulso de 5 a 60 segundos por 23 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm (PFALLER, 1993).

O gel foi corado com solução aquosa contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo (Sigma, USA) e fotografado sob transiluminação com luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular o Lambda DNA ladder PFGE (*New England Biolabs, Inc.*, USA), com extensão das bandas de 48,5Kb até 1,0Mb (PFALLER, 1993).

Análise dos resultados - Os perfis de restrição do DNA gerados por PFGE foram analisados por dendrograma com utilização do coeficiente de similaridade DICE e tolerância de 2,0%.

3.2.6 Antibiograma

Para a avaliação do perfil de resistência das cepas em estudo, foi escolhida pelo menos uma droga de cada classe de antibióticos normalmente utilizados na determinação da sensibilidade de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos. Foi empregado o método de difusão em ágar pela técnica de discos descrita por Kirby-Bauer (1966), padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2008). Os discos de antibióticos (Oxoid) utilizados nessa análise foram: penicilina 10 units, ampicilina 10µg, oxacilina 1µg, cefalotina 30µg, vancomicina 30µg, gentamicina 120µg, amicacina 30µg, eritromicina 15µg, ofloxacina 5µg, sulfametoxazol-trimetoprim 25µg, tetraciclina 30µg, cloranfenicol 30µg, sulfonamida 300mcg, azitromicina 15mcg, clindamicina 2µg e ampi-sulbactam 20µg. Como controle de qualidade da técnica e dos discos de antibióticos empregados foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 25.923, conforme as normas preconizadas pelo CLSI (2008). A leitura dos halos foi feita no equipamento BIOMIC por meio do programa WHO NET 5 que converte as medidas dos halos em valores de concentração inibitória mínima (CIM).

3.2.7 Confirmação da resistência à oxacilina

Todas as cepas que apresentaram resistência à oxacilina por meio da técnica de discos foram submetidas a uma triagem para a confirmação de resistência a essa droga. Verificou-se o crescimento em ágar Müeller-Hinton contendo 4µg/mL de oxacilina e 4% de cloreto de sódio (NaCl) conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2008). O inóculo foi aplicado na placa com auxílio de um *swab* embebido em uma suspensão da cultura bacteriana correspondente à escala 0,5 de McFarland. A incubação foi realizada a 35°C por 24h. A observação de uma ou mais colônias na área de aplicação do inóculo definiu o resultado como positivo, confirmando a resistência da cepa à oxacilina. As cepas de *S. aureus* utilizadas como controle foram a NCTC 10442, resistente à oxacilina e a ATCC 25923, sensível a esse antibiótico.

3.2.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina

A determinação da CIM para a oxacilina foi realizada pela técnica de Etest (AB Biodisk, Solna, Suécia). Após cultivo em ágar sangue de carneiro, uma colônia foi inoculada em caldo Müeller-Hinton e incubada a 37°C até que a suspensão bacteriana atingisse a escala 0,5 de McFarland. Um inóculo dessa suspensão foi aplicado em ágar Müeller-Hinton por meio de um *swab* e a fita de Etest contendo diferentes concentrações de oxacilina foi colocada sobre o meio já inoculado. As placas foram incubadas a 35°C por 24h. A leitura foi realizada conforme as instruções do fabricante e a interpretação dos resultados segundo o documento do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2008). As cepas de *S. aureus* utilizadas como controle foram a Mu50, resistente à oxacilina e a ATCC 25923, sensível a esse antibiótico.

3.2.9 Determinação da presença do gene *mecA*

Foi utilizado um par de iniciadores para a amplificação do gene *mecA* conforme demonstrado na tabela 2. Como controles positivos foram utilizadas cepas padrão de cada um dos quatro tipos de SCC*mec*: tipo I - NCTC 10442; tipo II - N315; tipo III - NCTC 85/2082; tipo IVa - JSC1968; tipo IVb - JSC1978 e tipo IVc - MR108. Como controle negativo foi usada a cepa ATCC 25923.

Tabela 2 - Iniciadores para amplificação do gene *mecA*

Gene	Iniciador	Seqüência de nucleotídeos
<i>mecA</i>	mA1	5' - TGC TAT CCA CCC TCA AAC AGG - 3'
	mA2	5' - AAC GTT GTA ACC ACC CCA AGA - 3'

Para amplificação do gene *mecA* foi utilizado o seguinte protocolo descrito por OKUMA *et al* (2002). Um volume final de 20µL de uma mistura para reação contendo 2µL de DNA; 0,5 unidade de Taq polimerase; 2,5µL do tampão concentrado fornecido com a enzima; os reagentes com suas respectivas concentrações finais: MgCl₂ a 2,5mM, cada dNTP a 200µM e os iniciadores a 250nM. As reações foram amplificadas no termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 com as seguintes condições: um ciclo de 5 minutos a 94°C

seguido de trinta ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. A visualização e análise dos fragmentos de DNA amplificados na reação da PCR foram realizadas conforme descrito no item 3.2.4.

3.2.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das estruturas gênicas relativas aos fatores de virulência (toxinas)

Foram utilizados 13 pares de iniciadores para a amplificação dos genes codificadores de toxinas, conforme demonstrado na tabela 3 (JARRAUD *et al.*, 2002). Como controle interno para todas as reações de PCR foi utilizado o par de *primers arcC*, referente ao gene da proteína carbamato quinase. Para a amplificação das estruturas gênicas foi utilizado o protocolo descrito por OKUMA *et al* (2002) com algumas adaptações. Um volume final de 25µL de uma mistura contendo 2µL da solução de DNA extraído conforme descrito em 3.2.2; 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas); 2,5µL do tampão concentrado fornecido com a enzima; os reagentes com suas respectivas concentrações finais: MgCl₂ a 2,5mM, cada dNTP a 200µM e os iniciadores a 250nM. As reações foram amplificadas em um termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 com as seguintes condições: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de trinta ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. A temperatura de anelamento utilizada foi padronizada com testes em diferentes temperaturas e foi observado que a temperatura de 55°C aplicava-se a todos os iniciadores. A visualização e análise dos fragmentos de DNA amplificados na reação da PCR foram realizadas conforme descrito no item 3.2.4. A utilização das cepas N315 e Mu50 como padrões foi baseada no estudo de KURODA *et al* (2001). As outras cepas padrão foram gentilmente cedidas pela Dra. Teruyo Ito da Universidade Juntendo, Tóquio.

Tabela 3 – Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de toxinas

Iniciador	Toxina	Seqüência (5'-3')	Cepa padrão
SEA-1	Enterotoxina A	GAA AAA AGT CTG AAT TGC AGG GAA CA	Mu50
SEA-2		CAA ATA AAT CGT AAT TAA CCG AAG GTT C	
SEB-1		ATT CTA TTA AGG ACA CTA AGT TAG GGA	
SEB-2	Enterotoxina B	ATC CCG TTT CAT AAG GCG AGT	CC63
mpSEC-1	Enterotoxina C	GTA AAG TTA CAG GTG GCA AAA CTT G	N315
mpSEC-2		CAT ATC ATA CCA AAA AGT ATT GCC GT	
SED-1		GAA TTA AGT AGT ACC GCG CTA AAT AAT ATG	
SED-2	Enterotoxina D	GCT GTA TTT TTC CTC CGA GAG T	RN4220
SEE-1	Enterotoxina E	CAA AGA AAT GCT TTA AGC AAT CTT AGG C	T47
SEE-2		CAC CTT ACC GCC AAA GCT G	
TST-1		TSST-1 Síndrome do	
TST-2	choque tóxico	TAC TAA TGA ATT TTT TTA TCG TAA GCC CTT	N315
mpETA-1	Esfoliativa A	ACT GTA GGA GCT AGT GCA TTT GT	ZM
mpETA-2		TGG ATA CTT TTG TCT ATC TTT TTC ATC AAC	
mpETB-1		CAG ATA AAG AGC TTT ATA CAC ACA TTA C	
mpETB-2	Esfoliativa B	AGT GAA CTT ATC TTT CTA TTG AAA AAC ACT C	N5
PVL-1	Leucocidina Panton-	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A	MR108
PVL-2	Valentine	GCA TCA AAT GTA TTG GAT AGC AAA AGC	
LUKDE-1		TGA AAA AGG TTC AAA GTT GAT ACG AG	
LUKDE-2	Leucocidina LukED	TGT ATT CGA TAG CAA AAG CAG TGC A	N315
HLA-1	Hemolisina A	CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG	N315
HLA-2		CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T	
HLB-1		GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C	
HLB-2	Hemolisina B	GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT	RN4420
mpHLG-1	Hemolisina gama	GTC AAA GAG TCC ATA ATG CAT TTA A	N315
mpHLG-2		CAC CAA ATG TAT AGC CTA AAG TG	

3.2.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes de adesinas e dos genes relacionados à produção de biofilme

Foram utilizados 12 pares de iniciadores para a amplificação dos genes codificadores de adesinas e relacionados à produção de biofilme, conforme demonstrado na tabela 4 (TRISTAN *et al.*, 2003; VANCRAEYNEST *et al.*, 2004). Como controle interno para todas as reações de PCR foi utilizado o par de *primers arcC*, referente ao gene da proteína carbamato quinase. Para a amplificação das estruturas gênicas foram utilizadas as seguintes condições. Um volume final de 25µL de uma mistura contendo 2µL da solução de DNA extraído conforme descrito em 3.2.2; 0,5 unidade de Taq DNA polimerase

(Fermentas); 2,5µL do tampão concentrado fornecido com a enzima; os seguintes reagentes com suas respectivas concentrações finais: MgCl₂ a 2,5mM, cada dNTP a 200µM e os iniciadores a 250nM. As reações foram amplificadas em um termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 com as seguintes condições para os genes *bbp*, *cna*, *eno*, *ebp*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *clfA* e *clfB*: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de trinta ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. Essas mesmas condições foram utilizadas para os genes *icaA*, *icaD* e *bap*, com exceção das temperaturas de anelamento que foram para esses, 47°, 46° e 52°, respectivamente. A visualização e análise dos fragmentos de DNA amplificados na reação da PCR foram realizadas conforme descrito no item 3.2.4.

Como controles positivos foram utilizadas as cepas: ATCC 25923 para os genes *bbp*, *cna*, *eno* e *ebp*; N315 para os genes *icaA* e *icaD* e, para os genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB* e *fib*, algumas cepas da nossa coleção que tiveram seus produtos de PCR seqüenciados e comparados com as seqüências publicadas no GenBank (números de acesso Z18852, AJ224764, X95848, X62992 e X72014, respectivamente) com a utilização do *software Blast*.

Tabela 4 – Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de adesinas e biofilmes

Iniciador	Proteína	Seqüência (5'-3')	Tamanho dos fragmentos
BBP-1	Proteína ligadora de	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	575 pb
BBP-2	sialoproteína óssea	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT	
CNA-1	Proteína ligadora de	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423 pb
CNA-2	colágeno	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	
ENO-1	Proteína ligadora de	ACGTGCAGCAGCTGACT	302 pb
ENO-2	laminina	CAACAGCATCTTCAGTACCTTC	
EBP-1	Proteína ligadora de	CATCCAGAACCAATCGAAGAC	186 pb
EBP-2	elastina	CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTG	
FNBA-1	Proteína A ligadora de	GTGAAGTTTTAGAAGGTGGAAAGAITAG	643 pb
FNBA-2	fibronectina	GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC	
FNBB-1	Proteína B ligadora de	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	524 pb
FNBB-2	fibronectina	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTTC	
FIB-1	Proteína ligadora de	CTACAACTACAATTGCCGTCAACAG	404 pb
FIB-2	fibrinogênio	GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC	
CLFA-1	<i>Clumping factor A</i>	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292 pb
CLFA-2		CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTG	
CLFB-1	<i>Clumping factor B</i>	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC	205 pb

CLFB-2		TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC	
ICAA-1	Gene A de adesão	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1 kb
ICAA-2	intercelular	AAGATATAGCGATAAGTGC	
ICAD-1	Gene D de adesão	AAACGTAAGAGAGGTGG	450 pb
ICAD-2	intercelular	GGCAATATGATCAAGATAC	
BAP-1	Proteína associada à	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG	220 pb
BAP-2	formação de biofilme	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	

3.2.12 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para tipagem do sistema *agr*

Para a pesquisa do grupo *agr* de *S. aureus* foram utilizados iniciadores específicos, sendo um universal e, portanto, comum para os quatro tipos de *agr*, o Pan. Esse e os outros quatro iniciadores específicos para cada um dos tipos de *agr* (GILOT *et al.*, 2002) encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Iniciadores para tipagem do sistema regulatório *agr*

Iniciador	Sequência (5'-3')	Cepas padrão
Pan	ATG CAC ATG GTG CAC ATG C	
<i>agr1</i>	GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT	10/8520
<i>agr2</i>	TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC	N315
<i>agr3</i>	GTA ATG TAA TAG CTT GTA TAA TAA TAC CCA G	ATCC 25923
<i>agr4</i>	CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG	

As reações foram amplificadas no termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 com as seguintes condições: um ciclo de 94°C a 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C a 1 minuto, 57°C a 1 minuto e 70°C a 1 minuto. As reações foram concluídas com um ciclo de 72°C a 5 minutos. A visualização e análise dos fragmentos de DNA amplificados na reação da PCR foram realizadas conforme descrito no item 3.2.4.

Resultados

4.1 Identificação fenotípica das cepas de estafilococos coagulase positivos

As 70 cepas de estafilococos coagulase positivos, sendo 52 provenientes de bovinos e 18 de ovinos, foram identificadas com base nos resultados da coloração de Gram e de testes fenotípicos. Desse total, 64 cepas foram identificadas como *S. aureus*, 4 como *S. intermedius*, 1 como *S. schleiferi spp coagulans* e 1 como *S. delphini*.

4.2 Confirmação genotípica da espécie por meio da detecção do gene *nuc*

Todas as cepas foram submetidas à confirmação da espécie por meio da identificação do gene *nuc* empregando-se *primers* específicos para a identificação de *S. aureus* e de *S. intermedius*. Das 70 cepas identificadas fenotipicamente como estafilococos coagulase positivos, 64 foram confirmadas genotipicamente como *S. aureus* e 4 como *S. intermedius* e as amplificações resultaram em fragmentos de aproximadamente 200 pb para as duas espécies. As cepas de *S. schleiferi spp coagulans* e *S. delphini* permaneceram com as identificações fenotípicas como descrito anteriormente. Como controles positivos para *S. aureus* foram utilizadas as cepas ATCC 25923 e N315. Essas mesmas cepas foram usadas como controles negativos para *S. intermedius*, na ausência de um controle positivo para essa espécie.

4.3 Determinação das linhagens de *S. aureus* e demais coagulase positivos por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

4.3.1 Amostras bovinas provenientes das fazendas do Município de Nova Odessa - SP

A análise do perfil de restrição do DNA das cepas de *S. aureus* provenientes de bovinos e insufladores por eletroforese de campo pulsado (PFGE) mostrou uma diversidade clonal maior na fazenda A. Foi possível identificar a ocorrência de 20 perfis clonais distintos entre 29 isolados, sendo 3 perfis provenientes de isolados de amostras de leite, 11

de óstios bovinos e 6 de insufladores. Um isolado proveniente de insuflador obtido no período de outubro de 2005 a abril de 2006 apresentou o mesmo perfil clonal de outro isolado, também obtido de um insuflador, em coleta realizada dois anos antes, abril de 2004. Na fazenda B, os três isolados *S. aureus* provenientes de amostras de leite apresentaram o mesmo perfil clonal, também encontrado em isolados do leite na fazenda A. Na fazenda C, observou-se a ocorrência de um único perfil clonal entre os 14 *S. aureus* isolados do leite, sendo 13 clones idênticos. Apenas uma cepa apresentou 90%, e não 100% de similaridade, com os demais isolados desse perfil clonal. Não houve relação clonal entre os isolados das amostras de leite, do óstio e de insufladores.

Com relação aos demais estafilococos coagulase positivos, todos provenientes de óstios de animais distintos da fazenda A, foi possível determinar os perfis clonais dos isolados *S. schleiferi spp coagulans* e *S. delphini*. Quanto aos isolados de *S. intermedius*, observou-se que dois apresentaram perfis clonais distintos e que as duas outras cepas dessa mesma espécie apresentaram resultados inconclusivos por PFGE, caracterizados por ausência de bandas ou “borrões”.

Coluna 1 – peso molecular (PM); colunas 2 a 8 – perfis clonais (D, E, F, G e H) das linhagens provenientes de insufladores da fazenda A; colunas 9, 11, 12 e 13 - perfis clonais (I, J, K e L, respectivamente) das linhagens provenientes de óstios bovinos da fazenda A; colunas 10, 14 e 15 – linhagens provenientes de óstios bovinos da fazenda A não tipáveis por PFGE (NT) com utilização da enzima de restrição SMAI.

Figura 1 – Perfis de restrição (PFGE) do DNA das cepas resistentes à oxacilina com utilização da enzima de restrição SMAI

Colunas 1 e 15 – peso molecular (PM); colunas 2, 3, 4, 5 e 10 – perfil clonal (A) das linhagens provenientes de leite mastítico da fazenda A; colunas 6, 7, 8 e 9 - perfil clonal (B) das linhagens provenientes de leite mastítico da fazenda A; colunas 11 a 13 – perfil clonal (B) das linhagens provenientes de leite mastítico da fazenda B; coluna 14 – perfil clonal da cepa padrão ATCC 25923.

Figura 2 – Perfis de restrição (PFGE) do DNA das cepas provenientes de amostras de leite mastítico bovino das fazendas A e B com utilização da enzima de restrição SMAI

Coluna 1 – peso molecular (PM); colunas 2 a 15 - perfil clonal (C) das linhagens provenientes de leite mastítico da fazenda C; coluna 6 – clone C' com uma banda de diferença em relação às outras linhagens desse perfil clonal.

Figura 3 – Perfis de restrição (PFGE) do DNA das cepas provenientes de amostras de leite mastítico bovino da fazenda C com utilização da enzima de restrição SMAI

Figura 4 – Dendrograma das cepas coagulase positivas provenientes de bovinos e insufladores – SP

4.3.2 Amostras ovinas provenientes da região do agreste do Município de Garanhuns - PE

A análise do perfil de restrição do DNA das cepas de *S. aureus* provenientes de ovinos por eletroforese de campo pulsado (PFGE) mostrou a ocorrência de quatro perfis clonais distintos, sendo três associados tanto a casos de mastite clínica como subclínica e o outro perfil apenas a casos de mastite subclínica. Entre os isolados de mastite clínica, a ocorrência do perfil clonal Q foi maior, seguido dos perfis P e R, correspondendo a 3, 2 e 1 isolados, respectivamente. O perfil clonal S não foi identificado em casos da forma mais severa de manifestação da mastite. Quanto à distribuição dos perfis clonais em casos de mastite subclínica, observou-se maior frequência do perfil P, associado a cinco isolados e seguido dos perfis Q (clone mais freqüente nos casos de mastite clínica) e S, cada um correspondendo a três isolados. Somente um isolado proveniente de mastite subclínica apresentou o perfil clonal R.

Figura 5 – Dendrograma das cepas *S. aureus* provenientes de ovinos – PE

4.4 Antibiograma

A análise dos resultados dos antibiogramas permitiu a classificação dos isolados em seis perfis de susceptibilidade. O perfil 1 indica que a cepa é sensível a todas as drogas testadas. O perfil 2 é caracterizado por resistência à penicilina e ampicilina e sensibilidade aos demais antibióticos. Os perfis 3, 4, 5 e 6 incluem os isolados resistentes à oxacilina em ordem crescente de redução de sensibilidade aos demais antimicrobianos. Observou-se que os perfis com maior sensibilidade, 1 e 2, foram identificados apenas em isolados *S. aureus* de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, o que corresponde a 49,4% do total de isolados provenientes das fazendas do Estado de São Paulo. Os outros 50,6% incluem as ORSA e demais estafilococos coagulase positivos resistentes à oxacilina. O perfil 3 foi o mais freqüente entre esses isolados resistentes à oxacilina, associado a 14 perfis clonais distintos. Todas as cepas *S. aureus* provenientes de leite de ovinos da região do agreste do Estado de PE apresentaram o perfil 1.

Tabela 6 - Perfis de susceptibilidade dos isolados provenientes de bovinos e ovinos

P	Drogas testadas															Perfil
	AMP	OX	KF	VA	CN	AK	E	OFX	SXT	TE	C	AZI	DA	SAM	SUL	
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	3
R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	4
R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	5
R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	6

P: penicilina 10U; AMP: ampicilina 10µg; OX: oxacilina 1µg; KF: cefalotina 30µg; VA: vancomicina 30µg; CN: gentamicina 120µg; AK: amicacina 30µg; E: eritromicina 15µg; OFX: ofloxacina 5µg; SXT: sulfazotrin 25µg; TE: tetraciclina 30µg; C: cloranfenicol 30µg; AZI: azitromicina 15mcg; DA: clindamicina 2µg; SAM: ampicilina e sulbactam 20µg; SUL: sulfonamida 300mcg.

Tabela 7 - Distribuição dos perfis de susceptibilidade dos isolados provenientes de leite e óstios bovinos e de insufladores das fazendas do município de Nova Odessa – SP

Perfis de susceptibilidade	Perfis clonais obtidos por PFGE			Ocorrência entre os isolados (%)
	Leite	Óstio	Insuflador	
1	A e B			22,8
2	C			26,6
3	M	I, J, K, L, N, O, P, Q e NT*	D, E, F, G e H	39,9
4			E	1,9
5		S	R	3,8
6		T e U		3,8

*(NT): isolados não tipáveis por PFGE com utilização da enzima de restrição SMAI.

4.5 Confirmação da resistência à oxacilina

Os resultados positivos de resistência à oxacilina pela técnica de discos foram confirmados por *screening* para todos os isolados que apresentaram perfis de susceptibilidade 3, 4, 5 e 6, com exceção das espécies *S. schleiferi spp coagulans* e *S. delphini*.

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina

A maioria das cepas (70%) com resistência confirmada tanto pela técnica de discos como pelo *screening* em ágar Müller-Hinton apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) entre 1 e 8µg/mL, enquanto 25% apresentaram 12µg/mL e 5%, 16µg/mL.

CIM de 6µg/mL

CIM de 8µg/mL

CIM de 12µg/mL

Figura 6 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina apresentados pelas cepas BORSA

4.7 Determinação da presença do gene *mecA*

Foram realizados testes genotípicos para a determinação do gene *mecA* das cepas com resistência à oxacilina e os resultados obtidos foram negativos para todos os isolados.

4.8 Fatores de virulência, grupo *agr* e os perfis clonais (PFGE) de *S. aureus* e outras espécies coagulase positivas provenientes de leite e óstios bovinos e de insufladores

Tabela 8 - Distribuição dos genes codificadores dos fatores de virulência e grupo *agr* entre os perfis clonais (PFGE) de *S. aureus* e outras espécies coagulase positivas provenientes de leite e óstios bovinos e de insufladores

Origem	Perfil (PFGE)	Grupo <i>agr</i>	Adesinas e genes relacionados à produção de biofilme	Citotoxinas e Toxinas com atividade de superantígenos	Ocorrência nos isolados (%)
Leite mastítico	A	NI	<i>clfA</i>	<i>lukED</i>	10,0
Leite mastítico	B	NI	<i>clfA</i> e <i>eno</i>	-	14,0
Leite mastítico	C	II	<i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>eno</i> , <i>fnbA</i> , <i>fib</i> e <i>icaD</i>	<i>lukED</i> , <i>hla</i> e <i>hly</i>	28,0
Leite mastítico	M	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Insuflador	D	II	<i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>eno</i> , <i>fnbA</i> , <i>fib</i> , <i>icaD</i> e <i>icaA</i>	<i>lukED</i> , <i>hla</i> , <i>hly</i> e <i>eta</i>	2,0
Insuflador	E	NI	<i>clfA</i> e <i>icaD</i>	<i>eta</i> *	4,0
Insuflador	F	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Insuflador	G	NI	<i>clfA</i> e <i>icaD</i>	<i>eta</i>	4,0
Insuflador	R	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Insuflador	H	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Óstio	I	NI	<i>clfA</i>	<i>eta</i>	2,0
Óstio	J	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Óstio	K	NI	-	-	2,0
Óstio	L	NI	-	-	2,0
Óstio	N	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Óstio	O	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Óstio	P	NI	-	-	2,0
Óstio	Q	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Óstio	S	NI	-	-	2,0
Óstio	T	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Óstio	U	NI	<i>clfA</i>	-	2,0
Óstio	---	NI	-	-	4,0
Leite mastítico e Óstio	---	III**	<i>clfA</i>	-	8,0

(NI) Não identificado como os tipos *agr* I, II, III e IV; (---) Perfil não determinado por PFGE; * gene encontrado em apenas um dos dois isolados com o perfil clonal E; ** tipo *agr* encontrado em dois dos quatro isolados *S. aureus* sem identificação do perfil clonal; perfis clonais marcados com cinza correspondem às outras espécies coagulase positivas diferentes de *S. aureus*.

4.8.1 Genes relacionados à adesão e formação de biofilme

Em relação às fazendas do Estado de SP, a análise genotípica do conteúdo de adesinas e proteínas associadas à formação de biofilme mostrou a ocorrência desses genes em todas as cepas *S. aureus* provenientes de óstios bovinos, do leite e de insufladores. Os perfis clonais C e D se destacaram em relação aos demais por apresentar pelo menos 50% dos genes pesquisados relacionados à adesão e formação de biofilme e foram associados ao grupo *agr* II. O perfil clonal C foi encontrado em 14 isolados do leite da fazenda C e o perfil clonal D, identificado em uma única cepa proveniente de insuflador da fazenda A. O grupo *agr* III foi identificado em apenas dois isolados de animais diferentes da fazenda A, um proveniente do leite e outro do óstio, ambos portadores de um único gene codificador de adesina. Os grupos I e IV de *agr* não foram identificados em nenhum dos isolados.

Os genes *clfA* (receptor para fibronectina) e *eno* (proteína ligadora de laminina) foram os mais frequentes. O gene *clfB* (receptor para fibronectina) foi exclusivo dos isolados associados aos perfis clonais C e D, assim como o gene *fib* (proteína ligadora de fibrinogênio). Pelo menos um dos dois genes para receptores de fibronectina (*clfA*, *clfB*) foi encontrado entre os isolados. Quanto aos genes envolvidos com a produção de biofilme, *icaD* foi o mais frequente, ao contrário de *icaA*, encontrado apenas em um isolado, ao lado de *icaD*. Os genes *bbp* (receptor para sialoproteína óssea), *ebpS* (proteína ligadora de elastina), *cna* (proteína ligadora de colágeno), *fnbB* (proteína ligadora de fibronectina) e *bap* (proteína relacionada à formação de biofilme) não foram identificados em nenhum dos isolados.

4.8.2 Genes codificadores de citotoxinas e toxinas com atividade de superantígenos

Ainda em relação às fazendas do Estado de SP, a pesquisa dos genes relacionados à produção de exotoxinas revelou que o perfil clonal predominante na fazenda C - o perfil C - é portador dos genes codificadores das hemolisinas A e B e da leucocidina LukED. O perfil clonal D, encontrado em outra fazenda, apresentou os mesmos genes do perfil C e, também, o gene *eta*. Esse gene, codificador da toxina esfoliativa A, foi encontrado em aproximadamente 10% dos isolados, sendo todos *S. aureus* e associados com os perfis D,

E, G e H determinados por PFGE. Não houve uma relação entre esses portadores do gene *eta* e um grupo *agr* específico, ao contrário dos perfis clonais C e D, caracterizados pela presença de múltiplos genes codificadores de exotoxinas e associados ao grupo II de *agr*. O perfil clonal A foi associado apenas à presença do gene codificador da leucocidina LukED. Não foram identificados portadores da gama-hemolisina e dos genes codificadores da toxina bi-componente Panton-Valentine (PVL) e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). A ausência dos genes para as enterotoxinas A-E foi outra característica dessas cepas.

4.9 Fatores de virulência e os perfis clonais (PFGE) dos demais estafilococos coagulase positivos provenientes de bovinos

Foi possível determinar a ocorrência de quatro perfis clonais por PFGE entre os seis isolados coagulase positivos diferentes de *S. aureus*, provenientes de óstios bovinos distintos. Dois desses perfis clonais foram associados a cepas de *S. intermedius*, um ao isolado *S. schleiferi spp coagulans* e outro ao *S. delphini*. Os seis isolados apresentaram resultados negativos tanto para os genes codificadores de adesinas e aqueles envolvidos com a produção de biofilme como para os genes determinantes de exotoxinas. A única exceção foi um isolado *S. intermedius* que teve fragmentos amplificados para os genes *clfA* e *icaD*, porém com tamanhos diferentes do esperado, 700 pb e 800 pb, respectivamente, ao contrário de 292 pb e 450 pb. A identificação do grupo *agr* não se aplica para *S. schleiferi spp coagulans* e *S. delphini* e os isolados da espécie *S. intermedius* foram negativos para os grupos I, II, III e IV desse sistema regulador.

4.10 Fatores de virulência, grupo *agr* e os perfis clonais (PFGE) de *S. aureus* provenientes de ovinos

Tabela 9 - Distribuição dos genes codificadores dos fatores de virulência e grupo *agr* entre os perfis clonais (PFGE) de *S. aureus* provenientes de ovinos

Origem	Perfil (PFGE)	Grupo <i>agr</i>	Adesinas e genes relacionados à produção de biofilme	Citotoxinas e Toxinas com atividade de superantígenos	Ocorrência nos isolados (%)
m. clínica	P	I	<i>clfA</i>	<i>hla</i> , <i>lukED</i> e <i>tst</i>	11,1
m. subclínica	P	I	<i>clfA</i>	<i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>lukED</i> e <i>sec</i>	27,5
m. clínica	Q	II	<i>clfA</i> e <i>clfB</i>	<i>hla</i> e <i>lukED</i>	16,6
m. subclínica	Q	II	<i>clfA</i> e <i>clfB</i>	<i>hla</i> , <i>lukED</i> , <i>tst</i> e <i>sec</i>	16,6
m. clínica	R	I	<i>clfA</i> e <i>icaD</i>	<i>hla</i> e <i>lukED</i>	5,5
m. subclínica	R	I	<i>clfA</i> e <i>icaD</i>	<i>lukED</i>	5,5
m. subclínica	S	II	<i>clfA</i>	-	16,6

4.10.1 Genes relacionados à adesão e formação de biofilme

Em relação à região do agreste do Estado de PE, os isolados *S. aureus* provenientes de ovinos de um mesmo perfil clonal não apresentaram diferenças quanto ao conteúdo genético relacionado às adesinas e proteínas associadas à formação de biofilme considerando a severidade da mastite. A presença do gene *clfA* foi identificada em 100% das cepas. Em associação a esse gene, os isolados de perfil clonal Q apresentaram, também, o *clfB* (receptores para fibronectina), independente de sua ocorrência em mastite clínica ou subclínica. O mesmo ocorreu com os isolados de perfil clonal R, foram portadores da combinação *clfA* (receptores para fibronectina) e *icaD* (adesão intercelular), independente da forma de manifestação da doença.

Quanto ao sistema *agr*, tanto o grupo I como o II foram associados aos casos de mastites clínica e subclínica. Os grupos III e IV não foram encontrados em nenhum dos isolados. Os genes *bbp* (receptor para sialoproteína óssea), *ebpS* (proteína ligadora de elastina), *cna* (proteína ligadora de colágeno), *fmbB* (proteína ligadora de fibronectina), *icaA*

e *bap* (proteínas relacionadas à formação de biofilme) não foram identificados em nenhum dos isolados.

4.10.2 Genes codificadores de citotoxinas e toxinas com atividade de superantígenos

Ainda em relação à região do agreste do Estado de PE, observou-se entre os isolados *S. aureus* provenientes de ovinos uma alta frequência dos genes *hla* e *lukED*, 77,6 e 83,1%, respectivamente. No entanto, não houve uma relação específica entre a presença desses genes com a severidade da mastite. Da mesma forma, não foi possível determinar se uma combinação maior dos genes associados às exotoxinas relaciona-se com a mastite clínica ou subclínica. No caso dos isolados associados aos perfis clonais P e Q, presentes nas duas formas de manifestação da doença, observou-se maior combinação dos genes codificadores de exotoxinas naqueles provenientes de mastite subclínica e o contrário foi observado para o perfil clonal R. Os isolados associados a esse perfil apresentaram maior combinação desses genes em casos de mastite clínica. Quanto às enterotoxinas estafilocócicas, foi identificada a presença do gene *sec*, codificador da enterotoxina tipo C, em 44,4% dos isolados. Outro gene determinante de toxina com atividade de superantígeno, o *tst*, foi encontrado em 27,7% dos isolados, sendo que em 16,6% desses estava associado ao gene *sec*.

Não houve uma relação específica entre os grupos *agr* I e II, identificados nas cepas provenientes de ovinos, e as combinações dos genes codificadores de citotoxinas e de toxinas com atividade de superantígenos. Não foram encontrados portadores de *hlg* (gama-hemolisina), *pvl* (genes codificadores da toxina bi-componente Panton-Valentine) e dos genes *sea*, *seb*, *sed* e *see* (enterotoxinas A, B, D e E).

5. Discussão

As linhas de ordenha mecânica são importantes fontes para a transmissão de *Staphylococcus spp* em rebanhos leiteiros, uma vez que esses equipamentos podem estar contaminados com bactérias provenientes da pele do teto do animal, do leite ou de manipuladores humanos. A análise dos resultados obtidos por meio da eletroforese de campo pulsado (PFGE) mostrou alta diversidade genética entre as linhagens de *S. aureus* isoladas de amostras de leite mastítico bovino, do óstio dos tetos desses animais e dos insufladores analisados de uma das três fazendas de exploração leiteira selecionadas para a realização desse trabalho, a fazenda A.

Por outro lado, o perfil clonal B, associado aos três isolados *S. aureus* provenientes de amostras de leite mastítico de outra fazenda, designada como fazenda B, também foi encontrado em amostras de leite da fazenda A, indicando possível transmissão cruzada desta linhagem entre os animais das duas fazendas.

Na fazenda C houve a ocorrência de um perfil clonal (C) predominante entre as linhagens de *S. aureus*. Os isolados associados a esse perfil são provenientes de amostras de leite coletadas de nove animais diferentes portadores de mastite subclínica, um indicativo de disseminação clonal por possível falta de condições adequadas de higiene durante a ordenha. Esse perfil clonal (C) correspondeu a 28% do total de isolados do Estado de SP e caracterizou-se pela presença de genes codificadores de hemolisinas, leucotoxinas, adesinas e genes relacionados à formação de biofilme. Ao lado do perfil clonal D, obtido de um insuflador e encontrado em apenas 2% do total de isolados, foi o que apresentou maior combinação dos fatores de virulência.

Quanto aos insufladores, foi possível detectar, entre outros diferentes perfis, a ocorrência de dois isolados *S. aureus* pertencentes a um mesmo perfil clonal (G), sendo um deles identificado em coleta realizada nos mesmos equipamentos dois anos antes do período de coleta do atual isolado. Como os insufladores foram trocados nesse período de tempo, pode-se inferir a presença de *S. aureus* nas canulações ou contaminações recorrentes. Considerando as três fontes de origem das cepas, o óstio dos tetos bovinos foi o ambiente que apresentou maior diversidade clonal, levando a acreditar que sejam bactérias da própria microbiota do animal ou, talvez, contaminação humana.

Em relação às outras espécies coagulase positivas diferentes de *S. aureus*, todas originadas de óstios bovinos, foi possível determinar os perfis clonais dos isolados *S. schleiferi spp coagulans* e *S. delphini* e identificar a ocorrência de dois perfis distintos entre as linhagens de *S. intermedius*. No entanto, para duas cepas dessa espécie, assim como para quatro isolados *S. aureus* - sendo um proveniente do leite e três de óstios bovinos - todos da mesma fazenda, observou-se ausência de bandas no gel submetido à eletroforese de campo pulsado. Esses resultados podem ser consequência de uma nova enzima presente nesses isolados que promove a metilação do DNA nos sítios de atuação da enzima de restrição SMAI, impedindo, dessa forma, a tipagem dos isolados com essa característica pela técnica de PFGE. Atualmente, uma considerável proporção dos casos de mastite deve-se à ocorrência cada vez mais freqüente de linhagens genomicamente diversificadas e portadoras de múltiplos fatores de virulência, associadas tanto a hospedeiros animais como humanos. Linhagens não tipáveis por PFGE e denominadas, por essa razão, de NT-MRSA (*non-typable methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e NT-MSSA (*non-typable methicillin-sensible Staphylococcus aureus*) têm sido associadas em pesquisas recentes ao complexo clonal ST398 definido por MLST (BENS *et al.*, 2006) e sua ocorrência tem aumentado significativamente tanto entre porcos e fazendeiros que trabalham com esses animais como em pacientes com bacteremia, sugerindo que essas linhagens são bastante virulentas (BELKUM *et al.*, 2008). Os isolados deste estudo não tipáveis por PFGE, ao contrário, apresentaram um reduzido número de genes codificadores dos fatores de virulência aqui pesquisados.

Quanto aos isolados *S. aureus* provenientes de ovinos, foi possível determinar quatro perfis clonais por PFGE. Desses, três foram comuns aos casos de mastite clínica e subclínica (perfis P, Q e R) e como apenas 33,2% das amostras foram isolados de mastite clínica não podemos fazer a associação desses perfis com a severidade da doença. Somente o perfil S foi exclusivo de mastite subclínica e, ao contrário dos outros perfis clonais, foi o que apresentou menor número de genes codificadores dos fatores de virulência.

A análise genotípica do conteúdo de adesinas e proteínas associadas à formação de biofilme mostrou uma distribuição desses genes em 100% dos isolados *S. aureus* provenientes de leite mastítico bovino, do óstio dos tetos desses animais e de insufladores.

A combinação dos fatores de virulência dos isolados *S. aureus* originados do óstio, independente do perfil clonal, foi caracterizada pela pouca ocorrência dos genes relacionados ao processo de colonização. Diferentes perfis clonais encontrados nesse ambiente apresentaram uma característica em comum, foram portadores apenas do gene *cflA*. Isso pode sugerir que esses isolados não estejam relacionados com o estabelecimento da mastite ou que essa relação aconteça por meio de outros fatores não pesquisados neste estudo. Pode-se supor, ainda, que essa característica seja uma adaptação da bactéria ao ambiente do canal do teto bovino e do úbere, que por incluir a presença de leite durante a lactação, entre outros fatores, difere de outros sítios comuns de infecção e pode contribuir com as diferenças apresentadas por essas linhagens em relação aos genes codificadores de proteínas expressas na superfície. Apenas um isolado proveniente do óstio foi portador de outro gene além do *cflA*, o *eta*, codificador da toxina esfoliativa, o que pode ser um indício de contaminação humana.

Quanto aos isolados *S. aureus* provenientes do leite mastítico e dos insufladores, dois perfis clonais se destacaram quanto ao conteúdo genético relacionado ao processo de colonização. O perfil clonal D, representado por um único isolado, apresentou maior combinação dos genes codificadores dessas proteínas, seguido do perfil C, associado a quatorze isolados de outra fazenda. Uma combinação caracterizada pela presença dos genes codificadores das proteínas que se ligam ao fibrinogênio, fibronectina, laminina e dos genes relacionados à adesão intercelular diferencia os perfis clonais C e D dos demais isolados pela multiplicidade dos fatores de virulência. Nesse estudo, o gene *fnbA*, codificador da proteína ligadora de fibronectina, foi exclusivo desses dois perfis clonais e o gene *fnbB* não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas. Segundo PEACOCK *et al* (2002), *fnbA* (proteína ligadora de fibronectina) e *cna* (proteína ligadora de colágeno) são os genes de adesinas relacionadas à parede celular associados com maior frequência a isolados invasivos humanos. Os perfis clonais C e D, identificados aqui, apresentaram o gene *fnbA* e, também, *fib* e *eno*, codificadores das proteínas ligadoras de fibrinogênio e laminina, respectivamente, o que sugere que esses isolados tenham vantagens em relação aos demais quanto à capacidade de invadir tecidos. A combinação dos fatores de virulência dos isolados com perfis C e D é ainda mais acentuada pela presença dos genes envolvidos com a produção de biofilme. O potencial genético relacionado à adesão desses dois perfis difere

apenas pela presença do gene *icaA* no clone D e ausente no C, portador apenas de *icaD*. Esses genes fazem parte de um operon e codificam as principais proteínas envolvidas na formação do biofilme. Os genes *ica* foram pouco frequentes entre os demais tipos clonais. Além dos isolados associados aos perfis C e D, apenas duas cepas originadas de insufladores e associadas ao perfil clonal E apresentaram o gene *icaD*. As cepas produtoras de biofilme têm maior capacidade de colonização quando comparadas com cepas não produtoras (VANCRAEYNEST *et al.*, 2004).

Os perfis clonais C e D foram encontrados em fazendas distintas, mas localizadas no mesmo município e com alguns funcionários em comum. O perfil clonal D, por ser um isolado de insuflador, pode ter origem humana e ser um indício de contaminação desse equipamento utilizado no processo de ordenha. Quanto ao perfil clonal C, a sua ocorrência em amostras de leite mastítico de nove animais diferentes de uma mesma fazenda pode sugerir uma fonte comum de infecção ou que a combinação dos fatores de virulência, característica desse perfil, constitui um genótipo frequente entre os *S. aureus* isolados desses animais.

Ainda com relação à produção de biofilme, a ausência do gene *bap* - codificador de uma proteína associada a esse fator de virulência - entre as cepas analisadas condiz com as observações de VAUTOR *et al* (2008) que relataram baixa incidência desse gene em outras coleções de linhagens animais. Tem sido relatado que isolados animais preferencialmente carregam o gene *bap* em uma SaPI (TORMO *et al.*, 2005), o que sugere ausência de transferência horizontal desse elemento genético entre as cepas deste estudo com outros portadores dessa ilha de patogenicidade. As cepas formadoras de biofilme analisadas aqui, caso expressem esse fenótipo, provavelmente utilizam o mecanismo regular dependente de PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*), codificada pelo operon *ica*.

Em relação às duas cepas de *S. aureus* de mesmo perfil clonal provenientes de insufladores e obtidas em diferentes períodos de coleta, a análise da combinação dos fatores de virulência revelou, no primeiro isolado, apenas a presença do gene *cflA*, enquanto o outro isolado obtido posteriormente apresentou também os genes *icaD* e *eta*, ao lado do *cflA*, o que pode sugerir o envolvimento desses genes com a persistência bacteriana.

Os genes *clfA* (proteína ligadora de fibrinogênio) e *eno* (proteína ligadora de laminina) foram os mais frequentes entre os isolados deste trabalho. Quanto ao gene *clfA*,

os resultados obtidos aqui assemelham-se às análises de KALOREY *et al* (2007) que revelaram a presença desse gene em 100% dos isolados em uma investigação de determinantes de virulência de *S. aureus* provenientes de casos de mastite bovina subclínica. Em relação aos *S. aureus* provenientes de ovinos do presente estudo, também se observou a ocorrência do gene *cflA* em 100% dos isolados, sugerindo que a participação desse gene no processo de colonização e estabelecimento da mastite independe do tipo de hospedeiro. Associado ao gene *cflA*, os perfis clonais de ovinos Q e R apresentaram, também, o genes *cflB* e *icaD*, respectivamente, e essas combinações foram identificadas tanto em isolados de mastite clínica quanto subclínica do mesmo perfil clonal.

A ausência do gene *cna*, codificador da proteína ligadora de colágeno, nos isolados deste trabalho está de acordo com SMELTZER *et al* (1997) que relataram que linhagens *S. aureus* animais geralmente não possuem esse gene. Em um estudo recente de caracterização e comparação genotípica de isolados *S. aureus* de amostras humanas, de mastite bovina subclínica e de alimentos (REINOSO *et al.*, 2008), a detecção de *cna* foi somente efetuada para cinco linhagens humanas.

As combinações de exotoxinas estafilocócicas e a quantidade em que são secretadas podem definir o potencial patogênico da bactéria. A maioria das linhagens estafilocócicas bovinas produzem alfa e beta-hemolisinas (AARESTRUP *et al.*, 1999) e algumas toxinas da família das leucocidinas (RAINARD *et al.*, 2003). Essas exotoxinas formadoras de poros induzem trocas pré-inflamatórias em células de mamíferos, inativando o sistema imune por seu efeito citotóxico direto e degradando tecidos, o que provê, dessa forma, a bactéria com nutrientes facilitando a sua dispersão em novos sítios (PROJAN & NOVICK 1997). Por atuar dessa forma, alguns autores sugerem que a alfa-toxina, codificada pelo gene *hla*, possa estar envolvida com mastite bovina gangrenosa (ANDERSON 1983), mas as relações entre essa toxina e a forma de manifestação clínica da doença continuam sendo debatidas.

Segundo uma pesquisa recente (HAVERI *et al.*, 2008), os genes para as hemolisinas alfa, gama e beta foram encontrados em 97.4%, 88.8% e 76.7%, respectivamente, em linhagens isoladas de casos de mastite bovina, sendo que 64,6% foram positivas para todas as hemolisinas. Ainda nessa pesquisa, um total de 43 combinações de genes de virulência

foi observado, sendo a mais prevalente caracterizada pela associação de *hla*, *hly*, *hld*, *hlg* e *lukED*. Os resultados do presente estudo diferem dos obtidos por HAVERI *et al* (2008) tanto em relação à alta frequência dos genes codificadores das hemolisinas estafilocócicas entre os isolados como pela associação prevalente caracterizada por múltiplos genes de hemolisinas e leucotoxinas. A presença de *lukED* foi exclusiva para os isolados *S. aureus* provenientes das amostras de leite e de insufladores, sendo a associação desse gene com *hla* e *hly* identificada apenas nos perfis clonais C e D. As linhagens originadas do óstio foram caracterizadas pela ausência desses genes.

A alta frequência dos genes codificadores de hemolisinas pode indicar que os mesmos são essenciais para a patogênese de *S. aureus* em bovinos. No entanto, a produção de alfa ou beta-hemolisinas pode ser desnecessária para causar infecções intramamárias bovinas, pois linhagens sem esses genes têm sido encontradas nesse tipo de infecção (AKINEDEN *et al.*, 2001) de acordo com parte dos resultados obtidos no presente estudo - 53% dos isolados não apresentaram nenhum gene codificador dessas hemolisinas. Também não foram identificados portadores de *hlg* (gama-hemolisina), gene encontrado com muita frequência em isolados de mastite bovina.

Um estudo mostrou que a beta-hemolisina foi produzida em 72% de isolados de mastite bovina, em 11% de isolados nasais de humanos saudáveis e em 13% de isolados de casos de septicemia humana. O fato de a maioria das linhagens de *S. aureus* provenientes de bovinos carregarem o gene para a beta-hemolisina, em oposição às linhagens originadas de humanos (AARESTRUP *et al.*, 1999), sugere que *S. aureus* beta-hemolítico pode ser mais patogênico ao gado do que a mesma espécie sem esta hemolisina, o que poderia aumentar a preocupação com os perfis clonais C e D - identificados neste estudo como os únicos portadores desse gene.

A distribuição do gene codificador da beta-hemolisina entre *S. aureus* provenientes de mastite bovina foi observada em 97% das cepas analisadas (449 de 462) em um estudo (LARSEN *et al.*, 2002) que envolveu isolados de nove países europeus e dos EUA. Essas cepas foram positivas na análise genotípica por PCR ou produziram beta-hemolisina em ágar sangue a 5%, independente da variação geográfica. Com exceção de um pequeno número de *S. aureus* provenientes da Inglaterra, os isolados com resultados positivos por PCR expressaram a toxina em ágar sangue. Ao contrário e de forma curiosa, quase todos

os isolados originados da Noruega foram negativos genotipicamente, mas apresentaram uma β -hemólise diferenciada em ágar sangue. Isso pôde ser explicado pela ocorrência de pequenas variações na sequência do DNA de *S. aureus* β -hemolítico em áreas não detectadas pelos *primers* utilizados, como as que estão publicadas no GenBank (PROJAN *et al.*, 1989; COLEMAN *et al.*, 1991; KATEROV *et al.*, 1994). Quanto aos isolados deste trabalho, a análise fenotípica da expressão de beta-hemolisina - positiva em quase 100% das cepas - pode sugerir a existência de algumas dessas variações, uma vez que o gene *hly* foi identificado somente em 33,3% dos isolados *S. aureus*. Já com relação aos poucos isolados que foram negativos para a expressão da β -hemólise, podem ter perdido o gene ou a capacidade de expressá-lo ou, ainda, podem carregar uma variante desse gene que é insuficiente para a expressão da atividade β -hemolítica *in vitro*, como demonstrado por AARESTRUP *et al.* (1999). Considerando a possibilidade de ocorrer variações na sequência do gene *hly* e o fato de que a expressão da atividade hemolítica *in vitro* pode ser diferente da que ocorre *in vivo*, é difícil precisar o quanto os perfis clonais C e D são, de fato, mais preocupantes que os outros.

O processo de fagocitose por neutrófilos polimorfonucleados é considerado um dos mais importantes mecanismos de defesa da glândula mamária (CRAVEN *et al.*, 1985). Por terem atuação sobre essas células, leucotoxinas bi-componentes têm uma importância significativa na patogênese de mastites estafilocócicas. Dados sobre a prevalência de leucotoxinas bi-componentes entre isolados de *S. aureus* provenientes de ruminantes com mastite são escassos, embora a identificação de linhagens causadoras dessa doença e portadoras dessas toxinas já ocorra há algum tempo (LOEFFLER *et al.*, 1985).

Alguns estudos relatam que linhagens *S. aureus* causadoras de mastite são constituídas por algumas leucotoxinas, que todas possuem o gene *hly* (gama-hemolisina), que a maioria é portadora dos genes para LukE-D e que entre 10 a 50% carregam os genes para lukM-lukF'-PV (FUEYO *et al.*, 2005 e PREVOST *et al.*, 1999). De acordo com esses dados, POUTREL *et al.* (dados não publicados e mencionados em RAINARD *et al.*, 2003) detectaram, em uma coleção de *S. aureus* de ruminantes com mastite, que todos os isolados possuíam pelo menos os genes para gama-hemolisina e LukE-D. O presente estudo difere desses achados em relação à presença do gene *hly*. Nenhum dos isolados analisados aqui apresentou o gene para a gama-hemolisina. Quanto à LukE-D, foi possível identificar a

ocorrência dos genes para essa toxina em três perfis clonais distintos de *S. aureus*, o que corresponde a vinte isolados, pouco mais de 50% do total, excluindo os demais coagulase positivos.

Considerando que as subunidades das classes S e F podem associar-se umas com as outras mesmo com atividades variadas e formar diferentes combinações ativas de leucotoxinas, pode-se sugerir que os perfis genéticos dos isolados de mastite identificados nesse estudo têm uma atuação menos complexa na patogênese da doença em relação às leucotoxinas bi-componentes, uma vez que não podem formar combinações heterólogas possuindo apenas os genes para LukE-D. Associações heterólogas poderiam aumentar o repertório de alvos celulares e conferir vantagem aos isolados portadores de mais de um gene de leucotoxinas (BARRIO *et al.*, 2006).

Os genes para a leucotoxina PVL não foram identificados em nenhum dos isolados desse estudo, como esperado de certo modo, pois apenas 2% dos isolados clínicos humanos carregam os genes *luk-PV* e expressam essa toxina (BOHACH & FOSTER, 2000). Considerando sua atuação em células de outros mamíferos, segundo esses mesmos autores, a PVL é ativa apenas em leucócitos de coelho, mas não em células de murídeos, ovinos ou cobaias. Foi mostrado que leucócitos humanos incubados com concentrações não citotóxicas de LukS-PV-LukF-PV são induzidos a secretar mediadores pré- inflamatórios como histamina e leucotrienes (KÖNIG *et al.*, 1997). Todos esses mediadores são responsáveis por recrutar leucócitos para o sítio da infecção e então contribuir com o desenvolvimento da inflamação. Os efeitos de baixas concentrações de leucotoxinas em leucócitos bovinos, uma situação que pode ser mais freqüente durante a infecção do que a ocorrência de concentrações citotóxicas, ainda não é totalmente esclarecida (RAINARD *et al.*, 2003).

Alguns estudos sugerem que as toxinas com atividade de superantígenos são importantes durante a patogênese da mastite devido aos seus efeitos imunomodulatórios (SCHUBERTH *et al.*, 2001; FUEYO *et al.*, 2005). A secreção dessas toxinas é considerada imunossupressiva, o que pode ser uma razão para a persistência de *S. aureus* no processo infeccioso (HAVERI *et al.*, 2008). Pelo fato de *S. aureus* ser amplamente distribuído nos rebanhos leiteiros, a probabilidade de contaminação do leite cru por esse patógeno com conseqüente produção de enterotoxinas é bastante elevada. Em bovinos, KENNY *et al*

(1993) relataram que no mínimo 28,6% das cepas isoladas do úbere secretavam uma ou mais toxinas. MATSUNAGA *et al* (1993), em outro estudo realizado no mesmo ano, encontraram 34,5% de cepas enterotoxigênicas. No entanto, em estudo realizado por SÁ *et al* (2004), de determinação da ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênico em amostras de leite provenientes de animais com mastite subclínica, os autores observaram menor ocorrência dessas cepas, apenas 4,39% dos isolados expressaram os genes codificadores de enterotoxinas. A ausência dos genes para as enterotoxinas A-E, característica das cepas isoladas de óstios e leite bovinos e de insufladores analisadas no presente estudo, indica que a ocorrência dessas linhagens no leite apresenta menos riscos de intoxicação alimentar, especialmente pela ausência do gene *sec*, uma vez que a EEC é a mais termoestável das enterotoxinas, seguida pelas EEB e EEA.

Quanto à enterotoxina A, o fato de nenhum isolado deste estudo ter apresentado o gene *sea* condiz com as observações de KALOREY *et al* (2007) em uma pesquisa recente que analisou os determinantes dos fatores de virulência de isolados *S. aureus* provenientes de casos de mastite bovina subclínica. Entretanto, esses resultados diferem da ocorrência descrita por outros pesquisadores (AKINEDEN *et al.*, 2001; STEPHAN *et al.*, 2001) em estudos da mesma natureza. Os genes *sea* e *seb* são raros em isolados *S. aureus* bovinos, mas têm sido encontrados em cepas associadas com alimentos contaminados de humanos (CHEN *et al.*, 2004). Esses genes também foram pouco freqüentes entre os isolados analisados por HAVERI *et al* (2008) que identificaram como prevalentes para PTSAg os genes do grupo *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo*), não incluídos no presente estudo. A capacidade das cepas analisadas aqui de causar intoxicação alimentar não está totalmente excluída, pode estar associada à produção de outras enterotoxinas não pesquisadas.

A ausência do gene *sed* exclui a possibilidade da ocorrência de um suposto plasmídeo que carrega os genes *sed* e *sej* concomitantemente com o gene de resistência à penicilina (*blaZ*). A resistência a esse antibiótico, apresentada por aproximadamente 100% dos isolados provenientes de bovinos, não está associada a esse elemento genético móvel que, por sua vez, é predominante em linhagens persistentes em infecções intramamárias bovinas (ZHANG *et al.*, 1998).

Nossos resultados assemelham-se, com exceção da ocorrência do gene *eta*, com os de um estudo recente (HERRON-OLSON *et al.*, 2007) no qual os genes *see*, *eta* e *etb* não

foram detectados entre as linhagens. Os genes *eta* e *etb*, codificadores de toxinas esfoliativas associadas com a síndrome da pele escaldada humana, também não foram detectados em HAVERI *et al* (2008) e LARSEN *et al* (2000). Linhagens portadoras desses genes provenientes de glândulas mamárias bovinas podem indicar origem humana de infecção. Entre os nossos isolados, o gene *eta* foi identificado em quatro cepas de *S. aureus*, sendo uma proveniente de óstio bovino e três de insufladores, sugerindo a participação humana em uma possível transmissão. Duas dessas cepas isoladas de insufladores apresentaram o mesmo perfil clonal.

Com relação ao gene *tst*, nossos resultados foram negativos para todos os isolados originados de óstios bovinos, do leite mastítico desses animais e de insufladores, ao contrário de alguns estudos, como o de CARDOSO *et al* (2000) que mostrou que 43% dos *S. aureus* isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina produziram TSST-1.

A comum ocorrência dos genes que codificam toxinas de superantígenos em alguns estudos (KATSUDA *et al.*, 2005; ZSCHÖCK *et al.*, 2005) pode indicar, segundo esses autores, que os genes codificadores dessas toxinas são favoráveis para a estabilização de *S. aureus* em infecções intramamárias bovinas. Essas toxinas podem ajudar na dispersão da bactéria dentro de um hospedeiro e até entre hospedeiros, uma vez que são secretadas em períodos de alta densidade bacteriana, no caso, na fase pós- exponencial do crescimento. A ocorrência dos genes codificadores dessas toxinas está sendo associada a casos de infecções intramamárias persistentes. Em pesquisa recente, HAVERI *et al* (2008) mostraram que esses genes estavam presentes em 80% dos isolados obtidos desse tipo de infecção em oposição aos 63,9% daqueles provenientes de infecções intramamárias não persistentes. A análise do conteúdo genético das cepas do presente estudo permite inferir que as mesmas não estão envolvidas com possíveis casos de reincidência da mastite, pelo menos no que diz respeito às toxinas de superantígenos pesquisadas aqui.

Os isolados *S. aureus* provenientes de ovinos apresentaram maior diversidade na combinação dos genes de virulência relacionados à produção de exotoxinas. Ao redor de 55,5% do total de isolados *S. aureus*, pertencentes às linhagens P e Q, apresentaram, além de genes codificadores de adesinas relacionados à produção de biofilme, genes responsáveis pela produção de citotoxinas e toxinas com atividade de superantígenos, o que pode explicar altos índices de morbidade ou letalidade observados em alguns casos de

ovinos acometidos por mastites causadas por esta bactéria. Quase todos os genes codificadores de toxinas de superantígeno estão relacionados com ilhas de patogenicidade ou outros elementos genéticos, alguns desses coexistindo no mesmo isolado. A associação dos genes *tst* e *sec*, identificada nos isolados de mastite subclínica com o perfil clonal Q, pode sugerir que essas linhagens sejam portadoras de SaPIbov1. A frequência dessa associação neste estudo, 16,6%, foi inferior às observações de ORDEN *et al* (1992b) que a encontraram em 74% dos isolados originados de ovinos. O perfil clonal P também foi portador do gene *sec*, mas não associado com *tst* e, como no caso do perfil clonal Q, esse gene foi identificado apenas nos isolados provenientes de mastite subclínica. Apesar do quadro clínico mais severo da mastite clínica, os isolados com perfil clonal P ou Q, provenientes de animais portadores dessa forma da doença, preocupam menos que os isolados com os mesmos perfis clonais originados de mastite subclínica, pois esses carregam o gene da enterotoxina mais termoestável, a EEC. A ocorrência de *sec* correspondeu a 44,4% do total de isolados provenientes de ovinos sendo o único gene codificador de enterotoxina encontrado neste estudo. Esses resultados são condizentes com a prevalência desse gene em animais da mesma espécie observada por ORDEN *et al* (1992a).

A ocorrência do gene *tst* entre os isolados provenientes de ovinos deste estudo, ao contrário do gene *sec*, foi observada tanto nas linhagens isoladas de mastite clínica como subclínica, correspondendo a 11,1% e 16,6%, respectivamente. A capacidade de produzir TSST-1 das linhagens estafilocócicas isoladas de diferentes sítios anatômicos de ovinos saudáveis e a detecção de anticorpos para essa toxina no leite e no soro foram estudadas por VALLE *et al* (1991) e podem sugerir um contato frequente desses animais com linhagens produtoras dessa toxina.

Considerando um mesmo perfil clonal originado de ovinos, exceto o perfil R, observou-se maior combinação dos genes codificadores de exotoxinas nos isolados provenientes de mastite subclínica e não nos originados de mastite clínica. Outros fatores de virulência não pesquisados neste estudo podem compor o conteúdo genético dos isolados provenientes da forma mais severa da doença.

Vários sistemas reguladores, *agr*, *sar*, *sigB*, *sae*, *arl* e seis homólogos SarA estão envolvidos com a expressão dos genes determinantes dos fatores de virulência de *S. aureus*. A atuação do locus *agr* é considerada significativa na patogênese dessa espécie em vários modelos de infecção animal, mas a expressão de determinados genes depende do controle de diferentes sistemas reguladores, o que torna complexo definir o papel de *agr* nas infecções estafilocócicas. O locus *agr* tem um envolvimento essencial na regulação positiva da expressão dos genes de exoproteínas, enquanto regula negativamente a síntese de adesinas de superfície celular durante a transição da fase exponencial para pós-exponencial (CHEUNG *et al.*, 2004). No entanto, YARWOOD *et al* (2002) demonstraram que a expressão de *agr* não é necessária para o desenvolvimento da síndrome do choque tóxico, o que acentua o aspecto multifatorial da virulência de *S. aureus*. A expressão de determinados genes de toxinas está relacionada a grupos *agr* específicos, porém este estudo se limitou à pesquisa de possíveis relações entre as combinações de fatores de virulência apresentados por isolados animais e seu grupo *agr*.

Em relação ao sistema de regulação global *agr* dos isolados *S. aureus* provenientes de bovinos, foi possível identificar as cepas com perfis clonais C e D como portadoras do grupo II. Esses dois perfis clonais foram os únicos a apresentar pelo menos 50% dos genes codificadores dos fatores de virulência pesquisados neste estudo, o que pode sugerir uma relação entre o grupo II de *agr* e a presença de múltiplos fatores de virulência em linhagens bovinas de *S. aureus*. Já o grupo III de *agr* foi identificado em apenas dois isolados - um proveniente do óstio e outro de leite mastítico - portadores de apenas um gene codificador de adesina, o *clfA*. Essas cepas não tiveram um perfil clonal definido por PFGE. Os demais isolados não foram identificados como os grupos I, II, III ou IV de *agr*, sendo classificados, portanto, como *agr* negativos e corresponderam a 60% dos isolados *S. aureus* provenientes de bovinos e insufladores. O *agr* negativo não pôde ser relacionado com a quantidade ou com a natureza dos genes codificadores dos fatores de virulência, uma vez que essa característica não foi exclusiva de isolados portadores de poucos desses genes e nem daqueles com combinações mais variadas. A associação do *agr* negativo também não pôde ser feita com a procedência das amostras, uma vez que essa característica apareceu em pelo menos um isolado proveniente de cada local de coleta.

A presença do gene *eta* foi identificada em três isolados *agr* negativos e em um do grupo II, diferente da forte associação desse gene com o grupo IV observada em isolados *S. aureus* de humanos.

A distribuição neste estudo dos grupos de *agr* entre os isolados bovinos foi de 33,3% do grupo II, 6,6% do grupo III e 60% de *agr* negativos. Esses resultados diferem dos obtidos por GILOT & LEEUWEN (2004) em uma pesquisa em que compararam a diversidade genética desse locus regulador em isolados *S. aureus* de mastite bovina e de humanos. Esses pesquisadores identificaram maior frequência do grupo I entre as linhagens bovinas (69%), seguida dos grupos II, III e IV correspondendo a 23,9%, 2,8% e 1,4% dos isolados, respectivamente. A prevalência do grupo I, ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, também foi relatada por BUZZOLA *et al* (2006) em um estudo que associou esse grupo de *agr* à persistência das linhagens *S. aureus* em tecidos da glândula mamária.

Entre as linhagens de *S. aureus* provenientes de ovinos, observou-se uma ocorrência equilibrada dos grupos I e II de *agr* e esses grupos foram associados tanto aos isolados de mastite clínica como subclínica. Nenhum portador dos grupos III e IV ou *agr* negativos foram encontrados nas amostras ovinas deste estudo, resultados que diferem de uma pesquisa recente (VAUTOR *et al.*, 2008) que identificou um clone predominante somente encontrado em ovinos e caprinos associado principalmente ao grupo III de *agr*. Assim como nos isolados bovinos, o grupo II de *agr* foi relacionado ao perfil que apresentou maior combinação dos fatores de virulência, incluindo a associação dos genes *sec* e *tst*, porém esse grupo também foi identificado em isolados portadores de apenas um gene codificador de adesina e de nenhum para exotoxinas, o que coloca em questão sua relação com a presença de múltiplos fatores de virulência em linhagens ovinas. Da mesma forma, o grupo I de *agr* foi encontrado tanto em linhagens que carregavam uma combinação diversificada dos genes determinantes de virulência como em linhagens portadoras de poucos desses genes.

Em relação aos perfis de resistência das cepas analisadas, observou-se maior sensibilidade a diferentes antimicrobianos entre os isolados ovinos. O perfil 1, definido neste estudo como sensível às categorias dos antibióticos testados, correspondeu a 22,8% e 100% dos isolados bovinos e ovinos, respectivamente. Recentemente, foi descrito um

sistema em *S. aureus* que controla as transferências dos elementos genéticos móveis entre isolados de diferentes linhagens (WALDRON & LINDSAY, 2006) podendo ser uma explicação para a ocorrência dos perfis caracterizados por alta sensibilidade aos antimicrobianos. Esse sistema, denominado *SauI* ou *SauI1*, codifica uma enzima de restrição que reconhece um DNA externo e o digere, reduzindo a frequência de transferência horizontal dos elementos genéticos móveis. A especificidade desse sistema, determinada pelos genes *sauIhsdS1* e *sauIhsdS2*, limita as trocas de DNA, prevenindo a transferência de genes de resistência entre linhagens animais e contribuindo para a evolução independente de cada uma delas (SUNG *et al.*, 2008).

O perfil 2, caracterizado apenas por resistência à penicilina e ampicilina, foi identificado em 26,6% dos isolados bovinos. A resistência à penicilina em *S. aureus* tem sido associada com mastite crônica (SOL *et al.*, 2000; TAPONEM *et al.*, 2003), apesar da presença de linhagens bovinas portadoras do gene *blaZ* não explicar totalmente a persistência das infecções. A resposta dessas linhagens ao tratamento varia entre diferentes tipos clonais (HAVERI *et al.*, 2008).

Os isolados resistentes à oxacilina corresponderam a 50,6% dos isolados bovinos. Essa alta taxa de resistência deve-se, possivelmente, à maneira como a amostragem foi constituída. Foram incluídas neste estudo amostras coletadas em um período em que se praticava o uso da associação de ampicilina e cloxacilina sódica no tratamento preventivo de mastite bovina em uma das fazendas.

O alto nível de resistência à oxacilina é sempre dependente da expressão de uma proteína alterada no genoma bacteriano, denominada PBP2a, que possui baixa afinidade para a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos e é codificada pelo gene *mecA*. A concentração inibitória mínima de oxacilina entre 1 e 8 µg/mL e a ausência do gene *mecA* indicam que essas cepas desenvolvem outro mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, caracterizando-se por uma sensibilidade denominada limítrofe ou *borderline*.

Apesar da ausência do gene *mecA* ser relatada em alguns estudos como o de HAVERI *et al* (2008) que pesquisaram os genes codificadores dos fatores de virulência de *S. aureus* isolados de infecções intramamárias bovinas persistentes e não persistentes, poucos são os dados publicados sobre a relação do fenótipo BORSA e os casos de mastites bovina e ovina. No entanto, em um estudo recente de caso clínico humano (SKINNER, S.

et al., 2009), a análise de PFGE de um isolado BORSA proveniente de um paciente com endocardite e de outros isolados sensíveis de culturas anteriores do mesmo paciente mostrou que esses eram clones idênticos, o que indica o desenvolvimento de resistência devido, provavelmente, a mutações na mesma linhagem e não resultado de novas infecções. Isso reforça a preocupação com séries múltiplas e inadequadas de terapias com beta-lactâmicos que levam ao desenvolvimento do fenótipo BORSA e a seleção dessas linhagens. A associação de um beta-lactâmico com um inibidor de beta-lactamase é eficaz apenas quando o mecanismo de hiper-produção de beta-lactamase é o único responsável pelo fenótipo BORSA. Isolados com possíveis mutações na PBP não respondem a esse tratamento.

Embora as linhagens BORSA sejam definidas como *mecA* negativas com CIM de oxacilina entre 1 e 8 µg/ml, alguns isolados negativos para esse gene com CIM de 12 e 16µg/ml por determinação de E-test foram encontrados nessa pesquisa. O isolado BORSA do caso clínico de SKINNER, S. *et al* (2009) também apresentou 12µg/ml de concentração inibitória mínima para a oxacilina.

O fenótipo BORSA apresentado pelas cepas deste estudo não foi associado a perfis clonais específicos assim como na pesquisa de NADARAJAH *et al* (2006). Esses autores também mostraram que a prevalência de uma linhagem, a ST25 de *S. aureus*, como colonizadora de bovinos, pode estar relacionada à propensão de adquirir substituições na PBP2 e aos cuidados com rebanhos leiteiros (CHRIEL & DIETZ, 2003). O tratamento com antibióticos em períodos “secos” ou fora da lactação como profilaxia para a prevenção da incidência de mastite em futuras lactações pode selecionar linhagens BORSA como colonizadores predominantes de gados leiteiros e promover reservatórios estáveis para a manutenção dessas linhagens e sua transmissão para humanos.

6. Conclusões

- Houve alta diversidade genética entre as linhagens de *S. aureus* isoladas das diferentes fontes analisadas das três fazendas de exploração leiteira pertencentes ao Estado de SP.
- Os isolados *S. aureus* provenientes de ovinos do Município de Garanhuns do Estado de PE mostraram baixa diversidade genética com três perfis clonais comuns aos casos de mastites clínica e subclínica.
- *S. aureus* originados dos óstios bovinos, independente do perfil clonal, caracterizaram-se pela pouca ocorrência dos genes relacionados ao processo toxigênico, com exceção de uma cepa portadora do gene *eta*, codificador da toxina esfoliativa.
- Dois perfis clonais de *S. aureus* - um associado a isolados de leite mastítico bovino e outro a um isolado obtido de insuflador - apresentaram maior combinação dos fatores de virulência, caracterizando-se pela presença dos genes codificadores das proteínas que se ligam ao fibrinogênio, fibronectina, laminina, dos genes relacionados à adesão intercelular e pela associação de *lukED* com *hla* e *hly*.
- A maioria das linhagens de *S. aureus* provenientes de ovinos foi portadora de genes de hemolisinas e *lukED* e metade apresentou pelo menos um gene para toxina de superantígeno. A ocorrência da associação dos genes *sec* (enterotoxina C) e *tst* (toxina da síndrome do choque tóxico - TSST-1) foi exclusiva dessas cepas.
- O grupo II do sistema regulador *agr* foi associado aos perfis clonais das linhagens bovinas e ovinas que apresentaram maior combinação dos fatores de virulência, mas também foi identificado em cepas portadoras de poucos genes de adesinas e exotoxinas provenientes de amostras ovinas. O mesmo foi observado para as linhagens do grupo I de *agr*, identificadas apenas em amostras ovinas.

- O grupo III e *agr* negativos foram exclusivos dos isolados de leite e óstios bovinos e de insufladores portadores de poucos genes codificadores dos fatores de virulência.
- Observou-se isolados de leite de vacas com mastite subclínica com total sensibilidade aos diferentes antimicrobianos testados - assim como todas as cepas originadas de ovinos - e com perfil de resistência à penicilina e ampicilina.
- As cepas resistentes à oxacilina (BORSA), provenientes de óstios bovinos e de insufladores, apresentaram concentração inibitória mínima $\geq 1 - \leq 16$ µg/ml com múltipla resistência a outros antimicrobianos, mas foram negativas para o gene *mecA*.

7. Referências bibliográficas

- AARESTRUP, F.M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 12, p. 279-285, 1999.
- AKINEDEN, G., ANNEMULLER, C, HASSAN, A.A., LAMMLER, C, WOKER, W. & ZSCHOCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin Diagn Lab Immunol**. 8,959-964, 2001.
- ANDERSON, J.C. Veterinary aspects of staphylococci. In *Staphylococci and Staphylococcal infections*, ed. Easmon, C.S.F. and Adlam, C. v. 1, p. 193–241. London: **Academic Press**, 1983.
- ANDERSON, D.E.; HULL, B.L.; PUGH, D.G. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 513, 2005.
- ARRIZUBIETA M.J., TOLEDO-ARANA A., AMORENA B., PENADÉS J.R. AND LASA I. Calcium Inhibits Bap-Dependent Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, November. p. 7490-7498, v. 186, n°. 22, 2004.
- BALABAN, N. & RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. In **J Food Microbiol** 61, 1-10, 2000.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R. *et al.* (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, p. 384-404, 2003.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W.; ZHAO, X.; HOPE, J.C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clin Diagn Lab Immunol**. May;11(3):463-72, 2004.
- BARG, N. & MCMURRAY, L.W. Characterization of a novel β -lactamase plasmid widely distributed among borderline oxacillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus*. In: Novick, R. P. (Ed.), *Molecular Biology of the Staphylococci*. VCH Publishers, New York, NY, USA, p. 623-625, 1990.
- BARG, N.; CHAMBERS H.; KERNODLE, D. Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**. Oct;35(10):1975-9, 1991.
- BARRIO M.B.; RAINARD P.; PREVOST G. LukM/LukF⁺-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. **Microbes Infect** 8: 2068-2074, 2006.
- BECKER, K.; EIFF, C.; KELLER, B.; BRÜCK, M.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 51: 237-244, 2005.

BELKUM, V.A.; MELLES, D.C.; PEETERS, J.K.; VAN LEEUWEN, W.B.; VAN DUIJKEREN, E.; HUIJSDENS, X.W.; SPALBURG E.; DE NEELING, A.J.; VERBRUGH, H.A. Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in Pigs and Humans, 2008.

BENNETT R.W; MONDAY, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: MILLIOTIS, M.D.; BIER, J.W. (Eds). *International Handbook of Foodborn Pathogens*. New York: Marcel Dekker, Inc., cap. 4, p. 41-59, 2003.

BENNETT R.W, NOTERMANS S.; TATINI S.R. Staphylococcal enterotoxins. In: VANDERZANT, C; SPLITTSTOESSA, D.F. (Eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): American Public Health Association. p.551-592, 1999.

BENS C.P.M.; VOSS A.; KLAASSEN C.H.W. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associate with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. **J Clin Microbiol.** 44: 1875-1876, 2006.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M. P. (Ed.) **Foodborne bacterial pathogens**. New York: M. Dekker. p. 463-523, 1989.

BHAKDI, S. & TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Rev.** 55:733-751, 1991.

BLAGITZ, M.G. Avaliação da relação do exame físico da glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês com o perfil citológico e bacteriológico do leite. 195f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Veterinary Medicine**. London: Baillière Tindall. p.501-59: Mastitis. 7.ed, 1991.

BOHACH, G.A., DINGES, M.M.; MITCHELL, D.T.; OHLENDORF, D.H. & SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins, p.83-111. In K.B. Crossley and G.L. Archer. (ed.) *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, N.Y, 1997.

BOHACH, G.A.; FOSTER, T.J. *S. aureus* exotoxins In: FISCHETTI, V.A. *et al* Gram-Positive Pathogens. **American Society for Microbiology**. p. 367-378, 2000.

BOYSO, J.; CARDOSO-CORREA, B.I.; CAJERO-JUÁREZ, M.; BRAVO-PATÍÑO, A.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. The capacity of bovine endothelial cells to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* is increased by the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. **FEMS Immunol Med Microbiol.** Oct;54(1):53-9, 2008. Epub 2008 Jul 9.

BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control: progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, London, v. 51, p. 481-512, 1984.

BROUILLETTE E.; TALBOT B.G.; MALOUIN F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. **Infect Immun.** Apr;71(4):2292-5, 2003.

BUTLER, J.E. Immunoglobulins and immunocytes in animal milks. In: OGRA, P. L.; MESTECKY J.; LAMM, M. E.; STROBER, W.; BIENESTOCK, J.; MCGHEE, J. R. (Ed.). Mucosal immunology. New York: **Academic Press**, p. 1531-1554, 1999.

BUZZOLA, F.R.; BARBAGELATA, M.S.; CACCURI, R.L.; SORDELLI, D.O. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA mutant in mice. **Infect Immun.** Jun;74(6):3498-506, 2006.

CARDOSO, H.F.T; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 52, n.1, p. 7-10, 2000.

CARVALHO, L.B. Padrão de infecção intramamária em búfalas (*Bubalus bubalis*) da região do Alto São Francisco, MG. 37f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CHAMBERS, H.F.; ARCHER, G.; MATSUHASHI, M. Low-level methicillin resistance in strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;33(4):424-8, 1989.

CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**10:781-791, 1997.

CHEN, T.R., CHIOU, C.S. & TSEN, H.Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **Int J Food Microbiol** 92,189-197, 2004.

CHEUNG, A.L.; BAYER, A.S.; ZHANG, G.; GRESHAM, H.; XIONG, Y.Q. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 40:1-9, 2004.

CHRIEL, M. & DIETZ, H.H. Medication of production animals – cure of malfunctioning animals or production systems? **Acta Vet Scand** 98, 65–70, 2003.

CLEMENTS, A.C.A.; TAYLOR, D.J.; FITZPATRICK, J.L. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 139-148, 2003.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S11, v. 21, n 1. January, 2007.

COLEMAN, D.C., ARBUTHNOTT, J.P.; POMEROY, H.M.; BIRKBECK, T.H. Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the β -lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage conversion of β -lysin activity is caused by insertional inactivation of the β -lysin determinant. **Microb. Pathog.** 1:549-564, 1986.

COLEMAN, D., KNIGHTS, J., RUSSELL, R., SHANLEY, D., BIRKBECK, T.H., DOUGAN, G., CHARLES, I. Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* beta-toxin by bacteriophage phi 13 occurs by site- and orientation-specific integration of the phi 13 genome. **Mol. Microbiol.** 5, 933-939, 1991.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, 68: 145-153, 2007.

COONEY, J.; KIENLE, Z.; FOSTER, T.J.; O'TOOLE, P.W. The gama hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes form F and S components of leucocidin. **Infect Immun.** v. 61, p. 768, 1993.

COSTA, E.O.; VIANI, F.C.; WHITE, C. R.; ABE, S.; LOPES, V.C.A. Importância do portador na dinâmica da infecção intramamária. In: Congresso brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda. **Anais. SBMV**, p. 239, 1994.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 1, p. 3-9, 1998.

COSTA, E. O. Leite, problema cultural. **Revista NAPGAMA**, Pirassununga, v. 2. n.4, p.2, 1999.

CRAVEN, N., & M.R. WILLIAMS. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 10:71-127, 1985.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. BAP, A *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **J Bacteriol.** May;183(9):2888-96, 2001.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; KNECHT, E.; AMORENA, B.; LASA, I.; FOSTER, T.J.; PENADÉS, J.R. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. **Infect Immun.** Jun;70(6):3180-6, 2002.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZÓN, M.; PERIS C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, JR. Role of film-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun.** 72:2177-2185, 2004.

CUNHA, M.L.R.S. **Anais do IV encontro de pesquisadores em mastites**. FMVZ-UNESP. Botucatu-SP, p. 56-63, 2007.

DAO-PIN, S., ANDERSON, D.E.; BAASE, W.A.; DAHLQUIST, F.W.; MATTHEWS, B.W. Structural and thermodynamic consequences of burying a charged residue within the hydrophobic core of T4 lysozyme. **Biochemistry** 30:11521-11529, 1991.

DZIEWANOWSKA, K.; PATTI, J.M.; DEOBALD, C.F.; BAYLES, K.W.; TNIMBLE, W.R. & BOHACH, G.A. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. **Infect. Immun.** 67:4673-4678, 1999.

EUSEBY (J.P.): List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1997, 47, 47, 590-592. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Last full update March 02, 2007. URL:(<http://www.bacterio.net>)

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciencia Rural**, v. 34, n.4, p. 1315-1320, 2004.

FERRERAS, M.; HÖPER, F.; DALLA SERRA, M.; COLIN, D.A.; PREVOST, G.; MENESTRINA, G. The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. **Biochim Biophys Acta**. Nov 11;1414(1-2):108-26, 1998.

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

FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D.E.; MACKIE, S.M.; OIL, S.R.; MUSSER J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 0021-8826, 2001.

FLOCK, J.I.; HIENZ, S.A.; HEIMDAHL, A.; SCBENNINGS, T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.** 64:1876-1878, 1996.

FOX, L.K.; GERSHMAN, M.; HANCOCK, D.D.; HUTTON, C.T. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: the effect of milking time and hygiene practices. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, n. 81, p. 183-193, 1991.

FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; ALVAREZ, M.A.; MARTÍN, M.C. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam v. 243, p. 447-454, 2005

GÁL, Z.; KOVÁCS, P.; HERNÁDI, F.; BARABÁS, G.; KISS, L.; IGLÓI, A.; SZABÓ I. Investigation of oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in borderline methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Jul-Aug;47(4):233-8, 2001.

GARRITY, G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition: v. 3: The low G+C Gram positives. Springer-Verlag, New York. ISBN 0-387-95041-9, 2006.

GILOT, P.; UNA, G.; COCFAARD, T.; POUTREL, B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. **J. Clin. Microbiol.** 40:4060-4067, 2002.

GILOT, P. & LEEUWEN, W. Comparative analysis of *agr* locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Clinical Microbiology**, Mar. p. 1265-1269, 2004.

GRAVET, A.; COLIN, D.A.; KELLER, D.; GIRADOT, R.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. **FEBS Lett.** 436:202-208, 1998.

GRAVET, M.; RONDEAU, C.; HARF-MONTEIL, F.; GRUNENBERGER, H.; MONTEIL, J.; SCHEFTEL, M.; PREVOST, G. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-lukD. **J. Clin. Microbiol.** 37: 4012-4019, 1999.

GRAVET, A.; COUPPIÉ, P.; MEUNIER, O.; CLYTI, E.; MOREAU, B.; PRADINAUD, R.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LukE-LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. **J Clin Microbiol.** Dec;39(12):4349-56, 2001.

GREENE, C.; MCDEVITT, D.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.E.; LEW, D.P.; FOSTER, T.J. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. **Mol Microbiol.** Sep;17(6):1143-52, 1995.

HACKBARTH, C.J., KOCAGOZ, T., KOCAGOZ, S. & CHAMBERS, H.F. Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 39, 103–106, 1995.

HAVERI, M.; TAPONEN, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; SALMENLINNA, S.; PYORALA, S. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. **J Clin Microbiol** 43: 959-961, 2005.

HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLÖF, A.; PYÖRÄLÄ, S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. **J Clin Microbiol.** Nov;46(11):3728-35, 2008. Epub 2008 Sep 17.

HELALI, N.; CARBONNE, A.; NAAS, T.; KERNEIS, S.; FRESCO, O.; GIOVANGRANDI, Y.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P.; ASTAGNEAU, P. Nosocomial outbreak of *staphylococcal scalded* skin syndrome in neonates: epidemiological investigation and control. **J Hosp Infect.** Oct;61(2):130-8, 2005.

HERRON-OLSON, L.; FITZGERALD, J.R.; MUSSER, J.M. & KAPUR, V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PLOSONE** 2, ed 120, 2007.

HERZER, C.M. Toxic shock syndrome: broadening the differential diagnosis. **J Am Board Fam Pract.** Mar-Apr;14(2):131-6, 2001.

HIROOKA, E.Y.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; VICENTE, E; YOSHIMOTO, Y.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **Int J Food Microbiol.**, v. 7, p. 185-91, 1988.

HOLMES, A.; GANNER, M.; MC GUANE, S.; PITT, T.L.; COOKSON, B.D.; KEARNS, A.M. *S. aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: Frequency, characterization and association with clinical disease. **J. clin. Microbiol.** v. 43, p. 2384-2390, 2005.

HUIJSDENS, X.W.; VAN DIJKE, B.J.; SPALBURG, E.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.G.; HECK, M.E.; PLUISTER, G.N.; VOSS, A.; WANNET, W.J.; DE NEELING, A.J. Community-acquired MRSA and pig-farming. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** 5:26, 2006.

HUSEBY, M.; SHI, K.; BROWN, C.K.; DIGRE, J.; MENGISTU, F.; SEO, K.S.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M.; OHLENDORF, D.H.; EARHART, C.A. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** Dec;189(23):8719-26. Epub 2007 Sep 14, 2007.

HUY, Y.H. Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker; 1994.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YUZA, W.A.H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist. Updat.** V.6, p.41-52, 2003.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; UNA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. **Infect. Immun.** 70:631-641, 2002.

JAY, J.M. Gastrenterite estafilocócica. In: JAY, JM. **Microbiologia de Alimentos**. 6^aed., Porto Alegre: Artmed, cap. 23, p. 471-489, 2005.

JEVONS, M.P. "Celbenin"-resistant staphylococci. **Brazilian Medical Journal.** v.1. p. 124-125 (1961) apud HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YUZAWA, H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Med Microbiol.** v. 292, p. 67-74, 2002.

Jl, G., BEAVIS, R., NOVICK, R.P. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. **Science** 276, 2027-2030, 1997.

JONES, T.O.; WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet Rec**, v.119, p.435, 1986.

JØRGENSEN, H.J.; MØRK, T.; CAUGANT, D.A.; KEARNS, A.; RØRVIK, L.M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian Bulk Milk. **Applied on Environmental Microbiology.** v. 71, n. 12, p. 8352-8361, 2005.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E.; JÁNOSI, S.; SOMOGYI, P.; DÁN, A.; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L.; VAN DUIJKEREN, E.; WAGENAAR, J.A. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging infectious Diseases**, v. 13, n° 4, 2007.

KALOREY, D.R.; SHANMUGAM, Y.; KURKURE, N.V.; CHOUSALKAR, K.K.; BARBUDDHE, S.B. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. **J Vet Sci.** Jun;8(2):151-4, 2007.

KANEKO, J.; KIMURA, T.; KAWAKAMI, Y.; TOMITA, T.; KAMIO, Y. Pantone-Valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). **Biosci Bio-technol Biochem.** 61:1960-2, 1997.

KANEKO, J. & KAMIO, Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes, **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 68: 981-1003, 2004.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **J. Clin. Microbiol.** 33:376-380, 1995.

KATEROV, V.E.; GOLUBKOV, V.I.; TOTOLIAN, A.A.; SHALEN, K.; ENSEN, L.; MIKULA, I.; SMOLA I. The cloning and expression of the gene for *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.** 3 pp. 28–33, 1994.

KATSUDA, K., HATA, E., KOBAYASHI, H., KOHMOTO, M., KAWASHIMA, K., TSUNEMITSU, H., EGUCHI, M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Vet Microbiol.** Feb 25;105(3-4):301-5, 2005. Epub 2005 Jan 16.

KENNY, K., REISER, R.F., BASTIDA-CORCUERA, F.D.; NORCROSS, N.L. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *S. aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** v.31, p. 796-707, 1993.

KERRO DEGO, 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 Q.** 24:181–198, 2002.

KESERU, J.S.; GAL, Z.; BARABAS, G.; BENKO, I. & SZABO, I. Investigation of beta-lactamases in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* for further explanation of borderline methicillin-resistance. **Chemotherapy** 51, 300–304, 2005.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R. *et al.* (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, p. 264-82, 1999.

KLOTZ, M.; OPPER, S.; HEEG, K.; ZIMMERMANN, S. Detection of *S. aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. **J Clin Microbiol.** v. 41, p. 4683-4687, 2003.

KNAPP, C.C.; LUDWIG, M.D.; WASHINGTON, J.A.; CHAMBERS, H.F. Evaluation of Vitek GPS-SA card for testing of oxacillin against borderline-susceptible staphylococci that lack *mec*. **J Clin Microbiol.** Jul;34(7):1603-5, 1996.

KÖNIG, B.; PREVOST G.; KÖNIG W. Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions, **J. Med. Microbiol.** 46, pp. 479–485, 1997.

KUMAR, R.; BHATIA, K.L. Lactoperoxidase activity in buffalo Milk and whey. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, SP. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p. 168-170, 1994.

KURODA, M.; T. OHTA, L UCHIYAMA, T. BABA, H. YUZAWA, L KOBAYASHI, L. CUI, A. OGUCHI, K. AOH, Y. NAGAI, J. LIAN, T. ITO, M. KANAMORI, H. MATSUMARU, A. MARUYAMA, H. MURAKAMI, A. HOSOYAMA, Y. MLZUTANI-UI, N.K. TAKAHASHI, T.

SAWANO, R. INOUE, C. KAITO, K. SEUMIZU, H. HIRAKAWA, S. KUHARA, S. GOTO, J. YABUZAM, M. KANEHISA, A. YAMASHITA, K. OSHIMA, K. FURUYA, C. YOSHINO, T. SHIBA, M. HATTORI, N. OGASAWARA, H. HAYASHI, AND K. HIRAMATSU. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet** 357:1225-1240, 2001.

KUYPERS, J.M. & PROCTOR, R.A. Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. **Infect, Immun.** 57:2306-2312, 1989.

LANGONI, H. **Anais do IV encontro de pesquisadores em mastites**. FMVZ-UNESP. Botucatu-SP, p. 8-17, 2007.

LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.; JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 153-162, 2000.

LARSEN, H.D.; AARESTRUP, F.M.; JENSEN, N.E. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. **Vet Microbiol.** Feb 26;85(1):61-7, 2002.

LASA, I. & PENADÉS, J.R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Res Microbiol.** Mar;157(2):99-107. Epub 2005 Dec 27, 2006.

LESKI, T.A. & TOMASZ, A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. **J Bacteriol** 187, 1815–1824. 2005.

LIBERA, A.M.P.D. **Anais do IV encontro de pesquisadores em mastites**. FMVZ-UNESP. Botucatu-SP. p. 64-73, 2007.

LINA, G., PIEMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F.; BES, M.; PETER, M.O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESCH, F. & ETIENNE, J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clin. Infect. Dis.** 29:1128-1132, 1999.

LINDSAY, J.A.; HOLDEN, M.T. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. **Funct Integr Genomics.** 6:186-201, 2006.

LISA, R.W.; PLANO, M.D. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 122, p. 1070-1077, 2004

LOEFFLER, D.A. & NORCROSS, N.L. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of milk immunoglobulins to leukocidin toxin of *Staphylococcus aureus*. **Am. J. Vet. Res.** 46:1728-1732, 1985.

LOEFFLER, A., BOAG, A.K., SUNG, J., LINDSAY, J.A., GUARDABASSI, L., DALSGAARD, A., SMITH, H., STEVENS, K.B. & LLOYD, D.H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **J Antimicrob Chemother** 56, 692–697, 2005.

MARR, J. C.; LYON, J. D., ROBERSON, J. R., LUPHER, M., DAVIS, W.C.; BOHACH, G.A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infect Immun** 61, 4254-4262, 1993.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, v. 248, p.705-11, 1990.

MARSHALL, M.J., BOHACH, G.A.; BOEHM, D.F. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. *J. Nat. Toxins* 9:125-138, 2000.

MASSIDDA, O., MONTANARI, M.P. & VARALDO, P.E. Evidence for a methicillin-hydrolysing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. **FEMS Microbiol Lett** 71, 223–227, 1992.

MASSIDDA, O.; MONTANARI, M.P.; MINGOIA, M.; VARALDO, P.E. Cloning and expression of the penicillinase from a borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**. Aug 1;121(1):131, 1994.

MASSIDDA, O., MONTANARI, M.P., MINGOIA, M. & VARALDO, P.E. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. **Antimicrob Agents Chemother**. 40, 2769–2774, 1996.

MASSIDDA, O.; MINGOIA, M.; FADDA, D.; WHALEN, M.B.; MONTANARI, M.P.; VARALDO, P.E. Analysis of the beta-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on bla complex genes and cadmium resistance determinants cadD and cadX. **Plasmid**. Mar;55(2):114-27, 2006. Epub 2005 Oct 17.

MATSUNAGA, T., KAMATA, S., KAKIICHI, N. AND UCCIDA, K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **Journal of Veterinaiy Medicine Science** v. 55, p. 297-300, 1993.

MCCORMICK, J. K.; YARWOOD, J.M. & SCHLIEVERT, P. M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Ann Rev Microbiol** 55,77-104, 2001.

MCCULLOCH, J.A. Tese (Doutorado em análises clínicas). Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos. FCF/USP. São Paulo, 2006.

MCDUGAL, L.K. & THORNSBERRY, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **J Clin Microbiol** 23, 832–839, 1986.

MCELROY, M.C.; CAIN, D.J.; TYRRELL, C.; FOSTER, T.J.; HASLETT, C. Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of *Staphylococcus aureus* in a rat model of pneumonia. **Infect. Immun**. 70:3865-3873, 2002.

MELISH, M.E & GLASGOW, L.A. The staphylococcal scalded skin syndrome: development of an experimental model. **N. Engl. J. Med**. v. 282, p. 1114-1119, 1970.

MENZIES, P.I.; RAMANOON, S.Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 333-355, 2001.

MONTANARI, M.P.; TONIN, E.; BIAVASCO, F.; VARALDO, P.E. Further characterization of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis of penicillin-binding proteins. **Antimicrob Agents Chemother**. May;34(5):911-3, 1990.

MOREILLON, P.; ENTENZA, J.M.; FRANCIOLI, P.; MCDEVITT, D.; FOSTER, T.J.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. **Infect. Immun**. 63:4738-4743, 1995.

MORINAGA, N., KAIHOU, Y.; NODA, M. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family, **Microbiol. Immunol**. 47 p. 81–90, 2003.

MOUSSA, L.B.; WERNER, S.; COLIN, D.A. MOUREY, L.; PEDELACQ, J.D.; SAMAMA, J.P. SANNI, A.; MONTEIL H. AND PREVOST, G. Decoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Pantón–Valentine leucocidin in human PMNs, **FEBS Lett**. 461 p. 280–286, 1999.

NADARAJAH, J., LEE, M.J.; LOUIE, L.; JACOB, L.; SIMOR, A.E.; LOUIE, M.; MCGAVIN, M.J. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. **J Med Microbiol**. Dec;55(Pt 12):1675-83, 2006.

NICKERSON, S.C. Effect of cytokines on bovine mammary gland immunity. **SAAS Bull Biochemistry Biotechnol**, v. 4, p. 60-67, 1991.

NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, K.J.; WERNSRDS, K. Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Appl Environ Microbiol.**, v. 54, p. 531-533, 1988.

NOVICK, R.P. Pathogenicity factors and their regulation, p. 392-407. In V. A. Fischetti, R.P. Novick, J. J. Ferretti, D.A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), Gram-positive pathogens. **ASM Press**, Washington, D.C, 2000.

OKUMA, K.; IWAKAWA, K.; TURNIDGE, J.D.; GRUBB, W.B.; BELL, J.M.; O'BRIEN, F.G.; COOMBS, G.W.; PEARMAN, J.W.; TENOVER, F.C.; KAPI, M.; TIENSASITORN, C.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Dissemination of new Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **J. Clin Microbiol**. v. 40, n. 11, p. 4289-4294, 2002.

OPENSHAW, A.E., RACE, P.R.; MONZO, H.J.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; BANFIELD, M.J. Crystal structure of SmcL, a bacterial neutral sphingomyelinase C from *Listeria*. **J. Biol. Chem**. 280:35011-35017, 2005.

ORDEN, J.A., GOYACHE, J., HERNANDEZ, J., DOMENECH, A., SUAREZ, G. & GOMEZ LUCIA, E. Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. **JAppl Bacteriol** 72, 486-489, 1992.

PARRILO, J.E.: Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N. Engl J. M.** v.329, p. 1427, 1993.

PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; MCGAVIN, M.J.; HÖÖK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu Rev Microbiol.**;48:585-617, 1994.

PEACOCK, S.; MOON, C.; JUSTICE, A.; KANTZANOU, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEILL, G.; DAY, N. Virulent combination of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.** 70:4987- 4996, 2002.

PFALLER, M.A. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. In: Isemberg HD, editor. **Clinical microbiology procedures handbook**. Washington: American Society for Microbiology, 1993.

PINHO, M.G.; DE LENCASTRE, H. & TOMASZ, A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 10886–10891, 2001a.

PINHO, M.G.; FILIPE, S.R.; DE LENCASTRE, H. & TOMASZ, A. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol** 183, 6525–6531, 2001b.

PREVOST, G.; JAULHAC, B.; PIEMONT, Y. DNA fingerprint by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **J Clin Microbiol.** v. 30(4) p. 967-973, 1992.

PREVOST, G. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. In: J.H. Freer, Editor, **Academic Press**, London. p. 402–418, 1999.

PREVOST, G.; MOUREY, L.; COLIN D.A. AND MENESTRINA, G. Staphylococcal pore-forming toxins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 257 p. 53–83, 2001.

PROJAN, S.J.; KORNBLUM, J.; KREISWIRTH, B.; MOGHAZEH, S.L. EISNER W. & NOVICK, R.P. Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. **Nucl. Acids Res.** 17, p. 3305, 1989.

PROJAN, S.J. & NOVICK, R.P. The molecular basis of pathogenesis. In **The Staphylococci in Human Disease** ed.Crossley, K.B. and Archer, G.L. p. 55–81. New York, NY: Churchill Livingstone, 1997.

PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 513, 2005.

QUE, Y.A.; FRANCOIS, P.; HAEHIGER, J.A.; ENTENZA, J.M.; VAUDAUX, P. & MOREILLON, P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. **Infect. Immun.** 69:6296-6302, 2001.

RADOSTITIS, O.M.; BLOOD, D.C; GAY, C.C. **Veterinary medicine**. 8. ed. London: Bailliere Tindal, 2002.

RAINARD, P.; CORRALES, J.C.; BARRIO, M.B; COCHARD, T.; POUTREL, B. Leuco-toxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF-PV leukotoxin, **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 10: 272-277, 2003.

REDDY, K. & ROSS, J.M. Shear Stress Prevents Fibronectin Binding Protein-Mediated *Staphylococcus aureus* Adhesion to Resting Endothelial Cells. **Infection and Immunity**, May, p. 3472-3475, v. 69, nº 5, 2001.

REINOSO, E.; BETTERA, S.; FRIGERIO, C.; DIRENZO, M.; CALZOLARI, A.; BOGNI, C. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. **Microbiol Res** 159: 245-255, 2004.

REINOSO, E.B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLER, C.; BOGNI, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiol Res.** 163(3):314-22, 2008. Epub 2006 Aug 23.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J Dairy Sci.** Nov;77(11):3354-64, 1994.

ROWLAND, S.J.; DYKE, K.G. Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol.** Jun;4(6):961-75, 1990.

SÁ, M.E.P; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Braz J vet Res anim Sci**, v. 41, n.5, p.320-326, 2004.

SAKO, T.; TSUCHIDA, N. Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus*. **Nucleic Acids Res.** v. 11, p. 7679, 1983.

SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C.J.R.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; NOVICK, R.P.; GOLD, H.S. Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother.** May;46(5):1492-502, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Vol 3, Appendix B, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA, 1989.

SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A.; SILVEIRA FILHO, S.; MOTA, V.; SOUZA, H.M.; OLIVEIRA, M.B.; JOHNER, J.M.Q.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P.; BALBINO, T.C.L. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Nappama**, São Paulo, v. 6, p. 19-23, 2003.

SANTOS, R.A.; MENDONÇA, C.L; AFONSO, J.A.B.; SIMAO, L.C.V. Aspectos clinicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 27, n. 1, p. 6-12, 2007.

SCHAD, E.M.; PAPAGEORGIOU, A.C.; SVENSSON, L.A.; ACHARYA, K.R. A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity. **J Mol Biol.**, v.269, p. 270-80, 1997.

SCHMIDT, H., & HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.** 17:14-56, 2004.

SCHUBERTH, H.J.; KRUEGER, C.; ZERBE, H.; BLCKMANN, E.; LEIBOLD, W. Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Vet Microbiol** 82: 187-199, 2001.

SEARS, P.M. & MCCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Vet Clin North Am Food Anim Pract** 19, 171-185, 2003.

SENFT, B.; MEYER, F.; HARTMANN, M.L. Die Bedeutung der Proteine des Strichkanalkeratins im Abwehrsystem der bovinen Milchdruse. **Milchwissenschaft**, v. 45, p. 295-298, 1990.

SHAFFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infect Immun.**, v. 20, p. 273-278, 1978.

SHALITA, Z.; HERTMAN, I.; SAND, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.**, v. 129, p. 317-325, 1977.

SILVA, E.R.; BOECHAT, J.U.D.; MARTINS, J.C.D.; FERREIRA, W.P.B.; SIQUEIRA, A.P.; SILVA, N. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 56, p. 271-275, 2005.

SKINNER S.; MURRAY M.; WALUS T.; KARLOWSKY J.A. Failure of cloxacillin in treatment of a patient with borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. **J Clin Microbiol.** Mar;47(3):859-61, 2009. Epub 2008 Dec 30.

SMELTZER, M.S.; GILLASPY, A.F.; PRATT, F.L.J.; THAMES, M.D. & IANDOLO, J.J. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. **Gene** 196:249-259, 1997.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. Mammary gland and milk production. In.: SMITH, M.C. (Ed.). **Goat Medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger. p. 620, 1994.

SOL, J.; SAMPIMON, O.C; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **J Dairy Sci.** Feb;83(2):278-84, 2000.

SORDILLO, L.M. & DALEY, M.J. Role of cytokins in the prevention and treatment of mastitis. In: MEYERS, M.J.; MURTAUGH, M.P. (Ed.). Cytokins in animals health and disease. New York: M. Dekker. P. 389-419, 1995.

STAALI, L.; MONTEIL, H. & COLIN, D.A. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca^{2+} channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils, **J. Membr. Biol.** 162 p. 209–216, 1998.

STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A.A.; LAMMLER, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Vet Microbiol** 78, 373-382, 2001.

STOODLEY, P.; CARGO, R.; RUPP, C.J.; WILSON, S.; KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. **J Ind Microbiol Biotechnol.** Dec;29(6):361-7, 2002.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol.** 56:187-209, 2002. Epub 2002 Jan 30.

STRUELENS, M.J.; DEPLANO, A.; GODARD, C.; MÃES, N.; SERRUYS, E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol.** .v.30, p. 2599-2605, 1992.

STUTZMANN, P.; ENTENZA, J.M.; VAUDAUX, P.; FRANCIOLI, P.; GLAUSER, M.P.; MOREILLON. Study of *Staphylococcus aureus* pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organisms *Streptococcus gordonii*. **Infect. Immun.** 69: 657-664, 2001.

SUNG, J.M.; LLOYD, D.H.; LINDSAY, J.A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Microbiology.** Jul;154(Pt 7):1949-59, 2008.

SUTRA, L. & POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.** 40:79-89, 1994.

TAPONEN, S.; JANTUNEN, A.; PYÖRÄLÄ, E.; PYÖRÄLÄ, S. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Vet Scand.** 44(1-2):53-62, 2003.

TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ, A.J.R.; LEE, J.C. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* from Europe and the United States. **J Clin Microbiol.** Aug;38(8):2998-3003, 2000.

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

TORRES, V., PISHCHANY, G.; HUMAYUU, M.; SCHNEEWIND, O.; SKAAR, E. *Staphylococcus aureus* IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization. **J. Bacteriol.** 188:8421-8429, 2006.

TRABULSI, L.R. & ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4^a ed., Atheneu, 2004.

TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. **J Clin Microbiol.** Sep;41(9):4465-7, 2003.

UBEDA, C.; TORMO, M.A.; CUCARELLA, C.; TROTONDA, P.; FOSTER, T.J.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. **Mol Microbiol.** Jul;49(1):193-210, 2003.

VALLE, J., VADILLO, S.E., PIRIZ, S. & GOMEZ-LUCIA, E. Toxic shock syndrome toxin one (TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum and milk. **Applied and Environmental Microbiology.** 57, 889-891, 1991.

VANCRAEYNEST, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. **Vet Microbiol.** Nov 15;103(3-4):241-7, 2004.

VATH, G.M.; EARTHART, C.A.; MONIE, D.D.; LANDOLO, J.J.; SCHLIEVERT, P.M.; OHLENDORF, D.H. The crystal structure of esfoliative toxin B: a superantigen with enzymatic activity, **Biochemistry**, v. 38, p. 10239-10246, 1999.

VAUTOR, E.; ABADIE, G., PONT, A. & THIERY, R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. **Vet Microbiol** 127, 407-411, 2008.

VAZ, A.K. **Anais do IV encontro de pesquisadores em mastites.** FMVZ-UNESP. Botucatu-SP, p. 38-44, 2007.

VUONG, C.; SAENZ, H.L.; GÖTZ, F.; OTTO, M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis.** Dec;182(6):1688-93, 2000. Epub 2000 Oct 13.

WALDRON, D.E & LINDSAY, J.A. Saul: a novel lineage-specific type 1 restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. **Bacteriol.** 188, 5578-5585, 2006.

WALEV, I., WELLER, U.; STRAUCH, S.; FOSTER, T. & BHAKDI, S. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (β -toxin) of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.** 64:2974-2979, 1996.

WANN, E.R.; GURUSIDDAPPA, S. HOOK, M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. **J Biol Chem.** May 5;275(18):13863-71, 2000.

WEESE, J. S., ARCHAMBAULT, M., WILLEY, B. M., HEARN, P., KREISWIRTH, B. N., SAID-SALIM, B., MCGEER, A., LIKHOSHVAY, Y., PRESCOTT, J.F. & LOW, D.E Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. **Emerg Infect Dis** **11**, 430-435, 2005.

WELLNITZ, O.; KERR, D.E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. **Vet Immunol Immunopathol.** Oct;101(3-4):191-202, 2004.

YAMAZAKI, O.; YAMAGUCHI, T.; SUGAI, M.; CELLIER, C.C.; ARNAUD, F.; VANDENSCH, F.; ETIENNE, J.; LINA, G. Clinical manifestations of staphylococcal scalded skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, p. 1890-1893, 2005.

YARWOOD, J.M.; MCCORMICK, J.K.; PAUSTIAN, M.L.; ORWIN, P.M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 13138–13147, 2002.

YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **J Clin Invest.** Dec;112(11):1620-5, 2003.

ZADOKS, R.N.; VAN LEEUWEN, W.B.; KREFT, D.; FOX, L.K.; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, n. 40, p. 3894-3902, 2002.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of the International Dairy Federation, Bruxelles, v. 345, p.15-18, 2000.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, p. 227-233, 1998.

ZSCHÖCK, M., KLOPPERT, B., WOLTER, W., HAMANN, H.P. & LÄMMLER, C. Patterns of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet Microbiol** **108**, 243–249, 2005.

8. Anexo

A - Soluções e Reagentes

Proteinase K

Dissolver 100mg de proteinase K (GibcoBRL, Life Technologies, USA) em 10mM de Tris HCl pH 7,5; 20mM de cloreto de cálcio e 50% de glicerol. Armazenar a -20°C.

Lisostafina

Solução estoque

Dissolver 1mg de lisostafina em 1ml de tampão de acetato de sódio 20mM pH4,5. Armazenar a -20°C.

Solução de uso

Diluir a solução estoque 1:10 em tampão de acetato de sódio 20mM pH 4,5.

Tampão EC

Tris 6mM	1,5ml de Tris 1M pH 8,0
	1,5ml de Tris 1M pH 7,0
EDTA 0,1M	5,0ml de EDTA 0,5M pH 8,0
	5,0ml de EDTA 0,5M pH 7,0
NaCl 1M	29,22g
Brij58 0,5%	2,5g
Desoxicolato de sódio 0,2%	1,0g
Sarkosyl 0,5% (N-Laurilsarcosina, sal sódico)	2,5g

Volume final: 500ml com água destilada deionizada.

pH final 7,5.

Esterilização por filtração.

Tampão ES

EDTA 0,4M, pH 9,3
Sarkosyl 1%

40,0ml de EDTA 625mM pH 9,3
10,0ml de sarkosyl a 5%

Preparar no momento do uso.

Tampão CHEF-TE

Tris 0,1M pH 7,5

2,5ml de Tris 1M pH 8,0

2,5ml de Tris 1M pH 7,0

EDTA 0,1M pH 7,5

5,0ml de EDTA 0,5M pH 8,0

5,0ml de EDTA 0,5M pH 7,0

Volume final: 50ml com água destilada deionizada.

Esterilização a 121°C por 15 minutos.

Tampão DNS

Tris 0,1M pH 8,0

5,0ml de Tris 1M pH 8,0

Cloreto de magnésio 5mM

0,25ml de cloreto de magnésio 1M

Volume final: 50ml com água destilada deionizada estéril.

Preparar no momento do uso.

Agarose de baixo ponto de fusão a 2%

Agarose de baixo ponto de fusão

2g

Água destilada deionizada

100ml

Dissolver a agarose em água destilada deionizada em banho de água fervente.

Esterilização a 121°C por 15 minutos.

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE)

TBE concentrado

Tris base	121,1g
Ácido bórico	61,8g
EDTA	3,7g

Volume final: 1000ml com água destilada deionizada.

Esterilização a 121 °C por 15 minutos.

TBE 0,5X

TBE 10x	50ml
Água destilada deionizada	950ml

Preparar no momento do uso.