

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/01/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Capacidade de adesão, invasão e produção de biofilme
em superfície biótica e abiótica por *Staphylococcus aureus*
isolados de leite de vacas com mastite subclínica.

IVANA GIOVANNETTI CASTILHO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia dos Micro-organismos.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Capacidade de adesão, invasão e produção de biofilme
em superfície biótica e abiótica por *Staphylococcus aureus*
isolados de leite de vacas com mastite subclínica.

IVANA GIOVANNETTI CASTILHO

PROFA. DRA. VERA LÚCIA MORES RALL

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia dos Micro-organismos.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Castilho, Ivana Giovannetti.

Capacidade de adesão, invasão e produção de biofilme em superfície biótica e abiótica por *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica / Ivana Giovannetti Castilho. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Vera Lúcia Mores Rall
Capes: 21201021

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Bovino - Doenças. 3. Mastite. 4. Genes. 5. Reação em cadeia da polimerase. 6. Biofilme.

Palavras-chave: MSCRAMMs; *S. aureus*; *bap*; *cluster ica*; mastite.

Aos meus pais, Ana e Enéias, com imenso amor e gratidão, por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim. Espero ser merecedora de todo o esforço, amor e cuidado que me dedicam. Tenho muito orgulho de vocês.

Agradecimentos

A Deus, por sempre me mostrar o melhor caminho, por colocar tantas pessoas especiais na minha vida e por me proporcionar tantas alegrias.

À minha orientadora Vera Lúcia Mores Rall, não apenas pela excelente orientação e ensinamentos, mas também pela alegria com que nos passa seus conhecimentos, pelos anos de convivência e amizade, apoio e conselhos em todos os aspectos da minha vida.

À Terue Sadatsune, por sempre se preocupar comigo, por estar sempre pronta a ajudar, pela alegria que transmite, pelo carinho e amizade preciosa que estabelecemos.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho Larissa, Luiz, Lula e Ana. Agradeço imensamente por me ajudarem nesta etapa e pelos momentos tão divertidos que compartilhamos em nosso dia-a-dia.

Ao meu amor Enrico, pela paciência, companheirismo, amor, carinho e bom humor. Agradeço toda a força e incentivo que me deu nessa etapa e por tudo de bom que tem proporcionado na minha vida.

À minha irmã Marcela e meu cunhado César, por estarem sempre presentes, pelo carinho e preocupação e por me darem minha grande alegria, minha sobrinha Lavínia.

Aos meus tios Júlia e Marcos por participarem de todas as fases da minha vida. Agradeço imensamente toda a ajuda e carinho.

À Luciana, por dividirmos nosso dia-a-dia, sempre com muita amizade e alegria. Obrigada por todo o companheirismo, carinho e ajuda em todos os sentidos.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Bruna, Erika, Stefani e Fernanda, pela ajuda e pela convivência tão divertida e harmoniosa.

À Bruna, Livia, Ricardo, Mirella e Nathalia, pela troca de conhecimentos e pela amizade.

À Cox, Kurau, Lemon e Pivets, pois mesmo estando distantes fisicamente na maior parte do tempo, permanecemos unidas compartilhando nossas alegrias e dificuldades e comemorando juntas cada vitória.

Aos professores Ary Fernandes Jr., Rodrigo Tavanelli Hernandez e Reinaldo José da Silva, que participaram da banca de qualificação e deram importantes contribuições para a melhoria deste trabalho.

Às alunas do Prof. Ary, especialmente Fernanda, Lidiane e Fabiana, que com muito bom humor me auxiliaram nos testes de microdiluição do antimicrobiano.

Às alunas do Prof. João Pessoa, especialmente Claudia e Jaqueline, pelo carinho com que me ajudaram com as culturas celulares e qPCR.

Ao Prof. Pedro de Magalhães Padilha por gentilmente ceder o sonificador, contribuindo com uma importante etapa do trabalho.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Mastite bovina	13
1.2. Agentes etiológicos da mastite bovina.....	16
1.3. Estabelecimento da mastite bovina por <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.3.1. Fatores de virulência de <i>S. aureus</i> envolvidos nos casos de mastite bovina.....	17
1.3.1.1. Adesão e invasão	18
1.3.1.2. Biofilme	21
1.3.2. Culturas celulares como modelo de estudo de adesão, invasão e produção de biofilme	24
2. OBJETIVO	27
3. BIBLIOGRAFIA	28
CAPÍTULO 1	39
RESUMO	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	44
Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Detecção dos Genes <i>bap</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>nuc</i>	44
Detecção dos Genes Relacionados à Adesão (MSCRAMMs)	45
Caracterização Molecular das Cepas de <i>S. aureus</i> pelo Sistema <i>agr</i>	46
Cultivo de Células HeLa	47
Cultivo de Células de Epitélio Mamário Bovino (BMEC)	47
Caracterização de BMEC por PCR em Tempo Real (qPCR)	48
Produção de Biofilme em Microplaca de Poliestireno	48
Teste de Susceptibilidade a Antimicrobiano na Presença de Biofilme	49
Produção de Biofilme em Cultura Celular	50
Teste de Adesão das Cepas de <i>S. aureus</i> em Cultura Celular	50
Teste de Invasão das Cepas de <i>S. aureus</i> em Cultura Celular	51
Análise Estatística	51
RESULTADOS	52
Detecção dos Genes Relacionados à Produção de Biofilme <i>bap</i> , <i>icaA</i> e <i>icaD</i> ...	52
Detecção dos Genes Relacionados à Adesão (MSCRAMMs)	53
Caracterização Molecular das Cepas de <i>S. aureus</i> pelo Sistema <i>agr</i>	54
Cultivo Celular	56
Caracterização de BMEC por PCR em Tempo Real (qPCR)	56
Produção de Biofilme em Microplaca de Poliestireno	57
Teste de Susceptibilidade a Antimicrobiano na Presença de Biofilme	58

Produção de Biofilme em Cultura Celular	58
Adesão e Invasão das Cepas de <i>S. aureus</i> em Culturas Celulares	60
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	69
BIBLIOGRAFIA	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da mastite em um úbere infectado (VIGUIER et al., 2009).....	14
Figura 2. Fases do desenvolvimento de biofilme <i>in vivo</i> (JOO e OTTO, 2012)	22

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>nuc</i> (257 pb).....	52
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes (A) <i>bap</i> (971 pb); (B) <i>icaA</i> (1315 pb); (C) <i>icaD</i> (381 pb).	52
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose para detecção do (A) gene <i>fnbA</i> (1280 pb); (B) gene <i>fnbB</i> (524 pb); (C) gene <i>fib</i> (404 pb).	53
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose para detecção do (A) gene <i>clfA</i> (292 pb). (B) gene <i>clfB</i> (205 pb). (C) do gene <i>cna</i> (423 pb).	54
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose para detecção do (A) gene <i>eno</i> (302 pb); (B) gene <i>ebpS</i> (186 pb).	54
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene (A) <i>agrI</i> (440 pb); (B) <i>agrII</i> (572 pb).....	54
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene (A) <i>agrIII</i> (406 pb); (B) <i>agrIV</i> (588 pb).....	55
Figura 8. Microscopia óptica de cultivo de células obtidas a partir de explante de glândula mamária bovina.	56
Figura 9. (A) Teste de sensibilidade ao sulfato de cefquinoma pela cepa 1, demonstrando ausência de crescimento bacteriano após a incubação com antibiótico e presença de crescimento após a quebra do biofilme. (B) Controle do teste, demonstrando crescimento antes e depois da quebra do biofilme.....	58
Figura 10. MEV. Produção de biofilme de <i>S. aureus</i> , isolado de leite de vacas com mastite subclínica em célula HeLa (4000x); 10B. Aumento de 16.000x.....	59
Figura 11: MEV. <i>S. aureus</i> , isolado de leite de vacas com mastite subclínica, aderidos em células HeLa, não produtor de biofilme (5000x).....	59

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR, para a pesquisa do gene usado para a confirmação da espécie e pesquisa dos genes produtores de biofilme, em cepas de <i>S. aureus</i> , isolados de leite de vacas com mastite subclínica.	45
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR, para a pesquisa dos genes codificadores de MSCRAMMs em cepas de <i>S. aureus</i> , isolados de leite de vacas com mastite subclínica.	46
Tabela 3: Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR, para a pesquisa de genes de tipagem molecular dos grupos <i>agr</i> , em cepas de <i>S. aureus</i> , isoladas de leite de vacas com mastite subclínica.	47
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real para caracterização de células epiteliais de glândula mamária bovina, isolada primariamente.	48
Tabela 5. Perfil genético das cepas de <i>S. aureus</i> , isoladas de leite de vacas com mastite subclínica, com relação à presença dos genes relacionados com a produção de biofilme, <i>bap</i> , <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	53
Tabela 6. Perfil genético das cepas de <i>S. aureus</i> , isoladas de leite de vacas com mastite subclínica, com relação aos genes relacionados à produção de biofilme, genes codificadores de MSCRAMMs e que classificam molecularmente as cepas em relação ao sistema <i>agr</i>	55
Tabela7. Relação entre a constituição genética das cepas de <i>S. aureus</i> , isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e a produção de biofilme <i>in vitro</i> , utilizando diferentes meios de cultura.	57
Tabela 8. Relação entre os genes envolvidos na produção de biofilme e a capacidade de adesão e invasão em células BMEC e HeLa em <i>S. aureus</i> isolados de leite de vacas com mastite subclínica	60

RESUMO

A mastite bovina é uma inflamação nas glândulas mamárias das vacas causada, principalmente, por bactérias e identificada a partir de amostras de leite, pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS). Essa doença é a maior preocupação da indústria leiteira em todo o mundo por gerar grandes perdas econômicas. Vários micro-organismos podem causar mastite e *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos envolvidos devido a vários fatores de virulência. Essa espécie é capaz de aderir e invadir as células do epitélio mamário bovino, constituindo os primeiros passos para o estabelecimento da mastite e deixando a bactéria fora do alcance dos mecanismos de defesa do hospedeiro e da ação de antibióticos. Os biofilmes são formados pela adesão das bactérias em superfícies, com multiplicação bacteriana e desenvolvimento de uma matriz polissacarídica, que envolve as multicamadas de bactérias, e vários genes estão envolvidos na sua formação, como o *cluster ica* e o gene *bap*. O objetivo do presente estudo foi testar 7 cepas de *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica, com diferentes perfis dos genes *bap*, *icaA* e *icaD* quanto a capacidade de produzir biofilme *in vitro* (empregando-se caldo Tryptic Soy Broth – TSB-, TSB + 1% de glicose) e em superfícies bióticas (cultura celular de epitélio mamário bovino – BMEC – e HeLa) e abiótica (microplaca de poliestireno). O potencial de adesão e invasão e a susceptibilidade a antimicrobiano, na presença do biofilme, também foram testados. Além disso, investigou-se a presença dos genes codificadores das adesinas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*-Componentes da Superfície Microbiana Reconhecedores de Moléculas Adesivas da Matriz) e os isolados foram classificados molecularmente pelo o grupo *agr*. Todas as cepas foram capazes de invadir BMEC e HeLa, mas os índices de invasão em BMEC foram maiores que em HeLa. No teste de produção de biofilme em placa de poliestireno, houve diferença estatisticamente significativa entre o TSB +1% glicose e os demais meios, onde 5 das 7 cepas foram produtoras. A formação de biofilme em DMEM ocorreu somente na cepa que apresentou os genes *bap*, *icaA* e *icaD* simultaneamente, o que permitiu realizar o teste e produção de biofilme em superfície biótica somente com esse isolado. Em relação à produção de biofilme sobre as culturas celulares, foi possível observar sua presença apenas sobre as células HeLa, pois a cepa apresentou alta taxa de invasão em BMEC, destruindo o tapete celular e impossibilitando a visualização da matriz. Entre os genes codificadores das adesinas, todas as cepas produtoras de biofilme apresentaram em comum os genes *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *eno*, *fib* e *ebpS*. Em todas as cepas produtoras, o biofilme protegeu as bactérias da ação do antimicrobiano sulfato de cefquinoma. Dentre todas as cepas testadas, não houve predominância de nenhum grupo *agr*, porém as cepas produtoras de biofilme pertenciam aos grupos *agr* II ou III. A presença de *bap*, *icaA* e *icaD* associada aos genes codificadores das MSCRAMMs confere às cepas de *S. aureus*, provenientes de mastite bovina subclínica, alta capacidade de adesão e produção de biofilme *in vitro*, o que contribui para a colonização e persistência desse patógeno.

Palavras-chave: *S. aureus*, mastite, *bap*, *cluster ica*, MSCRAMM.

ABSTRACT

The bovine mastitis is defined as an inflammation of the mammary glands of cows, mainly caused by bacteria, and it can be identified in the milk samples due to the increase in somatic cell count (SCC). This disease is a major concern of the dairy industry throughout the world, causing severe economic losses. Several microorganisms may cause mastitis, however, *Staphylococcus aureus* is among the main pathogens involved in this framework, due to its virulence factors. This species can adhere and invade bovine mammary epithelial cells, the first step towards the establishment of mastitis and leaving the bacterium free from host defense mechanisms and the action of antibiotics and with a nutrient source guaranteed. Biofilms are formed by adhesion of bacteria on solid surfaces with bacterial multiplication and development of a polysaccharide matrix involving the multilayered cells. Several genes are involved in its formation, as the cluster *ica* and *bap* gene. The aim of this study was to test *S. aureus* strains isolated from the milk of cows with subclinical mastitis with different genetic profiles in relation to the genes involved in the production of biofilm (*cluster ica* and *bap*) for biofilm production *in vitro*, (using Tryptic Spy Broth –TSB-, TSB+1% glucose and DMEM) and in biotic (bovine mammary epithelial cells – BMEC- and HeLa cells culture) and abiotic surfaces (polystyrene microplates). The adhesive and invasive potential of these strains and the antimicrobial susceptibility in the presence of biofilms were also tested. Furthermore, we investigated the genes coding MSCRAMMs and characterized molecularly by *agr* group. All strains were able to invade HeLa and BMEC, but the rates of BMEC invasion were larger than to cells HeLa. In biofilm production *in vitro* test, there was statistically significant difference between TSB + glucose 1% and the other mediums, where 5 from 7 strains were producers. Biofilm production using DMEM occurred only by *bap*^{+*icaA*^{+*icaD*⁺ strain, so we observed the biofilm by electronic microscopy only by this strain. In the production of biofilm on cell cultures we observed its presence only on HeLa cells, because the strain presented a high invasion in BMEC, destroying the cells and preventing the visualization of the array. All biofilm -producing strains had in common the *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *eno*, *fib* and *ebpS* genes. In all producing strains, biofilms protect bacteria from the cefquinome sulphate action. Among all tested strains, no predominance of any *agr* group, but producing strains of biofilm belonged to *agr* II or III groups. The presence of *bap*, *icaA* and *icaD* associated with genes encoding the MSCRAMMs gives strains of *S. aureus* from subclinical bovine mastitis, high capacity for adhesion and biofilm production *in vitro*, which helps the colonization and persistence of this pathogen.}}

Key-words: *S. aureus*, mastitis, *bap*, *cluster ica*, MSCRAMM.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mastite bovina

A mastite bovina é uma inflamação nas glândulas mamárias de vacas, causada por alterações fisiológicas e/ou metabólicas, traumas e alergias e, mais frequentemente, pela ação de micro-organismos, principalmente bactérias (NAWROTEK, 2011), podendo causar alterações no tecido (LACASSE; ZHAO, 2008).

A mastite se inicia quando os micro-organismos conseguem ultrapassar a barreira anatômica do teto e multiplicam-se na glândula mamária. Os produtos do metabolismo bacteriano, como a liberação de toxinas, ativam a resposta imune do hospedeiro. (SANTOS; FONSECA, 2007).

As células somáticas presentes no leite desempenham papel importante na defesa da glândula mamária contra os agentes infecciosos. Elas são constituídas principalmente pelos leucócitos, cuja função é a defesa do organismo, e compreendem vários tipos celulares. No leite da glândula mamária sadias são encontrados, aproximadamente: macrófagos (60%), neutrófilos (15%) e linfócitos (25%). Além dos leucócitos, as células epiteliais derivadas de ductos e alvéolos também estão presentes (JIA-ZHONG et al., 2010; BHUTTO et al., 2012). O processo inflamatório resultante da agressão à glândula mamária direciona os leucócitos do sangue para a região afetada e, conseqüentemente, aumenta a contagem de células somáticas (CCS) no leite. Durante a infecção intramamária, na secreção láctea dos tetos infectados, passam a predominar neutrófilos, que compõem, aproximadamente, 90% das células presentes, seguidos por macrófagos, linfócitos e o número de células epiteliais permanece inalterado (MULLER, 2002; PALES et al., 2005).

De acordo com Viguier et al. (2009), enquanto são atacados pelos neutrófilos, os micro-organismos invasores danificam as células epiteliais que revestem os alvéolos, causando injúrias teciduais consideráveis, conforme Figura 1.

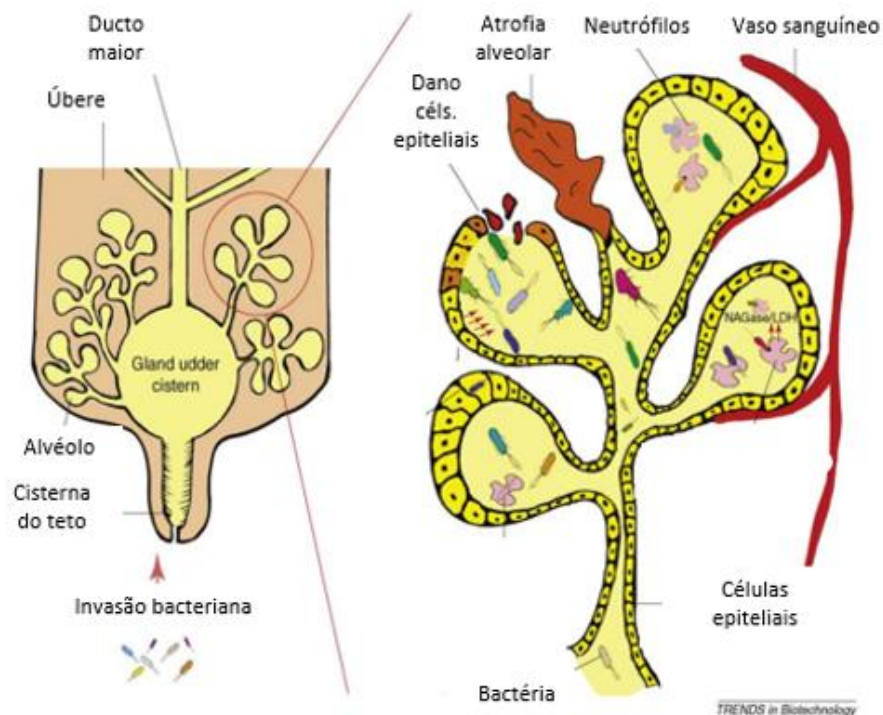


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da mastite em um úbere infectado (VIGUIER et al., 2009)

A doença pode manifestar-se de forma aguda, subaguda ou crônica, sendo denominada como mastite clínica ou subclínica, de acordo com a intensidade e gravidade do processo inflamatório (DELLA LIBERA, 2007)

Segundo Marogna (2011), a mastite clínica se apresenta com sinais patológicos evidentes afetando o úbere, como aumento de tamanho, presença de dor e rubor. As alterações no leite também são visíveis, sendo quantitativas (de redução no volume à ausência) e qualitativas (mudanças na aparência e na composição). A mastite subclínica é caracterizada pela presença de uma infecção intramamária sem sintomas clínicos e é frequentemente acompanhada por aumento da CCS no leite (RADOSTITIS et al., 2002).

A mastite crônica é a manutenção da forma subclínica ou a ocorrência alternada entre as duas formas. É comum a perda definitiva da função do quarto mamário devido à fibrose tecidual, definida como uma inflamação dos úberes que continua durante um longo período de tempo (FONSECA; SANTOS, 2000).

Como a mastite clínica é facilmente detectada, foram desenvolvidos testes rápidos para identificar a subclínica. A maioria são métodos indiretos para estimar a mastite subclínica, baseados na reação das células somáticas com soluções reagentes. Os resultados

desses testes são classificados em escores, conforme a intensidade da reação formada (RODRIGUES, 2008).

O teste mais conhecido e usado para diagnóstico de mastite subclínica em campo é o *California Mastitis Test* (CMT), descrito por Schalm e Noorlander (1959). O teste é realizado *in loco*, através da mistura de um volume igual de leite com uma solução de 3% de lauril sulfato de sódio e púrpura de bromocresol (na diluição 1:1000). As amostras de leite de cada teto são colocadas em um poço limpo de uma plataforma de teste, constituída por um plástico preto e dividida em 4 poços separados, uma para cada amostra representativa de cada teto. À medida que o conteúdo dos poços é homogeneizado por rotação suave da placa, qualquer alteração de cor ou formação de um gel viscoso deve ser interpretada com pontuações dentro de um intervalo de 1 a 4, sendo 0 para nenhuma reação, 1 para um traço, 2 para fraco positivo, 3 para positivo e 4, para fortemente positivo (SCHALM; NOORLANDER, 1959).

A CCS é um método quantitativo amplamente utilizado para avaliar a qualidade do leite e a presença de mastite subclínica (GONÇALVES et al., 2016). A contagem máxima permitida nas propriedades leiteiras é de 200.000 células/mL (BORNE et al., 2011).

A mastite ainda é a doença que causa maior impacto econômico nas bovinoculturas leiteiras no mundo (SHARIFI et al., 2014). Os prejuízos ocorrem por redução na produção de leite, depreciação da qualidade nutritiva, descarte de leite, custos com serviços veterinários e medicamentos, gastos com assistência técnica, reposição de vacas, tempo extra perdido no manejo e aplicação de medicamentos (VOLTOLINI et al., 2001; SAEI et al., 2009). Além disso, o uso de antibióticos para tratamento das vacas doentes contamina o leite, causando mais prejuízos com o descarte do produto e podendo levar à seleção e emergência de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos usados (LAPORT et al., 2011). Demeu et al. (2015) apresentaram um estudo no qual o impacto econômico da mastite, em um ano, foi de R\$160.481,82 para rebanhos de 100 vacas em lactação.

O antibiótico cefquinoma tem sido amplamente utilizado no tratamento das mastites, pois este composto revela alta atividade *in vitro* contra vários agentes patogênicos da espécie bovina (HARTWIG et al., 2014). Este antibiótico pertence à classe das cefalosporinas de quarta geração e age inibindo a síntese da parede bacteriana e provocando a morte da célula (THOMAS et al., 2006).

Ainda há que se considerar o impacto da mastite na saúde pública, uma vez que, através dessa doença, pode ocorrer a transmissão de micro-organismos patogênicos e seus

produtos ao homem, pelo consumo de leite e derivados não pasteurizados, causando infecções e intoxicações (BALABAN; RASSOLY, 2000; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A mastite subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica por alastrar-se silenciosamente pelo rebanho, sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou de sua secreção (BARBALHO; MOTA, 2001). Além disso, é responsável pela maior parte dos prejuízos econômicos, por não poder ser diagnosticada previamente (MARTINS et al., 2010).

1.2. Agentes etiológicos da mastite bovina

Os agentes etiológicos da mastite bovina podem ser classificados em contagiosos ou ambientais, de acordo com a fonte de infecção. Na mastite contagiosa, o agente é encontrado no úbere e é transmitido durante a ordenha e na ambiental, a vaca se infecta por micro-organismos encontrados no meio ambiente (COSTA, 1998; COSTA et al., 2000; RADOSTITIS et al., 2002).

Os patógenos ambientais mais comuns são os coliformes, principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. (VOLTOLINI et al., 2001). As infecções por *E. coli* na glândula mamária estão relacionadas com o comportamento oportunista do agente, que é veiculado pelas fezes dos animais e utiliza a via ascendente do canal galactóforo (EBERHART, 1979). A principal fonte de *Klebsiella* spp nas fazendas leiteiras é o material orgânico usado nas camas (MUNOZ et al., 2007).

Entre os patógenos contagiosos destacam-se os gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Algumas espécies de *Streptococcus* são importantes causadoras de mastite, sendo as mais frequentes depois dos estafilococos (GUÉRIN-FAUBLÉE et al., 2002; McDONALD et al., 2005).

Staphylococcus é o gênero bacteriano mais frequentemente isolado de casos de mastite (MAROGNA et al., 2011) e *S. aureus* é a principal espécie envolvida devido à sua capacidade de induzir infecções muito duradouras (VOLTONILI et al., 2001; MARTINS et al., 2010; CHENGet al., 2010).

1.3. Estabelecimento da mastite bovina por *S.aureus*

S. aureus faz parte do gênero *Staphylococcus*, pertencente à família Staphylococcaceae (DSMZ, 2015). São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e se agrupam em formato de cachos e fazem parte do grupo de estafilococos coagulase positiva (ECP), por apresentarem a enzima coagulase (KONEMAN et al., 2008).

Dentro dos rebanhos, as fontes mais importantes de infecção por *S. aureus* são os tetos lesionados infectados, conjunto de teteiras do equipamento de ordenha colonizado, uso dos mesmos materiais de limpeza em todos os animais e as mãos dos ordenhadores (BRADLEY, 2002).

A infecção por *S. aureus* tem caráter principalmente subclínico. Essa espécie bacteriana tende a induzir uma resposta imune mais branda com limitada expressão de citocinas, que contribui no estabelecimento de infecções intramamárias crônicas (BANNERMAN et al, 2004).

A patogenicidade de uma bactéria é um processo multifatorial que envolve uma variedade de componentes, muitos dos quais são coordenadamente regulados para permitir ao micro-organismo se adaptar ao hospedeiro e se tornar um patógeno bem-sucedido (MERGHNI, 2015). *S. aureus* possui uma vasta gama de fatores de virulência que podem contribuir de diferentes maneiras para sua patogenicidade (CHO et al., 2002; WANG et al., 2009).

1.3.1. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* envolvidos nos casos de mastite bovina

A expressão da maioria dos fatores de virulência em *S. aureus* é controlada pelo *locus agr* (*accessory gene regulator*), que compreende dois *operons* divergentes, RNAII e RNAIII, expressos pelos promotores P2 e P3, respectivamente (NOVICK; GEISINGER, 2008). O operon P2 inclui quatro genes: *agrA*, B, C e D. Os genes *agrD* e *agrB* atuam juntos para codificar o peptídeo autoindutor (PAI); *agrD* codifica a sequência e *AgrB*, uma endopeptidase transmembrana, atua no processamento e/ou excreção do PAI. Os produtos dos genes *agrC* e *agrA*, codificam um sensor de membrana (*AgrC*) e um regulador de resposta (*AgrA*) (KHORAMROOZ et al., 2016).

O sistema Agr funciona como um sistema *quórum sensing*, pois quando a densidade populacional bacteriana aumenta, as concentrações de PAI também se elevam, interagindo com o sensor AgrC na membrana, ativando AgrA, que é uma proteína ligadora de DNA que ativa os promotores P2 e P3. O promotor P3 inicia a transcrição da δ -hemolisina (gene *hdi*) e do efetor RNAIII. O RNA III é o principal efetor do sistema agr, pois regula a expressão de muitos fatores de virulência, incluindo a maioria dos codificadores de proteínas associadas à parede celular e proteínas extracelulares (GONG et al., 2014).

Um polimorfismo na sequência de aminoácidos do peptídeo autoindutor codificado (*agrD*) e de seu receptor correspondente (*agrC*), classificam as cepas de *S. aureus* em quatro grupos alélicos: AgrI, II, III e IV (JARRAUD et al., 2002). Dentro de um grupo, os isolados são capazes de produzir um peptídeo que ativa a resposta *agr* nas outras cepas do mesmo grupo mas, normalmente, o peptídeo autoindutor produzido por grupos diferentes inibe essa resposta. Esta inibição é uma forma de interferência bacteriana que não resulta em inibição de crescimento, mas sim, num bloqueio da expressão de genes acessórios, muitos destes, de virulência (SHOPSIN et al., 2003).

Aparentemente, cepas pertencentes ao mesmo grupo *agr* apresentam constituição genética e propriedades biológicas semelhantes e casos de mastite estão mais relacionados com o grupo *agrI*, associado com a persistência das bactérias no úbere, uma vez que as cepas de *S. aureus* desse grupo têm maior capacidade de invasão em células epiteliais (BARDIAU et al., 2016).

Os grupos *agrII* e *agrIII* geralmente estão associados a isolados com resistência a antimicrobianos e o *agrIV* parece estar envolvido com cepas produtoras de esfoliatina, envolvidas na síndrome da pele escaldada. (JARRAUD et al., 2000; SAKOULAS et al., 2003; MOISE-BRODER et al., 2004; VAUTOR et al., 2007).

1.3.1.1. Adesão e invasão

A adesão das bactérias nas células hospedeiras é um importante fator de virulência, essencial para o estabelecimento da doença uma vez que posiciona o patógeno no tecido alvo apropriado. É o primeiro passo para a formação do biofilme e, nesse processo, as células permanecem localizadas extracelularmente (MOLINARI; CHHATWAL, 1999). Uma bactéria pode adentrar o sistema hospedeiro por fagocitose, através de células do sistema imunológico,

ou induzindo esse processo em células não fagocitárias, mecanismo conhecido como invasão (FINLAY; COSSART, 1997).

Assim, o potencial invasivo dos patógenos constitui um importante fator de virulência relacionado às mastites, permitindo sua instalação em partes mais profundas da glândula mamária (FINLAY, 1990; HENSEN et al. 2000).

O processo de invasão, portanto, requer dois passos principais: adesão à superfície da célula hospedeira e internalização. Esses passos envolvem a participação da bactéria patogênica e da célula eucariótica hospedeira, pois ambas precisam facilitar a aderência, proporcionando ligantes a receptores correspondentes. Além disso, a bactéria precisa transmitir um sinal de invasão através da membrana da célula hospedeira para induzir os rearranjos de citoesqueleto necessários para a entrada do patógeno (TANG et al., 1993).

A internalização das bactérias patogênicas pelas células hospedeiras permite às bactérias ocuparem um microambiente livre de mecanismos de defesa dos hospedeiros (FINLAY; COSSART, 1997). Além disso, dentro das células, as bactérias garantem uma fonte de nutrientes e ficam protegidas da ação de antibióticos (CIFRIAN et al., 1994; ALVA-MURILLO et al., 2011).

Segundo Veiga et al. (2007), *S. aureus* expressa proteínas de invasão que interagem diretamente ou indiretamente com receptores da célula hospedeira, iniciando uma cascata de sinalização, resultando em extensões da membrana que circundam a bactéria e a internalizam.

Dentre a grande variedade de fatores de virulência de *S. aureus*, há um grupo de proteínas de superfície que são covalentemente ligadas ao peptidoglicano, conhecidas como proteínas ancoradas à parede celular (CWA - *Cellwall-Anchored Proteins*) (FOSTER et. al, 2014). O grupo de proteínas CWA mais prevalente é constituído pelas adesinas conhecidas como MSCRAMMs (*) (FOSTER; HOOK, 1998).

Muitas proteínas de superfície bacteriana não são MSCRAMMs e algumas MSCRAMMs têm funções adicionais, além de promover a adesão. Foster et. al (2014) propuseram usar o termo MSCRAMM para definir uma família de proteínas com base em suas semelhanças estruturais e em seus mecanismos comuns para adesão. As MSCRAMMs são mediadoras da adesão de *S. aureus* a componentes específicos da matriz extracelular de uma grande variedade de tecidos humanos ou animais (CUCARELLA et al., 2002).

Algumas adesinas são redundantes: existem duas proteínas ligadoras de fibronectina (FnBPA e FnBPB) e três ligadoras de fibrinogênio (Fatores clumping A e B e a proteína

ligadora de fibrinogênio Fib) (VANCRAEYNEST et al., 2004). Wann et al. (2000), relataram que as FnBPs também podem se ligar ao fibrinogênio.

A fibronectina é uma glicoproteína presente na forma solúvel em fluidos corpóreos ou na forma multimérica insolúvel. Dois tipos de proteínas ligadoras de fibronectina e seus respectivos genes foram identificados em *S. aureus*, FnBPA e FnBPB (FOWLER et al., 2000). Essas proteínas são mediadoras da adesão bacteriana e, em algumas cepas, são mediadoras da fase de acumulação da formação de biofilme, além de promoverem a internalização da bactéria em células epiteliais e endoteliais (GEOGHEGAN et al., 2014). Nos casos de mastite, as FnBPs contribuem para adesão e invasão bacteriana à glândula mamária e inibem a fagocitose (ZUNIGA et al., 2015).

Os fatores *clumping* (Clfs) são proteínas presentes na maioria das cepas de *S. aureus* humanas e bovinas. Eles interagem com o fibrinogênio, uma glicoproteína plasmática de 340 kDa com importante papel na hemostase (WALSH et al., 2008). Os fatores clumping A e B, codificados pelos genes *clfA* e *clfB*, são importantes na adesão e na evasão do sistema imune. (SCALI et al., 2015) e sua expressão é influenciada pela fase de crescimento, cepa e condição ambiental (CAMUSSONI et al., 2013). ClfA promove a adesão bacteriana aos coágulos plasmáticos e ClfB promove a aglutinação celular na presença do fibrinogênio solúvel e é mediador da adesão ao fibrinogênio imobilizado. Essas duas proteínas agem sinergicamente, de forma que a bactéria possa aderir mais firmemente ao trombo na corrente sanguínea (FOSTER; HOOK, 1998). O gene *fib* codifica outra proteína ligadora de fibrinogênio (Fib) que, diferente dos fatores de coagulação, não promove a polimerização de fibrinogênio à fibrina (BODÉN; FLOCK, 1994).

A proteína ligadora de colágeno (Cna), codificada pelo gene *cna*, é mediadora da adesão da bactéria a substratos e tecidos colagenosos. A presença dessa proteína também é necessária para a aderência de *S. aureus* a tecidos cartilagosos *in vivo* (SIMOJOKI et al., 2012). Poucas cepas de *S. aureus* possuem esse gene e sua importância nos casos de mastite ainda não foi estabelecida (REINOSO et al., 2008).

A elastina é o principal componente das fibras elásticas e tem importante atuação na manutenção da integridade e função de tecidos flexíveis. *S. aureus* é capaz de aderir a diversos tecidos ricos em elastina através da proteína EbpS (gene *ebpS*) (DOWNER et al., 2002). O gene *eno* codifica a proteína ligadora de laminina, uma proteína de superfície que contribui para a colonização de *S. aureus* através da ligação à laminina, presente na matriz extracelular (CARNEIRO et al., 2004).

1.3.1.2. Biofilme

O biofilme é definido como uma comunidade microbiana séssil caracterizada por células ligadas a um substrato e umas às outras, embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelas próprias bactérias, exibindo um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição gênica, quando comparado com células livres (DONLAN; COSTERTON, 2002; CLUTTERBUCK et al., 2007).

Os biofilmes podem ser constituídos de cultivo puro, mas geralmente estão em associação com outros micro-organismos (RICKARD et al., 2003). Essas estruturas são constituídas de proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e, principalmente, água. Existem poros e canais de água que constituem um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser excretados do biofilme (STOODLEY et al., 2002). Em vários micro-organismos, a estrutura e estabilidade dos biofilmes são dependentes da presença de DNA extracelular (eDNA) (FISCHER et al., 2014).

A formação de biofilme é um processo dinâmico que envolve a fixação dos micro-organismos e a maturação da matriz. A adesão inicial a uma grande variedade de superfícies, incluindo superfícies abióticas e tecidos vivos, ocorre através das MSCRAMMs (SEO et al., 2008; ROHDE et al., 2010).

Fatores ambientais como açúcares (glicose e/ou lactose) ou proteases presentes no meio de crescimento, concentrações de ferro, Ca^{2+} , Mn^{2+} , EDTA, oxigênio e carbono, pH e osmolaridade influenciam a formação de biofilme, que também depende da constituição genética da cepa (MELCHIOR et al., 2009).

Existem diferentes teorias para a formação do biofilme, sendo que a primeira foi proposta por Marshall et al. (1971), segundo o qual o processo ocorreria em duas etapas. Na primeira etapa, a adesão dos micro-organismos à superfície seria reversível, pois os mesmos estariam ligados fracamente à superfície, mantidos por interações físico-químicas não específicas. Na segunda etapa, a adesão se tornaria irreversível, pois o tempo de contato seria maior, com produção de uma matriz extracelular de natureza polissacarídica ou proteica.

Atualmente, a teoria mais aceita envolve múltiplos estágios. O processo se iniciaria com a adesão de bactérias planctônicas à uma superfície, biótica ou abiótica, de forma aleatória. Em seguida, ocorreria a proliferação e acúmulo de células em multicamadas e as bactérias passariam a secretar as substâncias que formam a matriz, essencialmente constituída

de exopolissacarídeos (EPS), mas também poderia conter proteínas de superfície responsáveis pela adesão bacteriana. Na terceira etapa, ocorreria o desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme e, em seguida, sua maturação. A quinta e última etapa ocorreria sem condições ambientais favoráveis para a persistência do biofilme, com o descolamento de agregados celulares ou de células planctônicas, deixando as bactérias livres e aptas a colonizar novas superfícies, reiniciando o processo (STOODLEY et al., 2002; CUE et al., 2012; JOO e OTTO, 2012), conforme Figura 2.

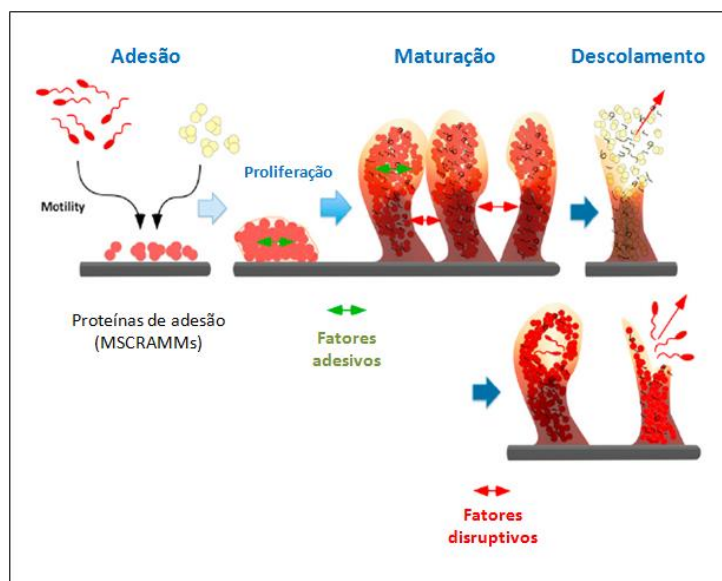


Figura 2. Fases do desenvolvimento de biofilme *in vivo* (JOO e OTTO, 2012).

No caso das mastites, além de auxiliar na colonização do micro-organismo e sua aderência ao epitélio da glândula mamária, a produção de biofilme protege as bactérias do sistema imune do hospedeiro e da ação de antimicrobianos, uma vez que a difusão dos antibióticos através da matriz de biofilme é reduzida (AGUILAR et al., 2001; PEREIRA et al., 2009).

Embora múltiplos fatores bacterianos e externos influenciem a adesão e o acúmulo de células bacterianas, a produção de adesinapolissacarídica intercelular (PIA) ou N-acetilglicosamina polimérica (PNAG) é o mecanismo de formação de biofilme mais bem conhecido em estafilococos (MACK et al., 2007; O’GARA, 2007). PIA ou PNAG é um dos componentes da matriz exopolissacarídica produzida no biofilme e tem peso molecular de 460 kDa (PACE et al., 2005).

O antígeno capsular polissacarídico denominado polissacarídeo/adesina capsular (PS/A) é o responsável pela adesão inicial da bactéria à superfície. Em seguida, ocorre a

multiplicação bacteriana para formar o biofilme, em de múltiplas camadas, associado com a produção de PIA/PNAG (KRISTIAN et al., 2004). O *operon icaADBC* está envolvido na ligação entre as células bacterianas, codificando as proteínas mediadoras da síntese de PIA e PS/A (O'NEIL et al., 2007).

Esse *operon* é composto dos genes *icaR* (regulatório) e *icaADBC*, sendo *icaA* e *icaD*, os mais importantes na formação de biofilme em *S. aureus* (VASUDEVAN et al., 2003). As proteínas IcaA, C e D estão localizados na membrana, enquanto IcaB é uma proteína ligada à superfície. O produto do gene *icaA* é uma proteína transmembrana homóloga à N-acetilglicosaminiltransferase, enzima envolvida na síntese de N-acetilglicosamina (ARCIOLA et al., 2001). IcaD é uma proteína chaperona que direciona a conformação da estrutura proteica do produto de *icaA* e sua inserção na membrana. Além disso, age como um ligante entre IcaA e IcaC (GÖTZ, 2002).

O produto do gene *icaD* otimiza a atividade de IcaA, pois os oligômeros de N-acetilglicosamina produzidos por *icaAD* alcançam um comprimento máximo de 20 resíduos. Quando *icaAD* é coexpresso com *icaC*, que codifica uma outra proteína de membrana, cadeias de oligômeros mais longas são sintetizadas. O gene *icaC* também parece estar envolvido na translocação do polissacarídeo para a superfície celular. A proteína IcaB é responsável pela desacetilação da molécula poli-N-acetilglicosamina, pois foi demonstrado que cepas mutantes que não sofrem a desacetilação dessa molécula não podem aderir à superfície da célula bacteriana ou mediar o desenvolvimento do biofilme (VUONG et al., 2004).

O *locus icaADBC* tem um papel muito importante nas vias reguladoras que controlam a produção de PIA/PNAG para o desenvolvimento de biofilmes estafilocócicos, porém estão envolvidos apenas na adesão intercelular, que pode também ser mediada por proteínas ou outras estruturas da parede celular. Portanto, algumas cepas de *S. aureus* podem produzir biofilme independente do *operon ica*. Nesses casos, outros genes que codificam proteínas de superfície são responsáveis pelo processo (KOGAN et al., 2006; COELHO et al., 2008).

O gene *bap* está localizado em um transposon inserido em *SaPIbov2*, uma ilha de patogenicidade móvel estafilocócica. Esse gene codifica a proteína Bap (biofilm-associated protein – proteína associada ao biofilme), muito importante no processo de formação do biofilme e foi identificado pela primeira vez em uma cepa de *S. aureus*, isolado de mastite bovina (CUCARELLA et al., 2001). Essa proteína é composta por 2276 aminoácidos, possui peso molecular de, aproximadamente, 240 kDa e apresenta a arquitetura característica de

proteínas associadas à superfície de bactérias Gram-positivas. O domínio N-terminal (819 aminoácidos) inclui uma sequência sinal para a secreção extracelular e, na maior parte, é desprovida de repetições. A região que abrange os resíduos 820 a 2148 é composta por 13 repetições idênticas, cada uma com 86 aminoácidos de comprimento e que parecem estar envolvidas na adesão celular. Após essa longa região de repetição, Bap contém um trecho de sequência rico em resíduos de serina e ácido aspártico, semelhante à família de proteínas de superfícies já bem conhecidas no gênero *Staphylococcus*. A porção C-terminal de Bap contém uma típica zona de fixação da parede celular, uma sequência transmembranar hidrofóbica e um terminal C carregado positivamente (ARRIZUBIETA et al., 2004; LASA e PENADÉS, 2006). Essa proteína é responsável pela aderência inicial à superfície e pela ligação entre as células bacterianas, enquanto PIA/PNAG é responsável apenas pela adesão intercelular (CUCARELLA et al., 2001; CUCARELLA et al., 2002; CUCARELLA et al., 2004).

Não há relatos da presença do gene *bap* em estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras humanas, tendo sido encontrado apenas em isolados provenientes de glândula mamária de ruminantes com mastite (VAUTOR et al., 2008; VALLE et al., 2012).

1.3.2. Culturas celulares como modelo de estudo de adesão, invasão e produção de biofilme

Após adentrarem o lúmen da glândula mamária pelo canal do teto, as bactérias são capazes de se replicar rapidamente no leite e as células epiteliais são um dos primeiros componentes do tecido a entrar em contato com o patógeno, desempenhando um papel fundamental como sentinelas e sendo reguladas para responder rapidamente à adesão e invasão bacteriana, por meio da ativação de vários receptores (GILBERT et al., 2013).

Assim, diversos pesquisadores utilizaram esse tipo celular, tanto em culturas primárias de epitélio mamário bovino (OCHOA-ZARZOSA et al., 2009; TÉLLEZ-PÉREZ et al., 2012; BOUCHARD et al., 2013) quanto em linhagens imortalizadas, como HeLa e MAC-T (KIM et al., 2011; BARDIAU et al., 2016), para estudar as interações entre os fatores de virulência bacterianos e as células hospedeiras.

Culturas celulares são constituídas por células animais ou vegetais, isoladas de tecidos vivos, que continuam a crescer *in vitro* em condições controladas de temperatura, umidade, oxigênio e gás carbônico. As células em cultura são capazes de crescer e se dividir normalmente, de forma similar ao que ocorre *in vivo*, se os nutrientes necessários forem

fornecidos por meios de cultura. O meio de cultura para células é líquido e possui, basicamente, sais inorgânicos (tais como cálcio, ferro, magnésio, potássio, entre outros), aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, antibióticos, uma fonte de energia como a glicose e um indicador de pH, como o vermelho de fenol. Os componentes do meio variam de acordo com a necessidade de cada linhagem celular (FIOCRUZ, 2014).

As culturas celulares diferem em seu potencial proliferativo, podendo ser finitas ou contínuas. As culturas celulares primárias são formadas a partir de células que migram de um tecido, ou de um pedaço dele, desagregado por método enzimático, químico ou mecânico. As células que sobreviverem a esse processo se aderem à garrafa de cultura (ou sobrevivem em suspensão) e se proliferaram. A morfologia dessas células é similar à do tecido parental, mas suportam um número limitado de divisões celulares, entrando em senescência. Caso haja uma mutação estável e hereditária, conhecida como imortalização, origina-se uma linhagem celular contínua, que possui potencial proliferativo ilimitado. Culturas de células humanas raramente se tornam imortais, necessitando de uma manipulação genética adicional para formar uma linhagem contínua. No entanto, culturas celulares derivadas de tumores humanos são frequentemente imortais (FRESHNEY, 2010).

A linhagem celular HeLa foi estabelecida em 1951 e é proveniente de células tumorais retiradas de uma paciente com câncer cervical, Henrietta Lacks. Esta foi a primeira tentativa bem-sucedida de imortalizar células *in vitro*. O crescimento robusto e a distribuição irrestrita das células HeLa resultaram na sua larga adoção tanto intencionalmente como por contaminação cruzada e há mais de 60 anos essas células tem prestado um papel análogo àquele de um organismo modelo (ADEY et al., 2013).

Existem linhagens de células de glândulas mamárias bovinas já estabelecidas, como as células MAC-T (Mammary Alveolar Cell-T), que são as mais conhecidas. Elas foram imortalizadas por Huynh et al. (1991) após serem transfectadas pelo antígeno T SV40. Contudo, tanto esta linhagem de células de glândula mamária quanto outras existentes, não preservaram as características das células originais, pois possuem características não condizentes com culturas de células não transformadas. (JEDRZEJCZAK e SZATKOWSKA, 2014).

As culturas celulares de epitélio mamário bovino (BMECs) são culturas primárias obtidas através de explante de glândula mamária de vacas. Essas células não possuem uma morfologia epitelial típica, apresentando aspecto alongado com processos longos delgados que se sobrepõe à superfície das células vizinhas (SCHMID et al., 1983a; ZHAO et al., 2010).

As BMECs sintetizam principalmente citoqueratina e proteínas desmossomais (SCHMID et al., 1983b). Quando essas células são obtidas através de explante, têm a vantagem de possibilitar um modelo de estudo mais próximo àquele encontrado *in vivo*, mimetizando os processos biológicos que de fato ocorrem nas glândulas mamárias dos animais e promovendo resultados mais fidedignos (STRANDBERG et al., 2005; ROSE e McCONOCHIE, 2006).

CONCLUSÃO

A presença dos genes relacionados à produção de biofilme associada à presença dos genes codificadores das MSCRAMMs confere às cepas de *S. aureus*, provenientes de mastite bovina subclínica, alta capacidade de adesão e produção de biofilme *in vitro*, o que contribui para a colonização e persistência da espécie. O biofilme é um importante fator de virulência, pois proporciona resistência ao principal antimicrobiano utilizado nos casos de mastite, dificultando o tratamento. *S. aureus* pode apresentar alto potencial invasivo em BMECs, o que pode inviabilizar a visualização de biofilme nesse tipo celular, sendo mais adequado o uso de células de origem diferente, como a HeLa, onde os índices de invasão foram baixos.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, R. A.; MALTHERS, K. R.; CIFRIAN, E. GUIDRY, A. J.; OLIVER, S. P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1021-1026, 1996.

ALVA-MURILLO, N.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus* into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. **Veterinary Microbiology**, v. 55, n. 2–4, p. 324–331, 2011.

AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; LEIVA, J.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J. L.; YAHIO, J. H. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 43-55, 1999.

ANAYA-LÓPEZ, J.; CONTRERAS-GUZMÁN, O. E.; CÁRABEZ-TREJO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; OCHOA-ZARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 358–361, 2006.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151–2156, 2001.

BARDIAU, M.; DETILLEUX, J.; FARNIR, F.; MAINIL, J. G.; OTE, I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 1, p. 74-79, 2014.

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. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2292-2295, 2003a.

BROUILLETTE, E.; GRONDIN, G.; SHKRETA, L.; LACASSE, P.; TALBOT, B. G. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, n. 4, p. 159-168, 2003b.

BROUILLETTE, E., HYODO, M., HAYAKAWA, Y., KARAOLIS, D. K., & MALOUIN, F. 3', 5'-Cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3109-3113, 2005.

BUDRI, P. E.; SILVA, N. C. C.; BONSAGLIA, E. C. R.; FERNANDES, A., ARAÚJO, J. P., DOYAMA, J. T.; GONÇALVES, J. L.; FITZGERALD-HUGHES, D.; RALL, V. L. M. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 5899-5904, 2015.

CAGNINI, D. Q. **In vitro mRNA differential expression in Bovine Herpesvirus infection**. Botucatu, 2014. 90p. Thesis (PhD) - School of Veterinary Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho.

CARVALHAIS, V.; FRANÇA, A.; PIER, G.; VILANOVA, M.; CERCA, N.; VITORINO, R. Comparative proteomic and transcriptomic profile of *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown in glucose- enriched medium. **Talanta**, v. 132, p. 705-712, 2015.

CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

COENYE, T.; NELIS, H. J. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 89–105, 2010.

CRISTOVAM, P. C.; GLÓRIA, M. A. D.; MELO, G. B.; GOMES, J. Á. P. Importância do co-cultivo com fibroblastos de camundongo 3T3 para estabelecer cultura de suspensão de células epiteliais do limbo humano. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 5, p. 689-694, p. 2008.

CUCARELLA, C.; COLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, P. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2888–2896, 2001.

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

CRL-AR. Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance Multiplex PCR for the detection of the *mecA* gene and the identification of *Staphylococcus aureus* **National Food Institute. Technical University of Denmark**. Copenhagen, 2009.

DOBINSKY, S.; KIEL, K.; ROHDE, H.; BARTSCHT, K.; KNOBLOCH, J. K. M.; HORSTKOTTE, M. A.; MACK, D. Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2879-2886, 2003.

FOWLER, T.; WANN, E. R.; JOH, D.; JOHANSSON, S.; FOSTER, T. J.; HÖÖK, M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins. **European Journal of Cell Biology**, v. 79, n. 10, p. 672-679, 2000.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; WINTER, S.; OSBOM, K. Widespread occurrence of intermediate-size filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. **Experimental Cell Research**, v. 123, n. 25-46, 1979.

GARZONI, C.; KELLEY, W. L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 59-65, 2009.

HENSEN, S. M.; PAVIČIĆ, M. J. A. M. P.; LOHUIS, J. A. C. M.; POUTREL, B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 8, n. 3, p. 418-429, 2000.

IKAWATY, R.; BROUWER, E. C.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. **International Journal of Dairy Science**, v. 5, n. 2, p. 60-70, 2010.

JAKUBOVICS, N. S.; SHIELDS, R. C.; RAJARAJAN, N.; BURGESS, J. G. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 467-475, 2013.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, 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. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 631-641, 2002

KHORAMIAN, B.; JABALAMELI, F.; NIASARI-NASLAJI, A.; TAHERIKALANI, M.; EMANEINI, M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. **Microbial pathogenesis**, v. 88, p. 73-77, 2015.

KHORAMROOZ, S. S.; MANSOURI, F.; MARASHIFARD, M.; HOSSEINI, S. A. A. M.; CHENARESTANE-OLIA, F. A.; GANAVEHEI, B.; GHARIBPOUR, F.; SHAHBAZI, A.; MIRZAI, M.; DARBAN-SAROKHALIL, D. Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 45-51, 2016.

KIEDROWSKI, M.R.; KAVANAUGH, J.S.; MALONE, C.L.; MOOTZ, J.M.; VOYICH, J.M.; SMELTZER, M.S.; BAYLES, K.W.; HORSWILL, A.R. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PloS One**, v. 6, n. 11, p. e26714, 2011.

KLEIN, R. C.; FABRES-KLEIN, M. H.; BRITO, M. A. V. P.; FIETTO, L. G.; RIBON, A. D. O. B. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 183-188, 2012.

KOCHUT, A.; DERSCH, P. Bacterial invasion factors: tools for crossing biological barriers and drug delivery?. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 2, p. 242-250, 2013.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. **Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas**. Ed. Médica Panamericana, 2008.

KRISTIAN, S. A.; GOLDA, T.; FERRACIN, F.; CRAMTON, S. E.; NEUMEISTER, B.; PESCHEL, A.; GÖTZA, F.; LANDMANN, R. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 237–245, 2004.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; ANAND, S. K.; SINGH, R. S. Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 1, p. 31-38, 2011.

MADIN, S. H.; DARBY, N. B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 98, n. 3, p. 574-576, 1958.

MAROGNA, G.; PILO, C.; VIDILI, A.; TOLA, S.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S. G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 102, n. 1, p. 74-83, 2011.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D. J.; FATMA, T.; RATTAN, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 25, 2006.

MELCHIOR, M. B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 53, n. 7, p. 326-332, 2006.

MELCHIOR, M. B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. **Veterinary Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 141-149, 2007.

MERGHNI, A.; NEJMA, M. B.; HELALI, I.; HENTATI, H.; BONGIOVANNI, A.; LAFONT, F.; AOUNI, M.; MASTOURI, M. Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 86, p. 1-9, 2015.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standards**. Waine: NCCLS, Document M31-T, 1997. 64p.

NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 292-299, 2007.

OKSHEVSKY, M.; MEYER, R. L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, 2015.

OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R. R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86, 2002.

O'NEILL, E.; POZZI, C.; HOUSTON, P.; SMYTH, D.; HUMPHREYS, H.; ROBINSON, D. A.; O'GARA, J. P. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1379-1388, 2007.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, 278-282, 2009.

PEREYRA, E.; PICECHC, F.; RENNA, M. S.; BARAVALLEA, C.; ANDREOTTIA, C. S.; RUSSIC, R.; CALVINHOD, L. F.; DIEZC, C.; DALLARDA, B. E. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 183, p. 69-77, 2016.

ROHDE, H.; BURANDT, E. C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; SCHERPE, S.; DAVIES, A. P.; HARRIS, L. G.; HORSTKOTTE, M. A.; KNOBLOCH, J. K. M.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J. B.; MACK, D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1711-1720, 2007.

SALABERRY, S. R. S.; SAIDENBERG, A. B. S.; ZUNIGA, E.; MELVILLE, P. A.; SANTOS, F. G. B.; GUIMARAES, E. C.; GREGORI, F.; BENITES, N. R. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 85, p. 35-39, 2015.

SHARIFI, H.; SARDOOEI, AM. A.; ABADI, M. B.; BABAEI, H. Economic impacts of mastitis in dairy cows: case study of Tehran Province, Iran. **Iranian Journal of Veterinary Surgery**, v. 9, n. 2, 2014.

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

SHUKLA, S K.; RAO, T. S. Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 448-454, 2013.

SCHULTHESS, B.; BLOES, D.A. FRANCOIS, P. GIRARD, M. SCHRENZEL, J., BISCHOFF, M.; BERGER-BACHI, B. The sigmaB dependent yabJ-spoVG operon is involved in the regulation of extracellular nuclease, lipase, and protease expression in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 4954–4962, 2011.

SIMOJOKI, H.; HYVÖNEN, P.; FERRER, C. P.; TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection?. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 3, p. 344-352, 2012.

SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2, p. 170-175, 2010.

SNEL, G. G. M.; MALVISI, M.; PILLA, R.; PICCININI, R. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 3, p. 489-495, 2014.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; MILEWSKI, S.; FRANKOWSKA, A.; AKUBCZAK, A. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. **Polish Journal Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 65-9, 2012.

TORMO, M. A.; KNECHT, E.; GÖTZ, F.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v.151, n. 7, p. 2465-2475, 2005.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4465-4467, 2003.

VALLE, J.; LATASA, C.; GIL, C.; TOLEDO-ARANA, A.; SOLANO, C.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. **PLOS Pathogen**, v.8, n.8, 2012.

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

WALSH, E. J.; WALSH, E. J.; MIAJLOVIC, H.; GORKUN, O. V.; FOSTER, T. J. Identification of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the α C-domain of human fibrinogen. **Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 550-558, 2008.

YOU, Y.; XUE, T.; CAO, L.; ZHAO, L.; SUN, H.; SUN, B. *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 5, p. 603-612, 2015.

ZAKIKHANY, K.; NAGLIK, J. R.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; HOLLAND, G.; SCHALLER, M.; HUBE, B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 2938-2954, 2007.

ZHANG, L.; LI, Y.; BAO, H.; WEI, R.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; WANG, R. Population structure and antimicrobial profile of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis in China. **Microbial Pathogenesis**, 2016.

ZHAO, K.; LIU, H. Y.; ZHOU, M. M.; LIU, J. X. Establishment and characterization of a lactating bovine mammary epithelial cell model for the study of milk synthesis. **Cell Biology International**, v. 34, n. 7, p. 717-721, 2010.

ZMANTAR, T.; CHAIEB, K.; MAKNI, H.; MILADI, H.; ABDALLAH, F. B.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 308-314, 2008.

ZUNIGA, E.; MELVILLE, P. A.; SAIDENBERG, A. B. S.; LAES, M. A.; GONSALES, F. F.; SALABERRY, S. R. S.; GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E. SANTOS, F. G. B.; LINCOPAN, N. E.; BENITES, N. R. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. **Microbial Pathogenesis**, v. 89, p. 1-6, 2015.