

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLONAL, FATORES DE  
VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM  
*Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE LEITE OVINO

**KATHERYNE BENINI MARTINS**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Geral e Aplicada, Área de  
concentração Biologia de Parasitas e  
Micro-organismos (BPM).

**BOTUCATU-SP**

**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLONAL, FATORES DE  
VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM  
*Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE LEITE OVINO

**KATHERYNE BENINI MARTINS**

**Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha (ORIENTADOR)**

**Luiz Francisco Zafalon (CO-ORIENTADOR)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos (BPM).

**BOTUCATU-SP**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Martins, Katheryne Benini.

Caracterização do perfil clonal, fatores de virulência e determinação da resistência em *staphylococcus* spp. isolados de leite ovino / Katheryne Benini Martins. – Botucatu : [s.n], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha.

Coorientador: Luiz Francisco Zafalon.

Capes: 21201021

1. Mastite. 2. Ovino - Doenças. 3. Estafilococos. 4. Drogas – Resistência em microorganismos. 5. Virulência (Microbiologia).

Palavras-chave: Mastite; Ovinos; Resistência antimicrobiana; *Staphylococcus* spp.; Virulência.

## **Agradecimentos**

A Deus por tudo o que tem proporcionado na minha vida;

A minha mãe Kelly e avós Arlindo e Edith por investirem na minha educação e por acreditarem em mim muitas vezes mais do que eu mesma;

A minha irmã Keyth e meu tio Kleyson pelo apoio incondicional;

A professora Dra. Maria de Lourdes pela orientação e ensinamentos;

Ao Dr. Luiz Francisco Zafalon pelos ensinamentos.

A Dra. Simone e as alunas Aline e Ariane pela coleta das amostras na fazenda Edgárdia;

A Dra. Patrícia pela colaboração nas coletas das amostras e elaboração dos artigos;

Aos meus queridos amigos: Taísa, Adilson, Valéria, Danilo e Mariana pela amizade, apoio e pela ajuda na execução do trabalho;

A todos os outros amigos que conheci dentro e fora da faculdade pela amizade e companherismo.

A todos os colegas do laboratório e do Departamento de Microbiologia e Imunologia por me apoiarem sempre que precisei;

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados avós Arlindo e Edith que sempre me incentivaram a estudar.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

|                                                                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                                                                                                                             | <b>13</b> |
| <b>1.1. Objetivos.....</b>                                                                                                                                 | <b>27</b> |
| 1.1.1 Objetivo geral.....                                                                                                                                  | 27        |
| 1.1.2 Objetivos específicos.....                                                                                                                           | 27        |
| <b>1.2. Referências Bibliográficas.....</b>                                                                                                                | <b>28</b> |
| <b>2. ARTIGO I.....</b>                                                                                                                                    | <b>39</b> |
| <b>Resumo</b>                                                                                                                                              |           |
| <b>2.1 Introdução.....</b>                                                                                                                                 | <b>41</b> |
| <b>2.2 Resultados.....</b>                                                                                                                                 | <b>42</b> |
| 2.2.1 Resistência Antimicrobiana.....                                                                                                                      | 42        |
| 2.2.2 Detecção de Toxinas.....                                                                                                                             | 43        |
| 2.2.3 Detecção de Biofilme.....                                                                                                                            | 44        |
| 2.2.4 Tipagem.....                                                                                                                                         | 45        |
| <b>2.3 Discussão.....</b>                                                                                                                                  | <b>47</b> |
| <b>2.4 Conclusão.....</b>                                                                                                                                  | <b>51</b> |
| <b>2.5 Materiais e Métodos .....</b>                                                                                                                       | <b>51</b> |
| 2.5.1 Origem das amostras.....                                                                                                                             | 51        |
| 2.5.2 Isolamento e Identificação de <i>S. aureus</i> .....                                                                                                 | 52        |
| 2.5.3 Teste de sensibilidade antimicrobiana.....                                                                                                           | 52        |
| 2.5.4 Detecção dos genes <i>mecA</i> , <i>icaADBC</i> , <i>bap</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>tst</i> e <i>luk-pvl</i> ...53 |           |
| 2.5.4.1 Extração do DNA.....                                                                                                                               | 53        |
| 2.5.4.2 Amplificação do DNA (PCR) para detecção dos genes <i>mecA</i> , biofilme e exotoxinas.....                                                         | 53        |
| 2.5.4.3 Eletroforese em gel de agarose.....                                                                                                                | 55        |
| 2.5.5 Confirmação da expressão dos fatores de virulência.....                                                                                              | 55        |
| 2.5.5.1 Extração de RNA.....                                                                                                                               | 55        |
| 2.5.5.2 Obtenção de cDNA.....                                                                                                                              | 56        |

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.5.3 PCR do cDNA.....                                                                                                                                                             | 57 |
| 2.5.6 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....                                                                                                                               | 57 |
| 2.6 Autores.....                                                                                                                                                                     | 58 |
| 2.7 Contribuição dos autores.....                                                                                                                                                    | 58 |
| 2.8 Informações dos autores.....                                                                                                                                                     | 59 |
| 2.9 Agradecimentos.....                                                                                                                                                              | 59 |
| 2.10 Referências.....                                                                                                                                                                | 60 |
| 3 ARTIGO II.....                                                                                                                                                                     | 64 |
| Resumo                                                                                                                                                                               |    |
| 3.1 Introdução.....                                                                                                                                                                  | 66 |
| 3.2 Materiais e Métodos.....                                                                                                                                                         | 67 |
| 3.2.1 Origem das amostras.....                                                                                                                                                       | 67 |
| 3.2.2 Isolamento e identificação dos ECN.....                                                                                                                                        | 68 |
| 3.2.3 Identificação das espécies de ECN por sequenciamento.....                                                                                                                      | 69 |
| 3.2.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....                                                                                                                                  | 69 |
| 3.2.5 Detecção dos genes <i>mecA</i> , <i>icaADBC</i> , <i>bap</i> , <i>bhp</i> , <i>aap</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>tst</i> e <i>luk-pvl</i> ..... | 70 |
| 3.2.5.1 Extração do DNA.....                                                                                                                                                         | 70 |
| 3.2.5.2 Amplificação do DNA (PCR) para detecção do gene <i>mecA</i> , biofilme e exotoxinas.....                                                                                     | 70 |
| 3.2.5.3 Eletroforese em gel de agarose.....                                                                                                                                          | 72 |
| 3.2.6 Expressão dos fatores de virulência pela técnica de RT-PCR.....                                                                                                                | 72 |
| 3.2.6.1 Extração de RNA.....                                                                                                                                                         | 72 |
| 3.2.6.2 Obtenção do cDNA.....                                                                                                                                                        | 73 |
| 3.2.6.3 PCR do cDNA.....                                                                                                                                                             | 74 |
| 3.3 Resultados.....                                                                                                                                                                  | 74 |
| 3.3.1 Identificação.....                                                                                                                                                             | 74 |
| 3.3.2 Resistência antimicrobiana.....                                                                                                                                                | 75 |
| 3.3.3 Pesquisa dos genes codificadores de toxina por PCR e expressão por RT-PCR.....                                                                                                 | 79 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.4 Pesquisa dos genes de biofilme por PCR e expressão por RT-PCR..... | 80 |
| 3.4 Discussão.....                                                       | 86 |
| 3.5 Conclusão.....                                                       | 91 |
| 3.6 Referências.....                                                     | 92 |

## Resumo

A mastite é uma enfermidade que causa inflamação na glândula mamária e geralmente tem origem infecciosa. É uma das principais doenças que acomete os rebanhos de ovinos causando prejuízos econômicos aos produtores. Na mastite infecciosa, as bactérias do gênero *Staphylococcus* são os principais causadores de mastite em rebanhos de ovinos. Esses micro-organismos se caracterizam pela capacidade de produzir uma ampla variedade de toxinas extracelulares e outros fatores de virulência como a formação de biofilme, além de apresentarem resistência aos agentes antimicrobianos empregados no tratamento dos animais. Esse estudo teve como objetivos caracterizar o perfil clonal e os fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados do leite de ovinos de três rebanhos. Após a realização do *California Mastitis Test* (CMT) as amostras de leite foram colhidas para contagem de Células Somáticas (CCS) e identificação das espécies de estafilococos isoladas, detecção de genes codificadores de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*), da toxina TSST-1, da leucocidina PVL e de biofilme (*icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *aap* e *bhp*), além da determinação da resistência a oxacilina pela pesquisa do gene *mecA* e perfil de sensibilidade a doze antimicrobianos. Os isolados com a presença de genes para toxinas e biofilme foram testados para detecção do RNA mensageiro para avaliação da capacidade de expressão dos fatores de virulência. Foram coletadas 473 amostras de leite de 242 animais, sendo encontrados micro-organismos em 169 (35,7%) amostras. Das 169 amostras em que foram isolados micro-organismos, 132 (78,1%) foram identificados como pertencendo ao gênero *Staphylococcus*, sendo 20 (15,1%) amostras identificadas como *Staphylococcus aureus* e as demais 112 (84,9%) como estafilococos coagulase-negativa (ECN). Das 20 amostras de *S. aureus* isoladas, nenhuma apresentou o gene *mecA* e a maioria foi sensível a todas as drogas testadas, exceto uma amostra que foi resistente a tetraciclina. Sete amostras apresentaram algum

gene de toxina, sendo o gene *seb* o mais encontrado, estando presente em cinco amostras, seguido por *sea* em três, *sec* em dois, *tst* e *luk-PV* em uma amostra. As duas amostras positivas para o gene *sec* também foram positivas na técnica de RT-PCR, bem como as amostras com o gene *tst* e *luk-PV*. Em nenhuma das amostras foi encontrado o operon *ica* completo e nem a expressão por RT-PCR dos genes *ica* detectados (*icaC*, *icaD* e *icaB*). O gene *bap* foi encontrado em quatro amostras, entretanto nenhuma foi positiva na técnica de RT-PCR. O PFGE foi realizado em 17 amostras de *S. aureus*, e um clone constituído por 10 amostras foi encontrado nos três rebanhos estudados. Das 112 amostras de ECN isoladas, quatro (3,6%) apresentaram o gene *mecA*. Os maiores percentuais de resistência detectados pelo método de disco difusão foram frente à oxacilina, penicilina e tetraciclina. Dessas, 70 (62,5%) apresentaram algum gene de toxina, e 71 (63,4%) apresentaram algum gene de biofilme. Nenhuma das amostras expressou genes de toxinas, enquanto que 13 amostras foram positivas para expressão de genes da formação de biofilme na técnica de RT-PCR. Os resultados mostraram a importância da identificação de espécies de ECN, já que cada espécie pode apresentar características de virulência e resistência diferentes, e dessa forma, a identificação pode orientar quanto à etiologia mais frequente e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cada espécie, possibilitando o tratamento adequado da mastite.

**Palavras chave:** Mastite, ovinos, *Staphylococcus*, fatores de virulência, resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

Mastitis is a disease that causes inflammation in the mammary gland and is usually infectious. It is a major disease that affects sheep herds causing economic losses for producers. In infectious mastitis, *Staphylococcus* bacteria are the major cause of mastitis in sheep flocks. These micro-organisms are characterized by the ability to produce a wide variety of extracellular toxins and other virulence factors such as biofilm formation, besides presenting resistance to antimicrobial agents used in the treatment of animals. This study aimed to characterize the profile and clonal virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from milk of sheep from three flocks. After the completion of the California Mastitis Test (CMT) milk samples were collected for Somatic Cell Count (SCC) and species identification of staphylococci isolated detection of genes encoding enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec* and *sed*), the toxin TSST-1, PVL and Leucocidin of biofilm (*icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *aap* and *bhp*), besides the determination of resistance to oxacillin by research *mecA* and sensitivity profile to twelve antimicrobials. Isolates with the presence of toxin genes and biofilm were tested for the detection of messenger RNA for assessing the ability of expression of virulence factors. We collected 473 milk samples from 242 animals, micro-organisms found in 169 (35.7%) samples. Of the 169 samples that were isolated micro-organisms, 132 (78.1%) were identified as belonging to the genus *Staphylococcus*, 20 (15.1%) samples identified as *Staphylococcus aureus* and the remaining 112 (84.9%) as coagulase-negative staphylococci (CNS). Of the 20 samples of *S. aureus* isolates, none had the *mecA* and most were sensitive to all drugs tested except one sample that was resistant to tetracycline. Seven samples showed a toxin gene, the gene being the most *seb* found, present in five samples, followed by *sea* on three, two *sec*, *tst* and *luk-PV* in a sample. The two positive samples were also positive *sec* gene in RT-PCR, and

samples with the *tst* gene and *luk-PV*. None of the samples was found *ica* operon completed nor the expression by RT-PCR detected the *ica* genes (*icaC*, *icaD* and *icaB*). The *bap* gene was found in four samples, however none were positive in RT-PCR. The PFGE was performed on 17 samples of *S. aureus*, and a clone consisting of 10 samples found in the three herds. Of the 112 samples of CNS isolated, four (3.6%) had the *mecA* gene. The highest percentages of resistance detected by the disk diffusion method were ahead oxacillin, penicillin and tetracycline. Of these, 70 (62.5%) had some toxin gene, and 71 (63.4%) showed some gene biofilm. None of the samples expressed toxin genes, while 13 samples were positive for gene expression of biofilm formation in RT-PCR. The results showed the importance of the identification of CNS species, since each species has shown characteristics of different virulence and resistance, and thus the identification can advise on the most common etiology and antimicrobial susceptibility profile of each species, allowing appropriate treatment of mastitis.

**Key words:** mastitis, sheep, *Staphylococcus*, virulence factors, antimicrobial resistance.

## **1 INTRODUÇÃO GERAL**

Dentre as doenças que acometem os rebanhos leiteiros comprometendo a qualidade do leite, a mastite se destaca como uma das mais importantes em termos econômicos e de saúde pública (Pyorala, 2002).

A mastite é a inflamação da glândula mamária responsável por alterações físico-químicas e microbiológicas no leite, além de alterações no tecido glandular, ocasionando o comprometimento da produção de leite do animal (Domingues et al., 2006). A enfermidade pode ser causada por vários fatores, como infecções, traumas e irritações, na maioria das vezes provocada por bactérias de diferentes espécies que conseguem penetrar no canal do teto (Domingues e Langoni, 2001; Prestes et al., 2003; Freitas et al., 2005.).

A mastite é a principal enfermidade que afeta os rebanhos, atribuindo-se à doença perdas na produção e conseqüentes prejuízos econômicos ao produtor e à indústria pela redução na produção e da qualidade do leite, os custos com tratamento, produção de derivados com baixa qualidade (Sordillo, 2011) e até mesmo a perda total da capacidade secretora da glândula mamária doente (Ribeiro et al., 2003) que muitas vezes resulta no descarte dos animais (Silva et al., 2004).

Em ovinos, a mastite ainda é responsável pela redução do desenvolvimento dos borregos. A forma subclínica ou inaparente da enfermidade pode acarretar menor taxa de crescimento e maior mortalidade dos borregos (Christley et al., 2003), como pôde ser observado por Fthenakis e Jones (1990) que para verificarem os efeitos da mastite no crescimento de cordeiros introduziram cepas de estafilococos coagulase-negativa nas glândulas mamárias de ovelhas para que os animais desenvolvessem o quadro de mastite subclínica. A mastite causou redução na quantidade de leite produzido e

aumento na quantidade de células somáticas. Os cordeiros das ovelhas com mastite subclínica tiveram um crescimento inferior quando comparados com os cordeiros das ovelhas saudáveis que foram usadas como controle.

A mastite causa alterações na composição do leite, como o aumento na contagem de células somáticas (CCS) devido à migração de leucócitos, principalmente neutrófilos polimorfonucleares, ao local da inflamação em decorrência da resposta do organismo ao processo infeccioso, além do aumento nos teores de sódio, cloro e proteínas séricas e diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura do leite (Fonseca e Santos, 2000). O leite obtido de animais sadios contém cerca de 50 a 200.000 células/mL, enquanto em animais com mastite, a contagem pode variar de 200.000 a 500.000 células/mL dependendo da gravidade e do tipo de micro-organismo envolvido na infecção (Kitchen, 1981).

A doença é classificada de acordo com sua forma de manifestação em mastite clínica e mastite subclínica (Ribeiro et al., 2003). Na mastite clínica, os sinais da doença são evidentes, ocorrem desde pequenas anomalias no leite, tais como grumos amarelados ou esbranquiçados, até modificação total da secreção, e redução ou cessação da produção de leite. Nos casos mais graves, há alterações inflamatórias do úbere, com dor, mama avermelhada e aumento da temperatura local (Charles e Furlong, 1992).

As conseqüências da mastite clínica foram avaliadas por Santos et al. (2007) quando estudaram os aspectos clínicos e as características do leite de dez ovelhas da raça Santa Inês com mastite clínica causada por *Staphylococcus aureus*, cujas cepas foram introduzidas nas glândulas mamárias dos animais. Os resultados obtidos por meio das análises da secreção mamária foram a diminuição na quantidade de leite produzida, além de alterações nas propriedades físico-químicas do leite. Depois de submetidas ao

tratamento, um animal morreu devido ao agravamento da doença e os demais, apesar de terem se recuperado da enfermidade, a função de suas glândulas mamárias foi completamente perdida.

Já a mastite subclínica se caracteriza pela ausência de sintomas visíveis do processo inflamatório, não sendo observadas alterações visíveis no leite ou na glândula mamária (Costa, 2002; Batavine, 2003). Para o diagnóstico da mastite subclínica é necessária a utilização de testes auxiliares que são baseados na CCS (Schukken et al., 2003). Um dos métodos de detecção prévia da mastite subclínica e amplamente utilizado a campo é o “California Mastitis Test” (CMT), teste de fácil interpretação que indica indiretamente a quantidade de células somáticas presentes no leite e a resposta inflamatória da glândula mamária à infecção. Outra maneira de indicar a resposta da glândula à infecção é a contagem eletrônica das células, por meio de equipamentos de citometria de fluxo (Fonseca e Santos 2000, Silveira, et al., 2005).

A mastite subclínica é a principal causa de perda econômica na produção leiteira e por isso tem grande impacto na produtividade dos rebanhos por ser a forma de manifestação da doença mais prevalente que a mastite clínica (Fonseca e Santos, 2000).

No caso da mastite infecciosa, esta pode ser causada por uma grande diversidade de micro-organismos que incluem bactérias gram-positivas, gram-negativas, micoplasmas e algas (Sordillo, 2011) que são agrupados em dois grupos de acordo com a forma de transmissão: contagiosos e ambientais. A mastite é contagiosa quando os agentes causadores provêm do próprio animal (Fonseca e Santos, 2000) já que o habitat do micro-organismo é o interior da glândula mamária e a superfície dos tetos dos animais (Langoni, 2000) e são transmitidos de uma mama com mastite para uma saudável, principalmente através da ordenha. Os micro-organismos causadores da mastite

contagiosa são bem adaptados para sobreviverem no úbere dos animais, e dentre eles se destacam *S. aureus*, estafilococos coagulase-negativa (ECN), *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium* spp. (Bueno et al., 2003; Ribeiro, 2008).

A mastite é classificada como ambiental quando os micro-organismos causadores são oriundos do ambiente onde os animais são mantidos (Fonseca e Santos, 2000). Os agentes etiológicos classificados como ambientais são descritos como micro-organismos oportunistas, não estão adaptados a sobrevivência no interior do hospedeiro e são encontrados no ar, no habitat dos animais e esterco (Fonseca e Santos, 2000; Bradley, 2002). São agentes causadores da mastite ambiental *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Streptococcus uberis*, fungos e algas como a *Prototheca* spp. (Bueno et al., 2003; Freitas et al., 2005).

Embora uma grande variedade de micro-organismos possa causar a mastite, contagiosa ou ambiental, os *Staphylococcus* spp. são os mais freqüentemente isolados de amostras de leite de ovinos, caprinos e vacas com mastite (Bergonier e Berthelot, 2003; Contreras et al., 2003; Pinheiro de Sá et al., 2004; Brito et al., 2002; Santos et al., 2003). Dentre os estafilococos coagulase-positiva, *S. aureus* é o principal patógeno nos rebanhos leiteiros (Sordillo 2005; Bonnefont et al., 2011), e dentre os ECN varias espécies são encontradas com destaque para *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. caseolyticus*; *S. caprae* e *S. xylosus* (Chu et al., 2012). Recentemente, Taponen et al. (2012) encontraram uma nova espécie de estafilococos, chamado de *Staphylococcus agnetis*, que apresenta coagulase variável e foi isolado de casos de mastite clínica e subclínica em bovinos.

Grande parte dos fatores de virulência produzidos pelos estafilococos não são fundamentais para o crescimento e multiplicação dos microrganismos (Kuroda et al., 2001). Na mastite, os fatores de virulência contribuem para a prevalência da doença causada por *Staphylococcus*, pois permitem ao microrganismo se instalar no parênquima mamário, formar microabscessos, resistir à fagocitose e sobreviver no interior dos fagócitos, além de dificultar a ação dos agentes antimicrobianos mesmo quando administrados nas concentrações adequadas (Araújo e Andrioli, 1996).

A produção de biofilme é considerada um importante fator de virulência na patogênese da mastite estafilocócica, porque ele ajuda os estafilococos na adesão e colonização no epitélio da glândula mamária, além de proteger as células bacterianas da fagocitose e das altas concentrações de antibióticos, dificultando a eliminação do patógeno resultando em uma infecção persistente (Otto, 2008, Arciola et al. 2001, Brouillette et al., 2005; Melchior et al., 2006).

O biofilme é constituído por um agregado de micro-organismos envolvidos por uma matriz extracelular de origem polissacarídica ou protéica produzida pelas próprias bactérias, que permanecem aderidas em superfícies abióticas ou bióticas (Gotz, 2002; O'Neil et al, 2007).

A formação de biofilme ocorre em três etapas: (1) uma adesão inicial da bactéria em uma superfície; (2) adesão intercelular com a proliferação e acumulação de células em multicamadas, sendo esta adesão promovida por uma matriz polimérica de origem polissacarídica ou protéica (Cucarella et al., 2001; Arrizubieta, et al 2004; Lasa e Penadés, 2006) e (3) desprendimento do biofilme (Otto 2008).

As adesinas, um grupo de proteínas chamadas MSCRAMM (Componentes da superfície Microbiana que reconhecem as Moléculas Adesivas da Matriz) estão

envolvidas com a adesão primária dos estafilococos as superfícies (Simojoki et al., 2012). Dentre as adesinas podemos citar as proteínas de ligação a fibronectina (*fnb*), proteína de ligação ao colágeno (*cna*) (Vancraeynest et al., 2004) e autolisina (*atlE*) (Vandecasteele et al 2003).

Em *Staphylococcus*, o componente mais importante na adesão entre as células bacterianas é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), um homopolímero linear de até 130 resíduos de beta N-acetilglicosamina (Vuong e Otto, 2002) que é codificado pelo *lôcus ica* do *operon icaADBC* e sua expressão é regulada por *icaR* (O' Toole et al., 2000; Cucarella et al., 2001; Conlon et al., 2002) que, junto com outros polímeros como ácidos teicóicos e proteínas, formam a matriz extracelular também chamada de “slime” (Otto 2008).

Na biossíntese do PIA, que é realizada pelos produtos dos genes do *lôcus ica*, *icaA* apresenta atividade catalítica N-acetilglicosaminatranferase, sendo capaz de transferir os resíduos N-acetilglicosamina a partir de udp-N-acetilglicosamina para a cadeia de PIA em formação. O gene *icaA* sozinho tem baixa atividade catalítica, necessitando assim da expressão concomitante de *icaA* e *icaD* para apresentar plena atividade (Gerke, et al., 1998; Gotz, 2002;), sintetizando assim oligômeros com 10 a 20 resíduos aproximadamente de beta 1,6-N-acetilglicosamina (Gotz, 2002; Dobinsk et al., 2002). A função do *icaC* ainda não é muito bem descrita, entretanto, presume-se que *icaC* esteja envolvido na exportação da cadeia de PIA em crescimento para fora da célula. Além disso, *icaC* quando expresso simultaneamente com *icaA* e *icaD*, é capaz de produzir oligômeros ainda mais longos com 130 resíduos (Gerke, et al., 1998; Von Eiff et al., 2002). O gene *icaB* tem atividade de diacetilação durante a síntese do PIA (Vuong et al., 2004).

Em estafilococos isolados de animais, um novo gene envolvido na formação de biofilme, *bap* (Proteína associada à biofilme), foi encontrado apenas em algumas amostras de *S. aureus* isoladas dos casos de mastite bovina (Cucarella, et al., 2001). O gene *bap*, que codifica uma proteína grande de 2276 aminoácidos (aa), promove a adesão em uma superfície e adesão intercelular (acúmulo) (Cucarella et al., 2001; 2004).

O gene *bap* está localizado em uma ilha de patogenicidade móvel (Ubeda, et al., 2003). Em *S. aureus*, *bap* está inserido na ilha de patogenicidade móvel estafilocócica *SaPIbov2*. Genes ortólogos de *bap* têm sido encontrados em outras espécies de estafilococos, entretanto, os genes ortólogos de *bap* nessas espécies de estafilococos não estão localizados na ilha de patogenicidade *SaPIbov2* (Tormo et al., 2005).

Um gene homólogo ao *bap*, o *bhp* é encontrado em amostras humanas de *S. epidermidis*. A similaridade de sua sequência sugere que *bhp* está envolvido na formação de biofilme de maneira parecida ao *bap* de amostras animais (Cucarella et al., 2001; Tormo et al., 2005).

Os estafilococos produzem diversas toxinas extracelulares como as enterotoxinas (EE), a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), as toxinas esfoliatinas A e B, hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\delta$  e leucocidinas (Mehrotra et al., 2000; Balaban e Rasooly, 2000; Dinges et al., 2000).

As enterotoxinas, assim como TSST-1 são conhecidas por superantígenos (Mehrotra et al., 2000). Esses superantígenos interagem com as células T receptoras de antígenos (TCR) e com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II presentes nas células apresentadoras de antígeno. Essa interação resulta na ativação e proliferação de células T inespecíficas (Le Loir et al., 2003) ocorrendo assim a produção de citocinas pró inflamatórias provenientes das células T como interleucina

(IL-1,IL-2), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) . A produção de grande quantidade de citocinas causa uma reação inflamatória intensa danificando os tecidos dos hospedeiros (Shultz e Raij, 1992; McCormick et al., 2003; Huang et al., 2007).

Embora as enterotoxinas sejam similares em sua composição e atividade biológica, são identificadas separadamente em função de suas diferenças antigênicas. Atualmente, são conhecidas 22 enterotoxinas sorologicamente distintas: SEA, SEB, SEC (SEC1, SEC2 e SEC3), SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET (Argudín et al., 2010) são enterotoxinas que apresentam atividade emética (Le Loir et al., 2003; Vasconcelos e Cunha, 2010). Algumas enterotoxinas apresentam baixa atividade emética enquanto outras ainda precisam ser testadas, e por esse motivo, essas enterotoxinas são denominadas enterotoxinas-like (SEl) (Lina et al., 2004). São elas: SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIU2, e SEIV (Argudín et al., 2010). A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) foi inicialmente denominada SEF, entretanto, por não apresentar, *in vivo*, atividade biológica característica de uma enterotoxina, foi então denominada de TSST-1 (Fueyo et al., 2005).

Os genes codificadores de enterotoxinas se localizam em diferentes partes do genoma bacteriano. Esses genes estão localizados em plasmídios, fagos, cromossomos ou ainda podem estar presentes em ilhas de patogenicidade (Jarraud, et al., 2001; Letertre, 2003; Bania et al., 2006; Gomez et al., 2007).

As enterotoxinas produzidas por estafilococos são solúveis em água, com peso molecular entre 26.000 a 29.000 daltons (Bergdoll et al., 1981) e são produzidas principalmente durante a metade e o fim da fase exponencial do crescimento bacteriano. São resistentes à hidrólise pelas enzimas gastrointestinais permanecendo ativas no trato

digestivo após a ingestão (Balaban e Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003; Adwan et al., 2005; Pelisser et al., 2009). Além disso, as enterotoxinas são termoestáveis não sendo inativadas pelo processo de pasteurização ou por outros tratamentos térmicos, o que significa que a atividade biológica das enterotoxinas permanece sem alterações mesmo após o tratamento térmico do alimento (Evenson et al., 1988; Asao et al., 2003). Algumas dessas enterotoxinas podem contribuir para a persistência do micro-organismo em casos de mastite subclínica (Boynucara, et al., 2008).

A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre após a ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas pré-formadas produzidas por bactérias do gênero *Staphylococcus* (Adesyn et al., 1984), sendo as enterotoxinas estafilocócicas A (SEA) e SED as mais encontradas em alimentos (Hwang et al., 2007; Pelisser et al., 2009). Dos sintomas desencadeados pela intoxicação alimentar, além de vômito, observa-se também diarreia, náuseas e dores abdominais. Esses sintomas geralmente surgem após quatro horas da ingestão do alimento contaminado permanecendo por até quarenta e oito horas. Esse tipo de intoxicação geralmente não é letal, sendo que os casos mais graves, com relato de mortalidade por intoxicação alimentar estafilocócica, ocorrem entre idosos, crianças e imunossuprimidos (Balaban e Rasooly, 2000; Do Carmo et al., 2004; Stiles e Krakauer, 2005).

Em diversos estudos já foi relatado à presença de genes de enterotoxinas ou a produção de SEs por *S. aureus* isolados de leite e derivados associados a animais com mastite (Ercoline et al., 2004; Loncarevic et al., 2005; Normanno et al., 2005).

Dentre as espécies de estafilococos, *S. aureus* é a espécie mais comumente envolvida nos surtos de intoxicação alimentar (Blaiotta et al., 2004; Loncarevic et al., 2005; Pelisser et al., 2009), entretanto, alguns estudos mencionam outras espécies de

estafilococos coagulase positiva (*S. intermedius* e *S. hyicus*) enterotoxigênicos (Adesyn et al., 1984; Vernozy-Rozand et al., 1996).

Os ECN foram durante muito tempo considerado micro-organismos saprófitas ou raramente patogênicos (Kloos e Bannerman, 1994), entretanto, existem estudos do perfil toxigênico de ECN que evidenciam a produção de enterotoxinas nestes micro-organismos, incluindo *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, e *S. xylosus* (Breckinridge e Bergdoll, 1971; Hoover et al., 1983; Balaban e Rasooly, 2000), sugerindo que mais atenção deveria ser dada a este grupo de micro-organismos (Zell, et al., 2008).

A capacidade dos estafilococos, principalmente *S. aureus* de crescer e produzir enterotoxinas em diversas condições é evidente pela variedade de alimentos relacionados com surtos de intoxicação alimentar (Le Loir et al., 2003), com destaque para o leite que é um excelente meio de cultura para o crescimento de *Staphylococcus* (De Buyser et al., 2001). Assim, o leite mastítico e seus derivados podem se tornar responsáveis por surtos de intoxicação alimentares, o que é um problema de saúde pública (Costa et al., 2000; Fagundes e Oliveira 2004), apesar que nem todos os estafilococos produzem enterotoxinas ou a quantidade produzida pode ser insuficiente para causar intoxicação alimentar (Morandi et al., 2007).

A TSST-1 é uma proteína com massa molar de 22.000 a 30.000 daltons codificada pelo gene *tst* (Dinges et al., 2000; Stiles et al., 2005; Hale et al., 2006) localizado no cromossomo bacteriano em um elemento genético móvel (Novick, 2003).

A toxina é responsável pela Síndrome do choque Tóxico (TSS) e por ser um superantígeno que, quando presente na corrente sanguínea, desencadeia sintomas como febre, hipotensão e descamação da pele (Stiles 2005; Hale et al., 2006). Se o paciente

não for tratado imediatamente, pode levar a um choque letal (Dinges et al., 2000). Inicialmente a doença foi observada com mais frequência em mulheres durante o período menstrual, sendo associado ao uso de tampões absorventes. Mais tarde foi observada em mulheres e homens como consequência de abscessos estafilocócicos, infecções, feridas cirúrgicas, osteomielite (Konemman et al., 2001).

*Staphylococcus aureus* é a principal espécie produtora de TSST-1, mas alguns estudos relatam a produção da toxina por ECN (Crass, Bergdoll, 1986; Udo, 1999; Cunha et al 2006). A presença do gene *tst* tem sido investigada em amostras de origem animal, principalmente em *S. aureus* isolados de amostras de leite cru e amostras de leite coletadas de animais com mastite. A TSST-1 é uma toxina de grande importância por provocar o choque tóxico em humanos, mas em animais mais estudos são necessários para determinar o seu papel em *S. aureus* isolados de rebanhos leiteiros (Karahana et al., 2009).

A PVL é uma exotoxina codificada pelos genes *Luk-F* e *Luk-S* e sua presença em isolados de *S. aureus* está associada a necrose tecidual (Dufour et al., 2002), sendo as consequências clínicas das infecções causadas por *S. aureus* portadores do gene *luk-PV* tendem a ser mais graves do que quando causada por *S. aureus* não portadores do gene (Gillet et al., 2002).

Os dois componentes da PVL, LukS-PV e LukF-PV são secretados por *S. aureus* antes de montar um heptâmero na membrana do leucócito polimorfonuclear. LukS-PV se liga a um receptor de membrana do leucócito polimorfonuclear onde posteriormente se dimeriza com LukF-PV seguido de ligação alternada de LukS-PV e LukF-PV até a formação do heptâmero. Dependendo da concentração de PVL pode ocorrer a lise ou apoptose do leucócito. Baixas concentrações de PVL induzem a apoptose por uma via

na qual a PVL induz a formação de poros na membrana mitocondrial que causa a liberação do citocromo c e indução das caspases 9 e 3 (Genestier et al., 2005).

A lise ou apoptose do leucócito causado pela PVL conduz a evasão da primeira linha de defesa do hospedeiro, entretanto o caminho que conduz a necrose tecidual e sepse grave ainda não está muito bem esclarecido. A observação de que as células epiteliais não são afetadas por PVL purificada, sugere que a PVL não causa diretamente a necrose tecidual. Dessa forma, possivelmente a PVL induz a necrose tecidual e sepse de maneira indireta, podendo ocorrer tanto pela liberação de citocinas presentes nos grânulos dos lisossomos dos neutrófilos lisados ou pelo desencadeamento de uma cascata inflamatória pela lise ou apoptose dos leucócitos. A lise celular induz a liberação de espécies reativas do oxigênio e de vários mediadores inflamatórios por meio dos granulócitos (Kaneko et al., 2004; Boyle-Vrava e Daum, 2007).

A produção da exotoxina PVL por *S. aureus* é um importante fator de virulência nos casos de doenças necrotizantes em humanos (Lina et al., 1999), e a ocorrência de *S. aureus* positivos para o gene da PVL em amostras de *S. aureus* isoladas em animais com mastite também é realizada, com destaque para o trabalho realizado por Zecconi et al. (2006) que, ao avaliarem a presença do gene luk-PV em cinquenta *S. aureus* isolados de vacas com mastite, encontraram o gene em mais de 50,0% das amostras .

Um dos fatores preocupantes no controle das mastites é a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos. As razões que levam à utilização de agentes antimicrobianos são o controle e o tratamento dos animais com mastite. Contudo, muitas vezes os antibióticos são utilizados de maneira incorreta, contribuindo para o aumento do número de cepas resistentes às drogas utilizadas, dificultando o tratamento da infecção (Contreras et al., 1995; Zanette et al., 2010; Haran, et al., 2012 ).

Amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite apresentam característica de resistência a vários antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento dos animais doentes (Freitas et al., 2005). A pressão seletiva provocada pelo uso dos antimicrobianos foi responsável pelo surgimento, nas últimas décadas, de amostras de *S. aureus* multirresistentes, o que torna *S. aureus* o micro-organismo mais difícil de ser combatido (Fagundes e Oliveira, 2004).

Os agentes antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento das infecções do úbere. Entre as drogas aprovadas para o uso no tratamento da mastite destacam-se os beta-lactâmicos tais como penicilinas e cefalosporinas (Piorala e Tapone, 2009).

Micro-organismos que exibem resistência aos beta-lactâmicos e classificados como *S. aureus* meticilina (oxacilina) - resistentes (“MRSA”) são muitas vezes resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, macrolídeos, estreptomicinas, dentre outras drogas (Wang et al. 2008; Kumar et al., 2010).

Em *S. aureus*, o gene *mecA* codifica a proteína de 78 kDa, a proteína ligadora de penicilina modificada (PBP) 2a ou (PBP2’), responsável pela resistência à meticilina e todos os outros antibióticos beta-lactâmicos (Ruud et al., 2008).

A parede celular é alvo da ação de muitos antibióticos como os beta-lactâmicos que agem bloqueando a biossíntese do peptidoglicano (McCallum et al., 2010). O peptidoglicano, principal componente da parede celular de estafilococos, é formado pelo dissacarídeo beta-1-4-N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico que se dispõe alternadamente sendo que no ácido N-acetilmurâmico encontram-se os peptídeos L-alanina, D-Glutamina, L-lisina e D-alanina por onde ocorre a ligação cruzada com um grupamento de pentaglicina (Giesbrecht et al., 1998). O processo de ligação cruzada é catalisado por enzimas transpeptidases, as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) (Höltje, 2001).

Em *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), os antibióticos beta-lactâmicos se ligam às PBPs presentes na parede celular da bactéria resultando na interrupção da síntese do peptideoglicano, o que culminará na morte da bactéria. Já em *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), PBP2a está presente, impedindo os antibióticos beta-lactâmicos de se ligar, assim, a síntese de peptideoglicano não é interrompida, resultando no crescimento de MRSA (Berger-Bachi e Rohrer, 2002).

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel chamado de cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*) (Ito et al., 2003). Esse cassete possui dois componentes genéticos em sua estrutura. O primeiro é o complexo *mec*, composto pela IS431, o gene *mecA* e seus reguladores: um operon com um repressor (*mecI*) e um transdutor de sinal (*mecR1*). O segundo é o complexo *ccr*, com três genes *ccr* distintos classificados como: *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, responsáveis pela transposição do SCC*mec* (Ito et al 2003; IWG-SCC 2009).

Além dos genes de resistência carregados por SCC*mec*, *S. aureus* pode apresentar também genes de resistência antimicrobiana em outros locais do genoma e também em plasmídios (Lindsay e Holden, 2006).

A presença de MRSA em amostras isoladas de animais tem se destacado também em decorrência da crescente preocupação de que infecções humanas possam ser causadas por MRSA proveniente de alimentos contaminados e produtos de origem animal, incluindo o leite (Lee, 2003).

ECN são micro-organismos importantes na medicina humana por estar envolvido em infecções nosocomiais e também para a medicina veterinária por ser comumente isolados dos casos de mastite (Von Eiff et al., 2002). O aumento do número de casos de infecções por ECN e sua freqüente resistência à meticilina tem dificultado o controle da doença por este agente (Palazzo e Darini, 2006). É importante ressaltar também a

importância dos ECN resistentes à meticilina para o surgimento de MRSA pela transmissão do gene *mecA* para *S. aureus* sensível à meticilina (Yasuda et al., 2000; Hanssen e Sollid, 2006).

Estudos epidemiológicos de *Staphylococcus* spp. em rebanhos de ovinos são escassos na literatura, principalmente em rebanhos nacionais. Dessa forma, a pesquisa do perfil clonal das espécies de estafilococos encontradas no leite ovino poderá contribuir para compreensão do padrão de cepas presentes em diferentes rebanhos, possibilitando medidas de prevenção e controle da disseminação de clones de estafilococos patogênicos e multiresistentes

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral:**

- Caracterizar o perfil clonal e os fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de leite de ovinos.

### **1.1.2 Objetivos específicos:**

- Identificar as espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de ovinos com mastite subclínica e no leite de portadores assintomáticos;
- Detectar a presença dos genes das enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*), toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) e da leucocidina Panton-Valentine (*luk-PV*) nas amostras isoladas;

- Detectar a presença dos genes *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *bhp* e *aap* envolvidos na formação de biofilme.
- Investigar a expressão dos genes de toxinas e biofilme pelas amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas.
- Determinar os perfis de sensibilidade das amostras de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos mais utilizados em medicina veterinária;
- Detectar a presença do gene *mecA* nas amostras isoladas;
- Tipagem molecular por PFGE para determinação do perfil clonal dos isolados de *Staphylococcus* spp..

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Adesyn AA, Tatini SR, Hoover DG. Production of enterotoxin by *Staphylococcus hyicus*. *Vet Microbiol* 1994; 9:487-95, 1994.

Adwan G, Abu-Shanab, B, Adwan K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the north of Palestine. *Turk. J. Biol* 2005; 29:229-32.

Arciola CR, Baldassari L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strain from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:2151-56.

Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. 2010; 2:1751-1773.

Araújo MLC, Andrioli JL. *Staphylococcus aureus* resistance patterns to antimicrobials and penicillinase among strains isolated from apparently healthy lactating cows. *Braz J Microbiol* 1996; 1:60-3.

Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect*. 2003; 130:33-40.

Arrizubieta MJ, Toledo-Arana A, Amorena B, Penadés JR, Lasa I. Calcium inhibits Bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2004; 186:7490-8.

Balada, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. Internacional. *Int J Food Microbiol.* 2000; 61:1-10.

Bania J, Dabrowska A, Bystron J, Korzekwa K, Chrzanowska J, Molenda J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. enterotoxins. Internacional. *Int J Food Microbiol.* 2006; 108:36-41.

Batavani RA, Mortaz E, Falahian K, Dawoodi MA. Study on frequency, etiology and some enzymatic actives of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. *Small Ruminant Res.* 2003; 50:45-50.

Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet.* 1981;1:1017-21.

Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. *Arch. Microbiol.* 2002; 178:165–171, 2002.

Bergonier D, Berthelot X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest Prod Sci.* 2003; 79:1-16.

Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton–Valentine leukocidin. *Lab Invest.* 2007; 87:3-9.

Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 97:719–730.

Bonnefont CMD, Toufeer M, Caubet C, Foulon E, Tasca C, Aurel MR, et al. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics.* 2011; 12:1-16.

Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmz H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int J Food Microbio.* 2008; 125:209-211.

Bradley, A.J. Bovine mastitis: evolving disease. *Vet J.* 2002; 164:116-28.

Breckinridge JC, Bergdoll MS. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing *Staphylococcus*. *N Engl J Med.* 1971; 284:541-543.

Brito MAVP, Campos GMM, Brito JRF. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural.* 2002; 32:79-82.

Brouillette E, Hyodo M, Hayakawa Y, Karaolis DKR, Malouin F. 3',5-Cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in the mouse model of mastitis infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:3109-3113.

Bueno VFF, Nicolau ES, Mesquita AJ, Ribeiro AR, Silva JAB, Costa EO et al. Etiologia e suscetibilidade à antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga-SP-Brasil. *Rev. patol. trop.* 2003; 32:33-44.

Charles TP, Furlong J. Doenças dos bovinos de leite adultos. Coronel Pacheco-MG:EMBRAPA-CNPG, 1992.

Christley RM, Morgan KL, Parkin TD, French NP. Factors related to the risk of neonatal mortality, birth-weight and serum immunoglobulin concentration lambs in the UK. *Prev Vet Med.* 2003; 57:209-226.

Chu C, Yu C, Lee Y, Su Y. Genetically divergent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and sec-dependent mastitis of dairy goats in Taiwan. *BMC Vet Res.* 2012; 8.

Conlon KM, Humphreys H, O'Gara J.P. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 216:171-177.

Contreras A, Corrales JC, Sierra D, Marco J. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murcianos-Granadina goats. *Small Ruminant Res.* 1995; 17:71-78.

Contreras A, Luengo C, Sanchez A. Corrales, JC. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest Prod Sci.* 2003; 79:273-283.

Costa EO, Benites NR, Guerra JR, Melville PA. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J. Vet. Med. B.* 2000; 47:99-103.

Costa AJL, Kale PL. Medidas de frequência de doença. In: MEDRONHO, R.A. et al. *Epidemiologia*. 1.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. p.15-31.

Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol.* 1986; 23:43-5.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001; 183:2888-2896.

Cucarella C, Tormo MA, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, et al. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2004; 72:2177-2185.

Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Jr JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Braz J. Microbiol.* 2006; 37:70-74.

Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai, Jamklang M, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis.* 2002; 186:1344–1347.

De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food. Microbiol.* 2001; 67:1-17.

Dhanawade NR, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun.* 2010; 34:81-89.

Dobinsky S, Bartscht K, Mack D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid.* 2002; 47:10-17.

Do Carmo LS, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, De Souza JM, De Sena MJ et al. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog Dis.* 2004; 1:241-246.

Domingues, F.D.; Langoni, H. *Manejo sanitário animal: mastite bovina*. Rio de Janeiro: EPUB, 2001, p.171-182.

Domingues PF, Lucheis SB, Serrão LS, Fernandes S, Contente APA, Martins CV, et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. *Ars Veterinaria*, 2006; 22:146-152.

Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant infections in France: emergence of a single clone that produces Panton Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* 2002; 35:819-824.

Ercolini D, Blaiotta G, Fusco V, Coppola S. PCR-based detection of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 96:1090-1096.

Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 7:311-316.

Fagundes H, oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*. 2004; 34:1315-132.

Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. 1.ed. São Paulo: Lemos, 2000.

Fthenakis GC, Jones JE. The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. *Br. Vet. J.* 1990; 146: 43-49.

Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñoz J, Alvarez MA, Martín MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:1278-1284.

Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S et al. *Staphylococcus aureus* Pantón–Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest. J Clin Invest.* 2005; 115:3117-3127

Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *J Biol Chem.* 1998; 273:18586-18593.

Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Weckej. Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicillin. *Microbiol Mol Bio R.* 1998; 62:1371-1414.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón–Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 2002; 359:753-759.

Gómez C, Pinal L, Franco J, Carrillo JM, Ramírez J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A, B and C isolated from bovine mastitis in Mexico. *Vet. immunol. Immunopathol.* 2007; 117:249-253.

Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002; 43:1367-1378, 2002.

Hale ML, Swietnicki, W. Model Systems to study a superantigen-induced disease: Toxic shock syndrome. *Drug Discov Today: Diseases models.* 2006; 3:121-126.

Hanssen AM, Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 46:8–20.

Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB, Sreevatsan S. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50:688-695.

Höltje JV. The alternative to Penicillins. *Nat Med.* 2001; 7:1100-1101.

Hoover DG, Tatini, SR, Maltais JB. Characterization of staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 46:649–660.

Huang Y, Sui Y, Zhang X, Si S, Ge W, Hu P, Li X, Ma B. Response of T cells in vivo induced by repeated superantigen treatments at different time intervals. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2007; 39:467–474.

Ito T., Katayama Y., Asada K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C., Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45:1323-1336.

Ito T., Okuma K., Ma XX., Yuzawa H., Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.* 2003; 6:41-52.

International Working Group on the classification of Staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents chemother.* 2009. 4961-4967.

Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougé C, et al. egc, A highly prevalent operon of enterotoxins gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 2001; 166:669-677.

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.* 2004; 68:981-1003.

Karahan M.; Açık MN.; Çetinkaya B. Investigation of toxin genes by Polymerase Chain Reaction in *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Turkey. *Foodborne Pathog Dis.* 2009; 6:1029-1035.

Kitchen BJ. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 1981; 48:167-188.

Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Genetic Determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from Milk of mastitic crossbred cattle. *Curr Microbiol.* 2010; 60:379-386.

Kloos WE., Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994; 7:117-140.

Koneman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5° ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 357:1225-1240.

Laranja Fonseca LF.; Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo-MG: Lemos Editorial, 2000, 176p.

Lasa I., Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol*, 2006; 157:99-107.

Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:6489-6494.

Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. *Genet Mol Res*. 2003; 2:63-76.

Le Loir Y, Baron F, Guatier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res*. 2003; 2:63-76.

Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*, 2003; 95:38-43.

Lindsay JA., Holden MT. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics*. 2006; 6:186-201.

Loncarevic S., Jørgensen HJ., Løvseth A., Mathisen T., Rorvik LM. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J. Appl. Microbiol*. 2005; 98:344-350.

Loncarevic S, Jorgensen HJ, Lovseth A, Mathisen T, Rorvik LM. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J. Appl. Microbiol*. 2005; 98:344-350.

Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999; 29:1128-1132.

Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatzsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis*. 2004; 189:2334-2336.

McCallum N, Berger-Bächi B, Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2010; 300:118-129.

McCormick JK, Tripp TJ, Llera AS, Sundberg EJ, Dinges MM, Mariuzza RA, Schlievert PM. Functional analysis of the TCR binding domain of toxic shock syndrome toxin-1 predicts further diversity in MHC class II/superantigen/TCR ternary complexes. *J Immunol*. 2003; 171:1385-1392.

Mehrotra M.; Wang G.; Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032-1035.

Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mulab G, Dambrosio A, Poggiu A. Coagulase positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 98:73-79.

Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol.* 2003; 48:1429-1449.

Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:3457-3459.

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson A, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:1379-1388.

O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:49-79.

Otto M. Staphylococcal biofilm. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322:207-228.

Palazzo IC, Darini AL. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. *Microbiol Lett.* 257:299-305.

Pelisser MR., Klein CS., Ascoli KR., Zotti TR., Arisil ACM. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Braz. J. Microbiol.* 2009; 40:145-148.

Pinheiro de Sá ME, Cunha MLRS, Elias AO, Victória C, Langoni H. 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.* 2004, 41:320-326.

Pyorala S., Taponen S. Coagulase-negative staphylococci—emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009; 134:3-8.

Prestes DS, Filappi A, Cecim M. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam – uma revisão. *Revista FVZA.* 2003; 9:48-59.

Pyorala S. New strategies to prevent mastitis. *reprod domest anim.* 2002; 37:211-216.

Ribeiro Júnior E, Silva MH, Viegas SAA, Ramalho EJ, Ribeiro MD, Oliveira FCS. California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indutivo da mastite subclínica. *RBSPA.* 2008; 9:680-686.

Ribeiro MER, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M, Stumpf JRW, Gomes JF, et al. Relação entre mastite clínica , subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *R Bras Agrociência*. 2003; 9:287-290.

Ruud H. Deurenberg , Ellen E. Stobberingh. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2008; 8:747-763.

Santos RA, Mendonça CL, Afonso JA, Simão CV. Aspectos clínicos do leite em ovelhas com mastite induzidas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Pes Vet Bras*. 2007; 27.

Santos FGP, Mota RA, Silveira Filho VM, Souza HM, Oliveira MBM, Johner JMQ, et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado do Pernambuco. *Revista Napgama*. 2003; 6:19-23.

Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofisk, Gonzales N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res*. 2003; 34:579-596.

Silva, N. da., Cardoso, H.F.T., 2000. Produção de toxinas hemolíticas por amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Vet. Notícias*. 2000; 6:63–67.

Silva LAF, Silva EB, Silva LM, Trindade BR, Silva OC, Romani AF et al. Causas de descarte de fêmeas bovinas leiteiras adultas. *Revis Bras Saúde Prod An*. 2004; 5:9-17.

Silveira TML, Fonseca LM, Lago TBN, Veiga DR. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2005; 57:128-132.

Simojoki H, Hyvonen P, Plumed Ferrer C, Taponen S, Pyorala S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Microbiol*. 2012.

Sordillo LM. New Concepts in the Causes and Control of Mastitis. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16:271-273.

Sordillo LM. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest Prod Sci*. 2005; 98:89-99.

Stiles BG, Krakauer T. Staphylococcal enterotoxins: A purging experience in review, Part I. *Clin Microbiol Newslett*. 2005; 27:179-186.

Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008; 52:837–845.

Taponen S, Supré K, Piessens V, Coillie EV, Vlieghe S, Koort JMK. *Staphylococcus agnetis* SP. Nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical mastitis. *Int Syst Evol Microbiol.* 2012; 62:61-65.

Tormo AM, Martí M, Valle J, Manna AC, Cheung AL, Lasa I, et al. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J. Bacteriol.* 2005; 187:2348-2356.

Ubeda C, Tormo MA, Cucarella C, Trottonda P, Foster TJ, Lasa I, Penadés JR. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol. Microbiol.* 2003; 49:193-210.

Udo, EE. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in Restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J Med Microbiol.* 1999; 48:819-23.

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.* 103 (2004) 241–247.

Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx RR, Rijnders BJA, Van Eldere J. Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter related infections. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 114–119.

Vasconcelos NG, Cunha MLRS. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *J Public Health Epidemiol.* 2010, 2:29-42.

Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Prevost G, Lapeyre C, Bes M, Brun Y, Fleurette, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 1996; 30:271–280.

Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:677-685.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 2004; 279:54881-54886.

Wang Y, Wu CM, Lu LM, Ren GWN, Cao XY, Shen JZ. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol.* 2008;130:118-125.

Yasuda R, Kawano J, Onda H, Takagi M, Shimizu A. and Anzai, T. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from healthy horses in Japan. *Am J Vet Res.* 2000; 6:1451-1455.

Zanette E, Scapin D, Rossi EM. Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovino com suspeita de mastite. *Unoesc & Ciência* 2010; 1: 65-70.

Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb pathogenesis*. 2006; 40:177-183.

Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Gotz F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int. J. Food Microbiol*. 2008; 127:246-251.

## 2 ARTIGO I

### **Caracterização do perfil clonal, dos fatores de virulência e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de leite ovino em diferentes rebanhos.**

Katheryne B. Marins, Patricia Y. Faccioli-Martins, Danilo F.M. Riboli, Valéria C. Pereira, Adilson de Oliveira, Mariana F. Bonesso, Simone Fernandes, Aline A. Oliveira, Ariane Dantas, Luiz F. Zafalon, Maria de Lourdes R.S. Cunha.

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Unesp, Botucatu-SP.

Autor para correspondência: Katheryne Benini Martins, email:  
katheryne\_bm@yahoo.com.br

\*Artigo nas normas da revista BMC Veterinary Research

## Resumo

A mastite é a inflamação da glândula mamária, uma doença normalmente de origem infecciosa. *Staphylococcus aureus* está entre os principais agentes causadores desta enfermidade em ovinos, sendo a presença de cepas resistentes aos antimicrobianos empregados um dos maiores entraves ao tratamento dos animais doentes. Além dos mecanismos de resistência, *S. aureus* pode apresentar diversos fatores de virulência como a produção de biofilmes, toxinas e leucocidinas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil clonal, fatores de virulência e determinar a resistência a antimicrobianos, com ênfase à resistência a oxacilina de *S. aureus* isolados de leite de ovelhas de três rebanhos localizados em diferentes propriedades do Estado de São Paulo, Brasil. As amostras de leite foram colhidas de todos os tetos após realização do *California Mastitis Test* (CMT) para Contagem de Células Somáticas (CCS), identificação de *S. aureus*, investigação da presença de genes codificadores de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*), da toxina TSST-1(*tst*), de biofilme (*icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*) e da leucocidina (*luk-PV*), bem como a determinação da resistência a oxacilina pela pesquisa do gene *mecA* e perfil de sensibilidade a doze antimicrobianos. Os isolados com a presença do gene para toxinas e biofilme foram testados para detecção do RNA mensageiro e avaliação da capacidade de expressão. Além disso, foi investigado o perfil clonal dos *S. aureus* por meio da técnica de eletroforese de campo-pulsado (PFGE). No total foram coletadas 473 amostras de leite de 242 animais das três propriedades, das quais foram isoladas 20 amostras de *S. aureus*, sendo que nenhuma apresentou o gene *mecA* e todas foram sensíveis a todas as drogas testadas, exceto uma amostra que foi resistente a tetraciclina. Sete amostras apresentaram algum gene de toxina, sendo o gene *seb* o mais encontrado, estando presente em cinco amostras, seguido por *sea* em três, *sec* em dois, *tst* e *luk-PV* em uma amostra. As duas amostras positivas para o gene *sec* também foram positivas na técnica de RT-PCR, bem como as amostras com o gene *tst* e *luk-PV*. Em nenhuma das amostras foi encontrado o operon *ica* completo ou a expressão por RT-PCR dos genes *ica* detectados (*icaC*, *icaD* e *icaB*). O gene *bap* foi encontrado em quatro amostras, entretanto nenhuma foi positiva na técnica de RT-PCR. A tipagem das 17 amostras de *S. aureus* revelou a presença de um clone comum nas três propriedades estudadas. A maioria das amostras de *S. aureus* estava associada a casos de mastite subclínica, sendo que apenas duas amostras não estavam causando infecção, o que mostra a importância de *S. aureus* na etiologia da mastite ovina. As amostras apresentaram um alto perfil de sensibilidade às drogas testadas e não foram produtoras de biofilme, mas confirmaram seu potencial toxigênico.

**Palavras chave:** mastite, Ovinos, *Staphylococcus aureus*, resistência antimicrobiana e fatores de virulência.

## 2.1 Introdução

A mastite é a inflamação da glândula mamária e se caracteriza por alterações físicas, químicas e microbiológicas no leite, além de alterações teciduais. Ocorre descarte prematuro das ovelhas com anormalidades de úbere e a redução do ganho de peso dos cordeiros. Em pequenos ruminantes como os ovinos, estafilococos coagulase-negativa são os micro-organismos mais isolados em casos de mastite subclínica (1,2), já *S. aureus*, é responsável por causar mastite clínica e subclínica (3). *S. aureus* foi o micro-organismo mais isolado de amostras de leite provenientes de ovelhas da raça Awassi com mastite subclínica, correspondendo a 39,0% dos isolados, seguido por *Streptococcus* spp (25,0%), *Escherichia coli* (19,6%) e estafilococos coagulase negativa (17,9%) (4).

Um dos fatores preocupantes no controle das mastites é a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos. O sucesso na terapia é prejudicado pelo crescente número de estirpes resistentes aos medicamentos que são usados em Medicina Veterinária. A resistência estafilocócica à meticilina está associada à aquisição do cassete cromossômico *mec* (*SCCmec*), considerado uma ilha de resistência e composto pelo gene estrutural *mecA*, sendo os *S. aureus* portadores desse gene classificados como *S. aureus* meticilina (oxacilina) - resistentes (“MRSA”) que são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (5,6).

Além da resistência, *S. aureus* se destaca por produzir diversos fatores de virulência como enterotoxinas, leucocidinas e biofilme (7) que são importantes por contribuir no agravamento da doença além de ser uma questão de saúde pública. A formação de biofilme permite a aderência e colonização do epitélio da glândula mamária (8), a leucocidina causa necrose tecidual, além da destruição de leucócitos, e a produção de

enterotoxinas (SEs) pode levar a intoxicação alimentar. (9). Assim, o trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil clonal, os fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* isolados do leite de glândulas mamárias de ovinos com mastite subclínica e de portadores assintomáticos.

## **2.2 Resultados**

Das 473 amostras de leite isoladas de 242 animais incluídos no estudo foram encontrados micro-organismos em 169 (35,7%) amostras, enquanto nas demais não houve isolamento microbiológico. Dos micro-organismos isolados, 20 (11,8%) foram identificados como *S. aureus*, sendo que 18 (90,0%) amostras foram isoladas de casos de mastite subclínica e apenas duas (10,0%) amostras foram encontradas em animais sem mastite. Das 20 amostras encontradas, quatro foram do rebanho de Botucatu, duas do rebanho de Nova Odessa e 14 do rebanho de São Carlos.

### **2.2.1 Resistência Antimicrobiana**

O gene *mecA* não foi encontrado em nenhuma das amostras de *S. aureus* e a maioria mostrou sensibilidade a todos os agentes antimicrobianos testados (Tabela 1), exceto uma amostra que apresentou resistência a tetraciclina.

**Tabela 1. Perfis de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de ovelha com mastite frente a 12 antimicrobianos pela técnica de disco-difusão.**

| Antimicrobiano | Sensível<br>N(%) | Resistente<br>N(%) |
|----------------|------------------|--------------------|
| Oxacilina      | 20 (100,0)       | -                  |
| Cefoxitina     | 20 (100,0)       | -                  |
| Tetraciclina   | 19 (95,0)        | 1(5,0)             |
| Penicilina     | 20 (100,0)       | -                  |
| Gentamicina    | 20 (100,0)       | -                  |
| Eritromicina   | 20 (100,0)       | -                  |
| Ciprofloxacina | 20 (100,0)       | -                  |
| Linezolida     | 20 (100,0)       | -                  |
| Clindamicina   | 20 (100,0)       | -                  |
| Cotrimoxazol   | 20 (100,0)       | -                  |
| Rifampicina    | 20 (100,0)       | -                  |
| Vancomicina    | 20(100,0)        | -                  |

### 2.2.2 Detecção de Toxinas

Um total de sete (35,0%) amostras carregaram algum gene de exotoxina isolado ou concomitante (Tabela 2). Das sete amostras positivas no PCR para algum gene de exotoxina, três (15,0%) foram positivas na técnica de RT-PCR, sendo que uma amostra com os genes *sec+tst* expressaram os dois genes concomitantemente, uma amostra positiva para os genes *sea+seb+luk-PV* expressou somente o gene *luk-PV* e a terceira amostra positiva para os genes *sea+sec*, expressou somente o gene *sec*.

**Tabela 2: Detecção dos genes e da expressão das exotoxinas**

| Gene/Expressão             | PCR     | RT-PCR  |
|----------------------------|---------|---------|
|                            | N (%)   | N(%)    |
| <i>sea+seb+luk-PV/ PVL</i> | 1(5,0)  | 1(5,0)  |
| <i>sea+seb</i>             | 2(10,0) | 0       |
| <i>sec+tst/EEC+TSST-1</i>  | 1(5,0)  | 1(5,0)  |
| <i>sea+sec/EEC</i>         | 1(5,0)  | 1(5,0)  |
| <i>Seb</i>                 | 2(10,0) | 0       |
| <b>Total</b>               | 7(35,0) | 3(15,0) |

*sea, seb, sec, tst, luk-PV*: presença dos genes das toxinas A, B, C, TSST-1 PVL. PVL, TSST-1 e EEC: expressão das toxinas.

### 2.2.3 Detecção de Biofilme

Quanto aos genes de biofilme (Tabela 3), o *operon icaADBC* completo não foi encontrado em nenhuma das amostras. Os genes *icaC*, *icaD* e *icaB* foram encontrados concomitantemente em apenas uma amostra, enquanto os genes *icaD* e *icaB* foram encontrados concomitantemente ou isolados. O gene *icaA* não foi encontrado em nenhuma amostra e três (15,0%) amostras não apresentaram nenhum dos genes do operon. Nenhuma das amostras expressou qualquer um dos genes do *operon ica*. O gene *bap* foi encontrado em quatro (20,0%) amostras, entretanto, nenhuma amostra expressou esse gene.

**Tabela 3: Detecção dos genes e da expressão de biofilme**

| <b>Genes</b>          | <b>PCR</b>  | <b>RT-PCR</b> |
|-----------------------|-------------|---------------|
|                       | <b>N(%)</b> | <b>N(%)</b>   |
| <i>icaC+icaD+icaB</i> | 1(5,0)      | 0             |
| <i>icaD+icaB</i>      | 6(30,0)     | 0             |
| <i>icaD</i>           | 5(45,0)     | 0             |
| <i>icaB</i>           | 1(5,0)      | 0             |
| <i>icaD+bap</i>       | 4(20,0)     | 0             |
| <b>Total</b>          | 17          | 0             |

*icaC, icaD, icaB, bap*: presença dos gene de biofilme.

#### **2.2.4 Tipagem**

A tipagem molecular por PFGE foi realizada em 17 amostras, pois três amostras provenientes do rebanho de São Carlos não foram possíveis de serem tipadas. O PFGE (Figura 1) revelou a presença de dois clones, um maior com agrupamento de 10 amostras (uma de Nova Odessa, cinco de São Carlos e quatro de Botucatu) e outro menor com somente duas amostras de São Carlos. As outras cinco amostras (uma de Nova Odessa e quatro de São Carlos) mostraram um perfil policlonal.

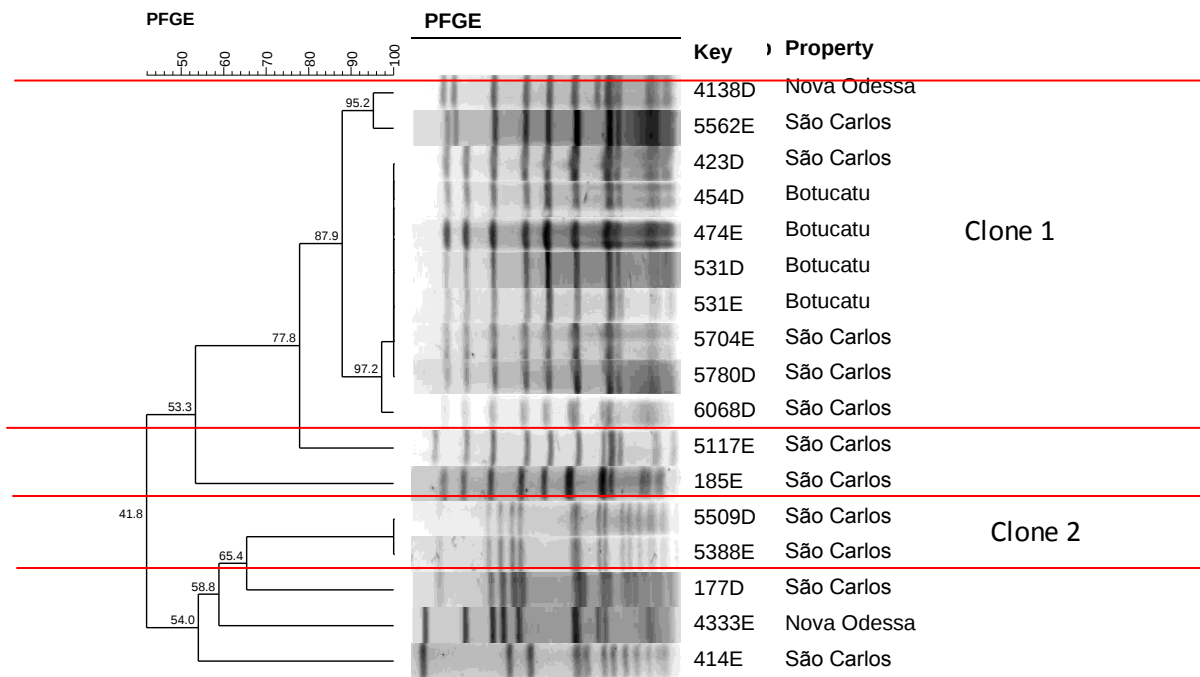


Figura1: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* dos 17 isolados de *Staphylococcus aureus* (similaridade  $\geq 80\%$ ).

Quanto aos fatores de virulência (Tabela 4), no clone maior (10 amostras), apenas uma amostra apresentou um gene para enterotoxina e para TSST-1 e expressou os dois genes. Em uma amostra foi encontrado o gene *bap* e em 5 foram encontrados o gene *icaB* do operon *icaADBC*, mas não foi detectada a expressão desses genes relacionados a formação do biofilme.

No clone menor (duas amostras), não foi encontrado nenhum gene para qualquer uma das toxinas estudadas. Quanto aos genes da formação de biofilme, apenas o gene *bap* e o gene *icaD* foi encontrado nas duas amostras, porém não detectados no RT-PCR. Os genes do operon *icaADBC* não foi encontrado em nenhuma das amostras.

**Tabela 4 : Características dos clones de *S. aureus* isolados de amostras de leite ovino**

| Clones  | Nº de amostras | Genes EEs                 | Expressão EEs             | Gene T SST-1 | Expressão T SST-1 | Gene bap | Expressão Bap | Genes icaADBC                                                      | Expressão icaADBC                                                  |
|---------|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------|-------------------|----------|---------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Clone 1 | 10             | A (0); B (0); C (1); D(0) | A (0); B (0); C (1); D(0) | 1            | 1                 | 1        | 0             | <i>icaA</i> (0), <i>icaC</i> (0), <i>icaB</i> (5) <i>icaD</i> (10) | <i>icaA</i> (0), <i>icaC</i> (0), <i>icaB</i> (0) <i>icaD</i> (0)  |
| Clone 2 | 2              | A (0); B (0); C (0); D(0) | A (0); B (0); C (0); D(0) | 0            | 0                 | 2        | 0             | <i>icaA</i> (0), <i>icaC</i> (0), <i>icaB</i> (0) <i>icaD</i> (2)  | <i>icaA</i> (0); <i>icaC</i> (0); <i>icaB</i> (0); <i>icaD</i> (0) |

EEs: enterotoxinas

## 2.3 Discussão

*S. aureus* é um micro-organismo versátil responsável por causar infecções em diversos hospedeiros, e considerado um dos mais importantes agentes patogênicos na etiologia da mastite infecciosa em vacas, cabras e ovelhas, pois é responsável por causar infecção crônica do tecido mamário que é muito difícil de ser tratada (10). No presente trabalho *S. aureus* foi encontrado em 20 (11,8%) amostras de leite.

O gene *mecA* não foi encontrado em nenhuma das amostras de *S. aureus* estudadas. Vyletelova et al (11) também não encontraram o gene *mecA* em nenhuma das amostras de *S. aureus* isoladas de leite ovino, enquanto que nas amostras isoladas de leite de vaca foi encontrado o gene em 20 amostras (6,1%) de *S. aureus*. Segundo Zafalon et al. (12), as cepas de *S. aureus* que apresentam resistência a oxacilina mediada pelo gene *mecA*, geralmente apresentam maior resistência a outros antibióticos quando comparado com outros micro-organismos sensíveis a oxacilina. No presente trabalho, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados entre os isolados de *S. aureus* revelou

somente uma amostra com resistência apenas a tetraciclina, e as demais amostras foram sensíveis a todas as drogas testadas. Resultados similares foram encontrados por Vyletelova et al (11) em amostras de *S. aureus* isoladas de ovinos. Pengov e Ceru (13) em estudo com isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de leite ovino evidenciaram altos índices de sensibilidade a todas as drogas testadas, com percentuais de resistência de 6,3% apenas para a penicilina e ampicilina.

As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* podem trazer consequências para a saúde humana devido às toxinas produzidas por estes micro-organismos que são secretadas e permanecem estáveis no leite (14), e podem causar intoxicação alimentar (15). No presente estudo sete amostras apresentaram algum gene de enterotoxina ou TSST-1, sendo o gene *seb* o mais encontrado, seguido por *sea* e *sec*, respectivamente. O gene *sed* não foi encontrado em nenhuma das amostras. Diferente desses resultados, para Scherred et al. (16) *sec* foi o gene mais encontrado nas 191 amostras de *S. aureus* obtidas de amostras de leite ovino e caprino, estando presente em 123 (64,4%) isolados, seguido por *seg* (16,2%), *sea* (14,6%), *sej* (13,6%), *sei* (12,6%), *seb* (2,1%) e *sed* (2,1%). Na literatura, são relatados os genes *sea* e *seg* (16,17), *sec*, *sed*, *seg* e *sei* (18) como os mais freqüentemente detectados em *S. aureus* isolados de animais.

Embora o gene *seb* tenha sido o mais detectado, ele não foi expresso por nenhuma amostra de *S. aureus*. Somente duas (10,0%) amostras de *S. aureus* expressaram o gene *sec* e uma (5,0%) o gene *tst*. As enterotoxinas A e D são as mais comumente envolvidas em surtos de intoxicação alimentar (19), entretanto os resultados obtidos nesse estudo mostram a importância da enterotoxina C em cepas isoladas de ovinos, bem como a TSST-1. Outros autores relatam a detecção dessa toxina mais freqüentemente em amostras de casos de mastite clínica em bovinos, caprinos e ovinos (20). Na Inglaterra Bone et al., (21) relataram casos de intoxicação alimentar causadas pelo consumo de

queijos produzidos com leite de ovelhas. A análise das amostras de queijo revelou a presença de enterotoxinas. Outras análises feitas com amostras de leite e queijo levaram os autores a concluir que a contaminação do alimento por *S. aureus* não ocorreu durante o processo de produção, mas porque os animais produtores do leite estavam infectados.

Quanto à exotoxina PVL, esta foi encontrada em apenas uma amostra que teve sua expressão confirmada. A PVL é um dos mais importantes fatores de virulência produzido por *S. aureus* por contribuir com sua patogenicidade. Essa toxina está associada a diversas doenças em humanos como pneumonias e dermatites necrotizantes (22). A presença do gene *luk-PV* também tem sido investigada e encontrada em amostras de *S. aureus* de casos de mastite (18, 10, 23), porém esse é o primeiro relato da expressão dessa toxina em *S. aureus* isolados de ovinos.

Dentre os diversos fatores de virulência estudados em *S. aureus*, a produção de biofilme em isolados provenientes de casos de mastite ovina ainda é pouco estudada. O operon *icaADBC* é responsável pela síntese do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), principal componente do biofilme em estafilococos (8). Nesse estudo nenhuma das amostras estudadas apresentou o gene *icaA*, mas os outros genes do operon foram encontrados na maior parte das amostras, principalmente *icaD* (Tabela 3). Entretanto, nenhuma das amostras expressaram qualquer um dos genes *ica* encontrados. O fato das amostras não expressarem os genes do operon *ica* e conseqüentemente não produzirem o PIA provavelmente se deve ao fato de nenhuma das amostras apresentar o gene *icaA* que parece ser fundamental para a síntese de PIA, por ser responsável por catalisar a reação que adiciona as moléculas de beta N-acetilglicosamina para formação da cadeia de PIA (24).

O gene *bap*, que codifica uma proteína importante na formação de biofilme independente de PIA (25), foi encontrado em quatro amostras (Tabela 3), entretanto nenhum *S. aureus* expressou esse gene no RT-PCR. O gene *bap* não é comumente encontrado, sendo sua presença relatada em poucas amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina (26). Os resultados obtidos foram diferentes dos relatados por Tel et al., (27) ao analisarem 110 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite clínica ovina que não apresentaram o gene *bap*, enquanto foram positivas para os genes *icaA* e *icaD*.

Segundo Aguilar et al. (28) a maioria das amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite está envolvida por uma camada de biofilme que auxilia na adesão e colonização do epitélio da glândula mamária. Entretanto as 20 amostras isoladas de ovinos nesse estudo não expressaram os genes estudados (*icaADBC* e *bap*).

A tipagem das 17 amostras de *S. aureus* revelou a presença de um clone comum nas três propriedades estudadas. A caracterização da diversidade genética dos *S. aureus* é de grande importância para compreensão do padrão de dispersão do patógeno. Os resultados demonstram não haver uma grande heterogeneidade entre as estirpes de *S. aureus*, já que metade das amostras pertence a um único clone. Quanto ao perfil de virulência dessas cepas, apenas uma expressou *sec* e *tst*, as demais não expressaram nenhum dos fatores estudados, o que sugere que outros fatores de virulência podem estar relacionado com a capacidade desse clone de se disseminarem pelos rebanhos e se estabelecerem com sucesso na glândula mamária de ovinos causando mastite.

Os genes *sec* e *tst*, estão localizados em plasmídeo e ilha de patogenicidade, respectivamente, e podem ser transferidos de uma bactéria para outra. A presença dos genes *sec* e *tst* em uma amostra sugere que este clone, que teve a capacidade de se

disseminar em todas os rebanhos estudados, provavelmente recebeu esses genes de virulência de outros estafilococos, tornando-se mais virulento.

## **2.4 Conclusão**

A maioria das amostras de *S. aureus* encontradas foi isolada de casos de mastite subclínica, sendo que apenas duas amostras não estavam causando infecção, o que mostra a importância dos *S. aureus* na etiologia da mastite ovina. Todas as amostras de *S. aureus* isolados nos três rebanhos apresentaram um perfil de sensibilidade elevada frente às drogas testadas. Além disso, todas as amostras não foram produtoras de biofilme, revelando não serem fatores de virulência que justifiquem a infecção causada por essas cepas. Entretanto, algumas das amostras apresentaram potencial toxigênico com a produção de EEC, TSST-1 e PVL. Em amostras de *S. aureus* isoladas de leite ovino foi encontrado um clone que se disseminou nos rebanhos de ovinos. Além disso, a presença de *sec* e *tst* em uma das amostras do clone sugere a possibilidade desse clone em adquirir genes de virulência, o que é importante com relação a saúde do animal e higiene alimentar.

## **2.5 Materiais e Métodos**

### **2.5.1 Origem das Amostras**

As amostras de leite ovino foram coletadas de cada um dos tetos de 242 animais de rebanhos experimentais, sendo 37 provenientes do rebanho do Instituto de Zootecnia - Nova Odessa, 150 de rebanhos da Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos e 55 animais do rebanho da fazenda Edgardia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Botucatu, todas localizadas no Estado de São Paulo, Brasil.

Os ovinos dos rebanhos localizados em São Carlos e Nova Odessa pertenciam à raça Santa Inês, e os de Botucatu eram da raça Bergamácia.

Foram consideradas infectadas as glândulas mamárias que não apresentaram anormalidades ao exame clínico, mas apresentaram reação ao California Mastitis Test ou Contagem de Células Somáticas positivo (29) e foram positivas no isolamento microbiológico.

### **2.5.2 Isolamento e Identificação de *S. aureus***

As amostras de leite foram cultivadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 72 horas.

As colônias bacterianas suspeitas foram coradas pelo método de Gram para visualização da morfologia. Colônias caracterizadas como cocos Gram positivos agrupados foram submetidas às provas de catalase e coagulase. O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, e pela resistência à bacitracina (0,04 U) e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg) (Baker, 1984). Na identificação de *S. aureus* foi realizada a fermentação dos açúcares maltose, trealose e manitol.

### **2.5.3 Testes de sensibilidade a antimicrobianos**

Os 20 isolados de *S. aureus* foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro*, pela técnica de disco-difusão segundo recomendações do Clinical Laboratory Standard Institute - CLSI (2011), com 12 antimicrobianos: rifampicina (5 µg), linezolida (30µg), vancomicina (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), penicilina (10 UI),

oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg) e cotrimoxazol (25µg). .

#### **2.5.4. Detecção dos genes *mecA*, *icaADBC*, *bap*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst* e *luk-pvl***

##### **2.5.4.1 Extração do DNA.**

O ácido nucléico total foi extraído a partir de amostras de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em BHI e incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit Illustra<sup>®</sup> (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir 500 µL da solução de lise foi adicionados à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 11.000 x g por 1 min. A parte líquida foi descartada e 500 µL de solução de lise foi novamente adicionados à coluna. Após a centrifugação a 11.000 x g por 1 min. e descarte da parte líquida, 500 µL da solução de lavagem foi adicionados à coluna e esta submetida à centrifugação a 11.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 L de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

##### **2.5.4.2 Amplificação do DNA (PCR) para detecção dos gene *mecA*, biofilme e exotoxinas.**

Os primers utilizados na PCR para cada um dos genes estudados se encontram na tabela 5.

**Tabela 5: Primers utilizados na PCR**

| Gene          | Sequência de nucleotídeos 5' a 3'      | Produto amplificado (pb) | Referencia |
|---------------|----------------------------------------|--------------------------|------------|
| <i>icaA</i>   | ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA             | 103                      | 30         |
|               | GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC             |                          |            |
| <i>icaC</i>   | TAA CTT TAG GCG CAT ATGTTT             | 400                      | 30         |
|               | TTC CAGTTA GGC TGG TAT TG              |                          |            |
| <i>icaD</i>   | ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG             | 198                      | 30         |
|               | CGT GTTTTCAACATTTAATGCAA               |                          |            |
| <i>icaB</i>   | CTGAT CAAGAATTTAAAT CACAAA             | 302                      | 30         |
|               | AAA GTC CCAT AA GCCTGT TT              |                          |            |
| <i>Bap</i>    | CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC    | 971                      | 28         |
|               | GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC     |                          |            |
| <i>Sea</i>    | TTGGAA ACG GTT AAA ACG AA              | 120                      | 31         |
|               | GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA             |                          |            |
| <i>Seb</i>    | TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG             | 478                      | 31         |
|               | GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC             |                          |            |
| <i>Sec</i>    | GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT             | 257                      | 31         |
|               | AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC             |                          |            |
| <i>Sed</i>    | CTA GTT TGG TAA TAT CTCCT              | 317                      | 31         |
|               | TAA TGC TAT ATC TTATAG GG              |                          |            |
| <i>Tst</i>    | ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA             | 350                      | 31         |
|               | TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT             |                          |            |
| <i>luk-PV</i> | ATC ATT AGG TAA AAT GTCTGG ACA TGA TCC | 433                      | 32         |
|               | GCA TCA ATT GTA TTG GAT AGC AAA AGC    |                          |            |
| <i>mecA</i>   | ATC GAT GGT AAA GGT TGG                | 533                      | 33         |
|               | AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG            |                          |            |

#### **2.5.4.3 Eletroforese em gel de agarose**

Os géis de agarose foram preparados em concentração de 2,0% em TBE 1X, corados com SYBER SAFE DNA Gel Stain<sup>®</sup> (Invitrogen) e visualizadas em transiluminador de luz UV.

#### **2.5.5 Confirmação da expressão dos fatores de virulência**

As amostras de *S. aureus* isoladas que apresentaram o gene codificador das enterotoxinas A, B, C, D ou da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), biofilme (*icaADBC* e *bap*) e *luk-PV* foram submetidas à confirmação da capacidade de expressão pela técnica de RT-PCR conforme descrito abaixo.

##### **2.5.5.1 Extração de RNA**

O RNA total foi extraído a partir de amostras de *S. aureus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a extração foi utilizado o Kit Illustra RNAspin Mini RNA de acordo com as orientações do fabricante. Foi transferido 200 µL da cultura de *S. aureus* para um eppendorf estéril de 1,5mL. Após centrifugação a 10.000g por 1 minuto, foi removido todo o sobrenadante e adicionado 100µL de TE contendo 2mg/mL de lisozima, e incubado a 37°C por 10 minutos. Para lise das células foi adicionado 350µL de Buffer RA1 juntamente com 3,5µL de β-mercaptoethanol. Em seguida a solução foi aplicada em filtros RNAspin Mini Filter units e centrifugada a 11.000g por 1 minuto, descartando os filtros após centrifugação. Para o ajuste das condições de ligação foi adicionado 350µL de etanol 70% no filtrado, que foi transferido para o RNAspin Mini Column e centrifugado a 8.000g por 30 segundos. Para a ligação na membrana foi adicionado 350µL de MDB

(membrane desalting buffer) e centrifugado a 11.000 g por 1 minuto. A lavagem das amostras foi feita em 2 fases. Para 1ª lavagem foi adicionado 600µL de Buffer RA3 na coluna e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. Para a 2ª lavagem foi adicionado 250µL de RA3 na coluna e centrifugado a 11.000 por 2 minutos. Em seguida a coluna foi colocada em um novo eppendorf de 1,5mL para a eluição do RNA, que foi realizada com 45µL de H<sub>2</sub>O RNA free acrescentada de 5µL de RNA guard e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. O tratamento com DNase para a eliminação total de possíveis resíduos de DNA foi feito adicionando 2µL de Buffer, em seguida adicionando 2µL de DNase e encubado por 1 hora a 37°C. Em seguida foi adicionado 2µL de Stop DNase, e incubado a 65° por 10 minutos para inibição da enzima DNase. O RNA foi levado imediatamente a temperatura de -80°C.

#### **2.5.5.2 Obtenção de cDNA**

Foram preparados 2 Mix (Mix 1 e Mix 2). Para o Mix 1 foram utilizados 14µL de RNA (já aliquotado e tratado com DNase) 1µL de Random primer, 1µL de dNTP e 4µL de água nuclease free (kit de extração). Para o Mix 2 foram utilizados 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1M) e 1 µL de SuperScript III (200 U/µL). O Mix 1 foi levado ao termociclador a 65°C por 5 minutos. Em seguida foi retirado do termociclador e colocado imediatamente no gelo por aproximadamente 5 minutos. Logo em seguida foi adicionado o Mix 2 (volume de 6µL) e colocado a amostra novamente no termociclador, dando continuidade ao programa, com ciclos de 65°C por 5 minutos; 25°C por 5 minutos; 50°C por 60 minutos; 70°C por 15 minutos e término a 20°C. Em seguida o cDNA foi congelado a -80°C.

### 2.5.5.3 PCR do cDNA

A partir do cDNA obtido, foi realizada a reação de PCR para verificar a expressão dos genes de toxinas e biofilme utilizando os primers descritos na Tabela 5. Em seguida foi realizada a eletroforese para visualização dos produtos amplificados.

### 2.5.6 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O PFGE das amostras de *S. aureus* foi feito segundo o protocolo modificado de McDougal et al. (34). Em um microtubo previamente pesado, 0,5ml da cultura overnight *S. aureus* foi centrifugada à 12.000 rpm por 50s. Depois de desprezado o sobrenadante, o microtubo foi novamente pesado e adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) mais a diferença entre o peso final e inicial em ml. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min. a 37°C. Após homogeneização, foram adicionados 5µl de Lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µl de agarose low melt. As amostras foram vertidas nos moldes para plugues até que solidificassem e, então, colocadas em 2ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por pelo menos 4h. O EC foi retirado e os plugues foram lavados com 2ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora. A restrição do DNA genômico foi feita com metade de um plugue utilizando-se a enzima *Sma*I (Fast Digest *Sma*I<sup>®</sup>, Fermentas Life Science, Canadá) em 50µl de tampão de restrição. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System<sup>®</sup> (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) feito com TBE 0,5X sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5X TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG

Marker<sup>®</sup> (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed<sup>®</sup> (10.000X em água, Biotium, EUA) por 45min., e fotografados sob transiluminação UV. Para análise de similaridade, cálculo dos coeficientes de correlação Dice e criação do dendograma pelo método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) foi utilizado o software BioNumerics<sup>®</sup> (versão 6.1; Applied Maths, Bélgica).

## 2.6 Autores

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de produção animal (Fazenda Lageado-Botucatu), UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

## 2.7 Contribuição dos Autores

KBM coletou as amostras de leite, identificou *S. aureus*, fez as pesquisas dos genes e escreveu o artigo. PYMF participou da coleta das amostras de leite e identificação de *S. aureus*. DFMR realizou a tipagem por PFGE, VCP contribuiu na execução da técnica de RT-PCR, AO contribuiu na realização da técnica de RT-PCR, MFB realizou PCR da PVL, SF participou da coleta das amostras de leite, AAO participou da coleta das amostras de leite, AD participou da coleta das amostras de leite, LFZ contribuiu para a concepção da ideia do estudo e participou da coleta das amostras de leite, MLRSC coordenou a pesquisa, análise dos dados e redação do artigo.

## **2.8 Informações dos autores**

KBM é aluna de mestrado do programa de pós graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu. PYMF é aluna de Pós-Doutorado do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu. DFMR é aluno de mestrado do programa de pós graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, VCP é aluna de doutorado do programa de pós graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, AO é aluno de doutorado do programa de pós graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, MFB é aluna de doutorado do programa de pós-graduação em Doenças tropicais da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, SF é auxiliar acadêmica da Unesp, AAO é aluna de mestrado em zootecnia e produção animal, AD é aluna de mestrado em zootecnia e produção animal, LFZ é pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, MLRSC é professora adjunta do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu.

## **2.9 Agradecimento**

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento do projeto.

## 2.10 Referencias

- 1- Bergonier D, Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Bertellot X. Mastitis of dairy ruminants. *Vet Res.* 2003; 34:689-716.
- 2- Vautor E, Cockfield J, Le Marechal C, Le Loir Y, Chevalier M, Robinson DA, Thierry R, Lindsay J. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet Res.* 2009; 40.
- 3- Contreras A, Sierra D, Sanchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Res.* 2007; 68:145-153.
- 4- Al-Majali AM, Jawabreh S. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Small Rum. Res.* 2003; 47:243-248.
- 5- Wang Y, Wu CM, Lu LM, Ren GWN, Cao XY Shen JZ. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol.* 2008;130:118-125.
- 6- Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Genetic Determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattles. *Curr Microbiol.* 2010; 60:379-386.
- 7- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NPJ. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4987-4996.
- 8- Otto, M. Staphylococcal biofilm. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322:207-228.
- 9- Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins.* 2010; 2:1751-1773.
- 10- Aires-de-Sousa M, Parente CESR, Vieira-da-Mota OV, BonnaICF, Silva DA, Lencastre E. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:3845-3849.
- 11- Vyleťlová M, Vlková H, Mangal. Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative Staphylococci in raw milk manufacturing. *Czech J. Food Sci.* 2011; 29: 11-16.

- 12- Zafalon LF, Verissimo CJ, Mamizuka EM, Martins KB, Almeida LM, Veschi JLA. Estafilococos resistentes a oxacilina isolados dos casos de mastite subclinica em ovinos. *Arq. Inst. Biol.*, 2012; 79:1-7.
- 13- Pengov A, Ceru S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. *J Dairy Sci.* 2003; 86:3157-3163.
- 14- Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Cienc. Rural.* 2004; 34:1315-132.
- 15- Balaban, N., Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. *Int J Food Microbiol.* 2000; 61:1-10.
- 16- Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet Microbiol.* 2004; 101:101-107.
- 17- Wang SC, Wu CM, Xia SC, Qi YH, Xia LN, Shen JZ. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Vet Microbiol.* 2009; 137:276-281.
- 18- Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathogenesis.* 2006; 40:177-183.
- 19- Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *Int. J. Food Microbiol.* 2010; 142:74-77.
- 20- Jones TO, Wieneke AA. Staphylococcal toxic shock syndrome. *Vet. Rec.* 1986; 119, p.34-45.
- 21- Bone FJ, Bogie D, Morgan-Jones SC. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. *Epidemiol Infect.* 1989; 103:449-458.
- 22- Giudice P, Blanc V, de Rougemont A, Bes M, Lina G, Hubiche T, Roudière L, Vandenesch F, Etienne J. Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains. *Dermatology.* 2009; 219:299-302.

- 23- Unal N, Askar S, Macun HC, Sakarya F, Altun B, Yidirim M. Pantón-Valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and antibacterial susceptibility profiles of staphylococci isolated from Milk of small ruminants. *Trop. Anim. Health Prod.* 2012; 44:573-579.
- 24- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002; 43:1367-1378, 2002.
- 25- Cucarella C, Tormo MA, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, et al. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2004; 72:2177-2185.
- 26- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001; 183:2888-2896.
- 27- Tel OU, Aslantas O, Keskey K, Yilmaz ES, Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm of *Staphylococcus aureus* strains isolated from gangrenous mastitis of ewe. *Acta Vet Hung.* 2012; 60:189-197.
- 28- Aguilar B, Amorena B, Iturralde M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2001; 78:183-191.
- 29- McDougall S, Murdough P, Pankey W, Denaney C, Barlow J, Scruton D. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Res.* 2001; 40:245-254.
- 30- Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 75:408-413.
- 31- Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:426-430.
- 32- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:1128-1132.
- 33- Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:2240-2244.

34- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McCallister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:5113-5120.

### **3 ARTIGO II**

#### **RESISTENCIA ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULENCIA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA ISOLADOS DE LEITE OVINO**

Katheryne B. Marins, Patricia Y. Faccioli-Martins, Valéria C. Pereira, Adilson de Oliveira, Mariana F. Bonesso, Simone Fernandes, Aline A. Oliveira, Ariane Dantas, Luiz F. Zafalon, Maria de Lourdes R.S. Cunha.

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Unesp, Botucatu-SP.

Autor para correspondência: Katheryne Benini Martins, email:  
katheryne\_bm@yahoo.com.br

\*Artigo nas normas da revista Veterinary Microbiology

## RESUMO

Mastite é a inflamação da glândula mamária, a doença pode causar efeitos negativos sobre os rebanhos ovinos. Na etiologia da mastite ovina, bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes causadores da doença, com destaque para os estafilococos coagulase-negativa (ECN) que são os mais prevalentes. O presente trabalho teve como objetivo investigar os fatores de virulência e determinar a resistência a antimicrobianos, com ênfase à resistência a oxacilina em ECN isolados de leite de ovelhas. Após a realização do *California Mastitis Test* (CMT) as amostras de leite foram colhidas de tetos para realização da Contagem de Células Somáticas (CCS) e identificação das espécies de estafilococos isoladas, investigação da presença de genes codificadores de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*), da toxina TSST-1(*tst*), da leucocidina (*luk-pv*) e de biofilme (*icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *aap* e *bhp*), além da determinação da resistência a oxacilina pela pesquisa do gene *mecA* e perfil de sensibilidade a doze antimicrobianos. Os isolados com a presença de genes para toxinas e biofilme foram testados para detecção do RNA mensageiro para avaliação da capacidade de expressão dos fatores de virulência. Foram coletadas 473 amostras de leite de 242 animais das três rebanhos, dessas amostras, foram encontrados micro-organismos em 169 (35,7%) amostras. Das 169 amostras, 132 (78,1%) foram identificados como pertencendo ao gênero *Staphylococcus*, sendo 20 (15,1%) amostras identificadas como *S. aureus* e as demais 112 (84,9%) como ECN, dessas amostras, quatro apresentaram o gene *mecA*. Os maiores percentuais de resistência foram frente à oxacilina, penicilina e tetraciclina. Um total de 70 amostras apresentou algum gene para toxina, e 71 apresentou algum gene de biofilme. Nenhuma das amostras de ECN expressou os genes codificadores de toxinas pela técnica de RT-PCR, enquanto que em 13 amostras foram observadas a expressão de genes da formação de biofilme. A expressão mais frequente do gene *bap* relacionado com a formação de biofilme sugere a importância dessa proteína na formação de biofilme nos ECN isolados de ovinos. Nenhum gene de toxina foi expresso nas amostras estudadas, entretanto, a presença dos genes revela o potencial toxigenico das amostras. Diferentes espécies de ECN foram encontradas, o que mostra a importância da identificação de espécies de ECN.

**Palavras chave:** Mastite, ECN, fatores de virulência, resistência antimicrobiana, ovinos.

### 3.1 Introdução

A mastite é um entrave à criação de ovinos devido às perdas econômicas em decorrência da doença (Gonzalo et al., 2004). Ocorre descarte prematuro das ovelhas com anormalidades de úbere e a redução do desenvolvimento e altas taxas de mortalidade dos cordeiros (Fthenakis e Jones, 1990; Ebrahimi et al., 2007), além de alterações significativas na produção e nos componentes físico-químicos do leite, com redução de volume e da quantidade de gordura, e aumento no pH, teores de cloro e na contagem de células somáticas (Santos et al., 2007). A forma subclínica da mastite em ovelhas apresenta relevância econômica, em virtude dos prejuízos na produção e da maior ocorrência quando comparada com a forma clínica da enfermidade. Dentre os agentes etiológicos da mastite ovina, *Staphylococcus* spp. são os principais micro-organismos isolados (Bergonier e Berthelot, 2003).

Dentre os *Staphylococcus*, estafilococos coagulase-negativa (ECN) são os mais importantes agentes etiológicos infecciosos da mastite ovina (Leitner et al., 2003; Coutinho et al., 2006) por serem prevalentes como agentes causadores da doença (Leitner et al., 2003;). A sua relevância é destacada, porque estão entre os agentes etiológicos mais frequentemente encontrados nos casos de mastite subclínica, variando entre 25 à 93% dos isolados (Bergonier et al., 2003).

Um dos maiores desafios no controle da mastite é a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos utilizados para o tratamento. A resistência estafilocócica à meticilina está associada à aquisição do cassete cromossômico *mec*, considerado uma ilha de resistência e composto pelo gene estrutural *mecA*. A sua expressão resulta na produção de PBP 2', uma proteína com alto peso molecular e baixa afinidade a antibióticos beta-lactâmicos (Diekema et al., 2001).

Além dos mecanismos de resistência, os estafilococos podem apresentar diversos fatores de virulência. Um dos fatores de virulência de grande importância está relacionado à capacidade destes micro-organismos de produzirem biofilmes (Aguilar et al., 2001). O biofilme protege a bactéria da ação dos componentes do sistema imunológico, pois dificultam a ação dos fagócitos (Fox et al., 2005), além de funcionar como uma barreira que dificulta a penetração de agentes antimicrobianos (Stewart, 1996).

As infecções intramamárias causadas por estafilococos podem trazer consequências para a saúde humana devido às toxinas produzidas por estes micro-organismos que são secretadas e permanecem estáveis no leite (Fagundes e Oliveira, 2004). Estas toxinas podem causar desde uma intoxicação alimentar até um choque tóxico (Baladan e Rasooly, 2000).

Considerando que a mastite é a principal doença responsável pelas perdas na produção de leite em ovinos e os ECN serem os agentes etiológicos mais frequentes, além da produção por esses micro-organismos de uma grande variedade de toxinas e dificuldade no tratamento em função da resistência antimicrobiana e formação de biofilme, esse estudo teve como objetivo principal caracterizar os fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos em ECN isolados do leite de glândulas mamárias ovinas de animais com mastite subclínica e de portadores assintomáticos.

## **3.2 Materiais e Métodos**

### **3.2.1 Origem das Amostras**

As amostras de leite ovino foram oriundas de 242 animais de rebanhos experimentais, sendo 37 provenientes do rebanho do Instituto de Zootecnia - Nova

Odessa, 150 de rebanhos da Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos e 55 animais do rebanho da fazenda Edgardia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Botucatu, todas localizadas no interior do Estado de São Paulo.

Os ovinos dos rebanhos localizados em São Carlos e Nova Odessa pertencem à raça Santa Inês, e os de Botucatu são da raça Bergamácia.

As glândulas mamárias que não apresentaram anormalidades clínicas detectáveis, mas apresentarem reação com escore positivo ao California Mastitis Test ou Contagem de Células Somáticas positivo (Mcdougall et al., 2001) e foram positivas nas análises microbiológicas foram consideradas infectadas.

Foram colhidas amostras de leite de mamas reagentes e não reagentes ao CMT, e as amostras foram classificadas como provenientes de mamas com mastite ou sem mastite de acordo com os resultados do CMT e da CCS.

### **3.2.2 Isolamento e Identificação de ECN**

As amostras de leite foram cultivadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 72 horas.

As colônias bacterianas suspeitas foram coradas pelo método de Gram para visualização da morfologia. Colônias caracterizadas como cocos Gram positivos agrupados foram submetidas às provas de catalase e coagulase. O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, e pela resistência à bacitracina (0,04 U) e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg) (Baker, 1984). Para a identificação das espécies de ECN foi utilizado o método simples modificado proposto por Cunha et al. (2004), o qual consiste na fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol, produção de hemolisina e crescimento anaeróbico em caldo tioglicolato. As linhagens foram

mantidas a 37°C por 72 horas. Quando necessário e de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa do método simples modificado, foram utilizadas outras provas bioquímicas, incluindo redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de  $\beta$ -D-frutose e resistência a novobiocina.

### **3.2.3 Identificação das espécies de ECN por seqüenciamento**

Uma amostra de cada espécie de ECN identificada pelos testes bioquímicos e as amostras que não foram possíveis de identificar utilizando as provas bioquímicas foram também identificadas por seqüenciamento do gene *rpoB* que codifica a subunidade B da RNA polimerase (nucleotídeos 1444-1928) de acordo com o protocolo descrito por Mellmann et al., (2006).

### **3.2.4 Testes de sensibilidade a antimicrobianos**

Os ECN isolados foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro*, pela técnica de disco-difusão segundo recomendações do Clinical Laboratory Standard Institute - CLSI (2011), com 12 antimicrobianos: rifampicina (5 $\mu$ g), linezolida (30 $\mu$ g), vancomicina (30 $\mu$ g), clindamicina (2 $\mu$ g), eritromicina (15 $\mu$ g), penicilina (10 UI), oxacilina (1 $\mu$ g), cefoxitina (30 $\mu$ g), tetraciclina (30 $\mu$ g), gentamicina (10 $\mu$ g), ciprofloxacina (5 $\mu$ g) e cotrimoxazol (25 $\mu$ g).

### **3.2.5 Detecção dos genes *mecA*, *icaADBC*, *bap*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst* e *luk-PV*.**

#### **3.2.5.1 Extração do DNA.**

O ácido nucléico total foi extraído a partir de amostras de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em BHI e incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit Illustra<sup>®</sup> (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir 500 µL da solução de lise foi adicionados à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Posteriormente o sobrenadante será transferido para a coluna e centrifugado a 11.000 x g por 1 min. A parte líquida foi descartada e 500 µL de solução de lise foi novamente adicionados à coluna. Após a centrifugação a 11.000 x g por 1 min. e descarte da parte líquida, 500 µL da solução de lavagem foi adicionados à coluna e esta submetida à centrifugação a 11.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

#### **3.2.5.2 Amplificação do DNA (PCR) para detecção dos gene *mecA*, biofilme e exotoxinas.**

Os primers e os parâmetros utilizados na PCR para cada um dos genes estudados se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados na PCR

| Gene          | Sequência de nucleotídeos 5' a 3'      | Produto amplificado (pb) | Referencia                 |
|---------------|----------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <i>icaA</i>   | ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA             | 103                      | Arciola et al., 2001       |
|               | GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC             |                          |                            |
| <i>icaC</i>   | TAA CTT TAG GCG CAT ATGTTT             | 400                      | Arciola et al., 2001       |
|               | TTC CAGTTA GGC TGG TAT TG              |                          |                            |
| <i>icaD</i>   | ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG             | 198                      | Arciola et al., 2001       |
|               | CGT GTTTTCAACATTTAATGCAA               |                          |                            |
| <i>icaB</i>   | CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA               | 302                      | Arciola et al., 2001       |
|               | AAA GTC CCATAA GCC TGT TT              |                          |                            |
| <i>Bap</i>    | CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC    | 971                      | Cucarella et al., 2004     |
|               | GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC     |                          |                            |
| <i>Bhp</i>    | ATGAAAAAT AAACAAGGATTTC                | 1278                     | Qin et al., 2007           |
|               | GCCTAAGCTAGATAATGTTTG                  |                          |                            |
| <i>Aap</i>    | ATACAACTGGTGCAGATGGTTG                 | 400                      | Vandecasteele et al., 2003 |
|               | GTAGCCGTCCAAGTTTACCAG                  |                          |                            |
| <i>Sea</i>    | TTGGAA ACG GTT AAA ACG AA              | 120                      | Johnson et al., 1991       |
|               | GAA CCTTCC CAT CAA AAA CA              |                          |                            |
| <i>Seb</i>    | TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG             | 478                      | Johnson et al., 1991       |
|               | GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC             |                          |                            |
| <i>Sec</i>    | GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT             | 257                      | Johnson et al., 1991       |
|               | AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC             |                          |                            |
| <i>Sed</i>    | CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT             | 317                      | Johnson et al., 1991       |
|               | TAA TGC TAT ATC TTATAG GG              |                          |                            |
| <i>Tst</i>    | ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA             | 350                      | Johnson et al., 1991       |
|               | TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT             |                          |                            |
| <i>luk-PV</i> | ATC ATT AGG TAA AAT GTCTGG ACA TGA TCC | 433                      | Lina et al., 1999          |
|               | GCA TCA ATT GTATTG GAT AGC AAA AGC     |                          |                            |
| <i>mecA</i>   | ATC GAT GGT AAA GGT TGG                | 533                      | Murakami et al., 2003      |
|               | AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG            |                          |                            |

### 3.2.5.3 Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados em concentração de 2,0% em TBE 1X, corados com SYBER SAFE DNA Gel Stain<sup>®</sup> (Invitrogen) e visualizadas em transiluminador de luz UV. As reações de PCR que apresentaram fragmentos amplificados maiores que 1000 pb foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

### 3.2.6 Expressão dos fatores de virulência pela técnica de RT-PCR

As amostras de ECN que apresentaram genes codificadores das enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*) ou da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*), biofilme (*icaADBC*, *bap*, *bhp* e *aap*) e/ou *luk-PV* foram submetidas à técnica de RT-PCR para verificar a expressão dos genes encontrados.

#### 3.2.6.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de amostras de ECN cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a extração foi utilizado o Kit Illustra RNAspin Mini RNA de acordo com as orientações do fabricante. Foi transferido 200 µL da cultura de estafilococos para um eppendorf estéril de 1,5mL. Após centrifugação a 10.000g por 1 minuto, foi removido todo o sobrenadante e adicionado 100µL de TE contendo 2mg/mL de lisozima, e incubado a 37°C por 10 minutos. Para lise das células foi adicionado 350µL de Buffer RA1 juntamente com 3,5µL de β-mercaptoethanol. Em seguida a solução foi aplicada em filtros RNAspin Mini Filter units e centrifugada a 11.000g por 1 minuto, descartando os filtros após centrifugação. Para o ajuste das

condições de ligação foi adicionado 350µL de etanol 70% no filtrado, que foi transferido para o RNAspin Mini Column e centrifugado a 8.000g por 30 segundos. Para a ligação na membrana foi adicionado 350µL de MDB (membrane desalting buffer) e centrifugado a 11.000 g por 1 minuto. A lavagem das amostras foi feita em 2 fases. Para 1ª lavagem foi adicionado 600µL de Buffer RA3 na coluna e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. Para a 2ª lavagem foi adicionado 250µL de RA3 na coluna e centrifugado a 11.000 por 2 minutos. Em seguida a coluna foi colocada em um novo eppendorf de 1,5mL para a eluição do RNA, que foi realizada com 45µL de H<sub>2</sub>O RNA free acrescentada de 5µL de RNA guard e centrifugado a 11.000g por 1 minuto. O tratamento com DNase para a eliminação total de possíveis resíduos de DNA foi feito adicionando 2µL de Buffer, em seguida adicionando 2µL de DNase e incubado por 1 hora a 37°C. Em seguida foi adicionado 2µL de Stop DNase, e incubado a 65° por 10 minutos para inibição da enzima DNase. O RNA foi levado imediatamente a temperatura de -80°C.

### **3.2.6.2 Obtenção de cDNA**

Foram preparados 2 Mix (Mix 1 e Mix 2). Para o Mix 1 foram utilizados 14µL de RNA (já aliquotado e tratado com DNase) 1µL de Random primer, 1µL de dNTP e 4µL de água nuclease free (kit de extração). Para o Mix 2 foram utilizados 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1M) e 1 µL de SuperScript III (200 U/µL). O Mix 1 foi levado ao termociclador a 65°C por 5 minutos. Em seguida foi retirado do termociclador e colocado imediatamente no gelo por aproximadamente 5 minutos. Logo em seguida foi adicionado o Mix 2 (volume de 6µL) e colocado a amostra novamente no termociclador, dando continuidade ao programa, com ciclos de 65°C

por 5 minutos; 25°C por 5 minutos; 50°C por 60 minutos; 70°C por 15 minutos e término a 20°C. Em seguida o cDNA foi congelado a -80°C.

### **3.2.6.3 PCR do cDNA**

A partir do cDNA obtido, foi realizada a reação de PCR para verificar a expressão dos genes de toxinas e biofilme utilizando os primers descritos na Tabela 1. Em seguida foi realizada a eletroforese para visualização dos produtos amplificados conforme descrito nos itens 2.4.3.

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Identificação**

Foram coletadas 473 amostras de leite de 242 animais das três rebanhos, dessas amostras, foram encontrados micro-organismos em 169 (35,7%) amostras, enquanto nas demais não houve isolamento microbiológico.

Das 169 amostras em que foram isolados micro-organismos, 132 (78,1%) foram identificados como pertencendo ao gênero *Staphylococcus*, sendo 20 (15,1%) amostras identificadas como *S. aureus* e as demais 112 (84,9%) como ECN. Das 112 amostras de ECN, 53 (47,3%) foram isoladas de casos de mastite subclínica, enquanto as demais 59 (52,7%) foram isoladas de animais saudáveis, estando apenas colonizando a mama do animal. Na tabela 2 se encontram as espécies de ECN isolados de amostras de leite de casos de mastite subclínica e colonização.

Tabela 2: Espécies de ECN isolados de amostras de leite ovino.

| <b>Espécies</b>        | <b>Mastite N(%)</b> | <b>Colonização N(%)</b> | <b>Total N(%)</b> |
|------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>S. simulans</i>     | 19 (58,0)           | 14 (42,0)               | 33 (29,4)         |
| <i>S. haemolyticus</i> | 11 (68,7)           | 5 (31,3)                | 16 (14,3)         |
| <i>S. warneri</i>      | 4 (30,8)            | 9 (69,2)                | 13 (11,6)         |
| <i>S. xylosus</i>      | 5 (38,5%)           | 8 (61,5%)               | 13 (11,6)         |
| <i>S. devriesei</i>    | 4 (33,3)            | 8 (66,7)                | 12 (10,7)         |
| <i>S. epidermidis</i>  | 1 (12,5)            | 7 (87,5)                | 8 (7,2)           |
| <i>S. chromogenes</i>  | 5 (62,5)            | 3 (37,5)                | 8 (7,1)           |
| <i>S. auricularis</i>  | 3 (50,0)            | 3 (50,0)                | 6 (5,4)           |
| <i>S. caprae</i>       | -                   | 1 (100,0)               | 1 (0,9)           |
| <i>S. arlettae</i>     | 1 (100,0)           | -                       | 1 (0,9)           |
| <i>S. hominis</i>      | -                   | 1 (100,0)               | 1 (0,9)           |
| <b>Total</b>           | <b>53</b>           | <b>59</b>               | <b>112 (100)</b>  |

### 3.3.2 Resistência antimicrobiana

Entre as 112 amostras de ECN isoladas, quatro (3,6%) foram positivas para o gene *mecA*, sendo dois *S. simulans*, um *S. epidermidis* e um *S. haemolyticus*. Das quatro amostras que carregaram o gene *mecA*, todas foram resistentes a oxacilina e a penicilina, entretanto as duas amostras de *S. simulans* foram sensíveis a cefoxitina. Nas tabelas 3 e 4 se encontram os perfis de suscetibilidade das 112 amostras de ECN frente a doze agentes antimicrobianos. Das 108 (96,4%) amostras que não apresentaram o gene *mecA*, 19 (17,6 %) apresentaram resistência à oxacilina e quatro à cefoxitina pelo método de disco difusão.

Os maiores percentuais de resistência foi frente à oxacilina, com 23 amostras resistentes, seguido por 19 resistentes a penicilina e 12 a tetraciclina. Todas as amostras foram sensíveis a vancomicina. Com relação as espécies de ECN, os maiores percentuais de resistência foram encontrados entre as amostras de *S. xylosus*, com 11 (84,6%) amostras resistentes a oxacilina, 6 (46,5%) a tetraciclina e 7 (53,8%) a penicilina, seguido por *S. epidermidis* com 5 (62,5%) amostras resistentes a penicilina.

Tabela 3: Perfil de sensibilidade antimicrobiana de ECN isolados de leite ovino

|              |          | <i>S. xyloso</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. simulans</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. auricularis</i> |
|--------------|----------|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
|              |          | N (%)            | N (%)                 | N (%)              | N (%)             | N (%)                  | N (%)                 |
| <b>Oxa</b>   | <b>R</b> | 11(84,6)         | 1(12,5)               | 2(6,0)             | 1(7,7)            | 3(18,7)                | 1 (6,7)               |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 2 (15,4)         | 7(87,5)               | 31(94,0)           | 12(92,3)          | 13(81,3)               | 5(83,3)               |
| <b>Cefo</b>  | <b>R</b> | -                | 1(12,5)               | 2(6,0)             | -                 | 1(6,2)                 | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 13 (100,0)       | 7(87,5)               | 31(94,0)           | 13(100,0)         | 15(93,8)               | 6(100,0)              |
| <b>Tet</b>   | <b>R</b> | 6(46,2)          | 1(12,5)               | 2(6,0)             | 1(7,7)            | 1(6,2)                 | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 7(53,8)          | 7(87,5)               | 31(94,0)           | 12(92,3)          | 15(93,8)               | 6(100,0)              |
| <b>Pen</b>   | <b>R</b> | 7(53,8)          | 5(62,5)               | 2(6,0)             | 1(7,7)            | 2(12,5)                | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 6(46,2)          | 3(37,5)               | 31(94,0)           | 12(92,3)          | 14(87,5)               | 6(100,0)              |
| <b>Gen</b>   | <b>R</b> | -                | 1(12,5)               | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 13(100,0)        | 7(87,5)               | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 16(100,0)              | 6(100,0)              |
| <b>Eri</b>   | <b>R</b> | -                | -                     | -                  | -                 | 1(6,2)                 | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 13(100,0)        | 8(100,0)              | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 15(93,8)               | 6(100,0)              |
| <b>Cip</b>   | <b>R</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 13(100,0)        | 8(100,0)              | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 16(100,0)              | 6(100,0)              |
| <b>Lin</b>   | <b>R</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 13(100,0)        | 8(100,0)              | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 16(100,0)              | 6(100,0)              |
| <b>Clin</b>  | <b>R</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>I</b> | 1(7,7)           | 1(12,5)               | -                  | -                 | 5(31,2)                | -                     |
|              | <b>S</b> | 12(92,3)         | 7(87,5)               | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 11(68,8)               | 6(100,0)              |
| <b>Cotri</b> | <b>R</b> | 1(7,7)           | 2(25,0)               | -                  | -                 | 1(6,2)                 | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 12(92,3)         | 6(75,0)               | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 15(93,8)               | 6(100,0)              |
| <b>Rif</b>   | <b>R</b> | -                | 1(7,7)                | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 13(100,0)        | 12(92,3)              | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 16(100,0)              | 6(100,0)              |
| <b>Van</b>   | <b>R</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>I</b> | -                | -                     | -                  | -                 | -                      | -                     |
|              | <b>S</b> | 13(100,0)        | 8(100,0)              | 33(100,0)          | 13(100,0)         | 16(100,0)              | 6(100,0)              |

R: resistente; I: sensibilidade intermediária; S: sensível; Oxa: oxacilina; Cefo: cefoxitina; Tet: tetraciclina; Pen: penicilina; Gen: gentamicina; Eri: eritromicina; Cip: ciprofloxacina; Lin: linezolida; Clin: clindamicina; Cotri: cotrimoxazol; Rif: rifampicina; Van: vancomicina.

Tabela 4: Perfil de sensibilidade antimicrobiana de ECN isolados de leite ovino

|              |          | <i>S. caprae</i> | <i>S. arlettae</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. chromogenes</i> | <i>S. devriesei</i> |
|--------------|----------|------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|
|              |          | N (%)            | N (%)              | N (%)             | N (%)                 | N (%)               |
| <b>Oxa</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | 3(37,5)               | 1(8,3)              |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 5(62,5)               | 11(91,7)            |
| <b>Cefo</b>  | <b>R</b> | -                | -                  | 1(100,0)          | -                     | 1(8,3)              |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | -                 | 8(100,0)              | 11(91,7)            |
| <b>Tet</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | 1(8,3)              |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 8(100,0)              | 11(91,7)            |
| <b>Pen</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | 1(100,0)          | 1(12,5)               | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | -                 | 7(87,5)               | 12(100,0)           |
| <b>Gen</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 8(100,0)              | 12(100,0)           |
| <b>Eri</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | 1(100,0)          | 1(12,5)               | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | -                 | 7(87,5)               | 12(100,0)           |
| <b>Cip</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | 1(8,3)              |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 8(100,0)              | 11(91,7)            |
| <b>Lin</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | 1(8,3)              |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 8(100,0)              | 11(91,7)            |
| <b>Clin</b>  | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 8(100,0)              | 12(100,0)           |
| <b>Cotri</b> | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | 1(100)            | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | -                 | 8(100,0)              | 12(100,0)           |
| <b>Rif</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 8(100,0)              | 12(100,0)           |
| <b>Van</b>   | <b>R</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>I</b> | -                | -                  | -                 | -                     | -                   |
|              | <b>S</b> | 1(100,0)         | 1(100,0)           | 1(100,0)          | 8(100,0)              | 12(100,0)           |

R: resistente; I: sensibilidade intermediária; S: sensível; Oxa: oxacilina; Cefo: cefoxitina; Tet: tetraciclina; Pen: penicilina; Gen: gentamicina; Eri: eritromicina; Cip: ciprofloxacina; Lin: linezolida; Clin: clindamicina; Cotri: cotrimoxazol; Rif: rifampicina; Van: vancomicina.

### 3.3.3 Pesquisas dos genes codificadores de toxinas por PCR e expressão por RT-PCR

A pesquisa dos genes para toxinas revelaram que das 112 amostras de ECN, 70 (62,5%) apresentaram algum gene codificador de toxina. Dos genes encontrados, *sea* foi o mais prevalente, estando presente de forma isolada ou concomitante em 56 (50,0%) amostras. O gene *seb* presente em 19 amostras (17,0 %) foi o segundo gene de toxina mais encontrado, seguido por *sec* em 15 amostras (13,4%). O gene *sed* codificador da enterotoxina D não foi encontrado em nenhuma das amostras.

O gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*), foi encontrado em apenas uma amostra da espécie *S. haemolyticus*. O gene da PVL (*luk-PV*), não foi encontrado em nenhuma das amostras. Na tabela 5 são apresentados os resultados da pesquisa dos genes de toxinas encontrados nas 112 amostras de ECN.

Quanto à avaliação da expressão dos genes de toxinas pela técnica de RT-PCR, nenhuma das amostras foi positiva para a expressão de genes de toxinas encontrados por PCR.

Tabela 5: Genes de toxinas encontrados em ECN isolados de leite ovino

| Espécies               | Nº de amostras | Nº de amostras com genes | Genes de toxinas |            |            |            |                |                |
|------------------------|----------------|--------------------------|------------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|
|                        |                |                          | <i>sea</i>       | <i>seb</i> | <i>sec</i> | <i>tst</i> | <i>sea/seb</i> | <i>sea/sec</i> |
| <i>S. simulans</i>     | 33             | 24                       | 11               | 1          | 5          | -          | 2              | 5              |
| <i>S. haemolyticus</i> | 16             | 10                       | 5                | 2          |            | 1          | 2              | -              |
| <i>S. warneri</i>      | 13             | 7                        | 3                | -          | 1          | -          | 3              | -              |
| <i>S. xylosus</i>      | 13             | 8                        | 6                | 1          | -          | -          | 1              | -              |
| <i>S. devriesei</i>    | 12             | 6                        | 5                | -          | -          | -          | -              | 1              |
| <i>S. epidermidis</i>  | 8              | 3                        | 3                | -          | -          | -          | -              | -              |
| <i>S. chromogenes</i>  | 8              | 4                        | -                | -          | 1          | -          | 1              | 2              |
| <i>S. auricularis</i>  | 6              | 6                        | 1                | 2          | -          | -          | 3              | -              |
| <i>S. caprae</i>       | 1              | 1                        | -                | -          | -          | -          | 1              | -              |
| <i>S. arlettae</i>     | 1              | 1                        | 1                | -          | -          | -          | -              | -              |
| <i>S. hominis</i>      | 1              | 0                        | -                | -          | -          | -          | -              | -              |
| <b>Total</b>           | 112            | 70                       | 35               | 6          | 7          | 1          | 13             | 8              |

*sea*, *seb*, *sec*, *tst*: genes das toxinas A, B, C e TSST-1.

### 3.3.4 Pesquisa dos genes do biofilme por PCR e expressão por RT-PCR

Das 112 amostras de ECN, em 56 (50,0%) foi encontrado algum gene do operon *icaADBC*, e em apenas duas (1,8%) amostras foi encontrado o operon completo, sendo as duas da espécie *S. epidermidis*.

Quanto aos outros genes envolvidos na formação de biofilme, *bap* foi encontrado em 16 (14,3%) amostras, sendo mais encontrado em *S. xylosus*. O gene *bhp* foi encontrado em três (2,7%) amostras de *S. epidermidis* e o gene *aap* foi encontrado em cinco (4,5%) amostras todas de *S. epidermidis*.

Nas tabelas 6 e 7 se encontram os resultados da pesquisas dos genes da formação de biofilme.

Tabela 6: Presença dos genes do operon *icaADBC* em ECN.

| Espécies               | Nº de amostras | Nº de amostras com | Genes do operon <i>icaADBC</i> |             |             |             |              |              |               |
|------------------------|----------------|--------------------|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
|                        |                |                    | Genes                          | <i>icaC</i> | <i>icaD</i> | <i>icaB</i> | <i>icaCD</i> | <i>icaCB</i> | <i>icaCDB</i> |
| <i>S. simulans</i>     | 33             | 21                 | 1                              | 9           | 1           | 7           | -            | 3            | -             |
| <i>S. haemolyticus</i> | 16             | 8                  | -                              | 1           | 2           | 2           | -            | 3            | -             |
| <i>S. warneri</i>      | 13             | 8                  | 2                              | 2           | 2           | 1           |              | 1            | -             |
| <i>S. xylosus</i>      | 13             | 3                  | -                              | 2           | -           | -           | -            | 1            | -             |
| <i>S. devriesei</i>    | 12             | 4                  | 3                              | 1           | -           | -           | -            | -            | -             |
| <i>S. epidermidis</i>  | 8              | 5                  | -                              | 1           | -           | -           | 1            | 1            | 2             |
| <i>S. chromogenes</i>  | 8              | 5                  | 2                              | 2           |             | 1           | -            | -            | -             |
| <i>S. auricularis</i>  | 6              | 0                  | -                              | -           | -           | -           | -            | -            | -             |
| <i>S. caprae</i>       | 1              | 1                  | -                              | 1           | -           | -           | -            | -            | -             |
| <i>S. arlettae</i>     | 1              | 0                  | -                              | -           | -           | -           | -            | -            | -             |
| <i>S. hominis</i>      | 1              | 1                  | -                              | -           | -           | 1           | -            | -            | -             |
| <b>Total</b>           | 112            | 56                 | 8                              | 19          | 5           | 12          | 1            | 9            | 2             |

Tabela 7: Presença dos genes *bap*, *bhp* e *aap* da formação de biofilme em ECN.

| Espécies               | Nº de amostras | Genes      |            |            |
|------------------------|----------------|------------|------------|------------|
|                        |                | <i>bap</i> | <i>bhp</i> | <i>Aap</i> |
| <i>S. simulans</i>     | 33             | 1          | -          | -          |
| <i>S. haemolyticus</i> | 16             | -          | -          | -          |
| <i>S. warneri</i>      | 13             | 1          | -          | -          |
| <i>S. xylosum</i>      | 13             | 9          | -          | -          |
| <i>S. devriesei</i>    | 12             | 3          | -          | -          |
| <i>S. epidermidis</i>  | 8              | -          | 3          | 5          |
| <i>S. chromogenes</i>  | 8              | 2          | -          | -          |
| <i>S. auricularis</i>  | 6              | -          | -          | -          |
| <i>S. caprae</i>       | 1              | -          | -          | -          |
| <i>S. arlettae</i>     | 1              | -          | -          | -          |
| <i>S. hominis</i>      | 1              | -          | -          | -          |
| <b>Total</b>           | 112            | 16         | 3          | 5          |

*bap*: gene da proteína associada a biofilme; *bhp*: gene da proteína homóloga de *bap*; *aap*: gene da proteína associada ao acúmulo.

Das 71 (63,3%) amostras que apresentaram genes da formação de biofilme, 13 (11,6%) expressou algum desses gene pela técnica de RT-PCR. As duas amostras de *S. epidermidis* que apresentaram o operon *icaADBC* completo expressaram os quatro genes do operon. As demais 54 amostras de ECN não expressaram nenhum dos genes do operon *ica*.

O gene *bap* foi expresso em oito amostras de ECN, sendo cinco amostras da espécie *S. xylosus*, dois *S. chromogenes* e um *S. devriesei*. A expressão do gene *bhp* não foi verificada em nenhuma das três amostras em que foi encontrado, porém a expressão do gene *aap* foi positiva em três amostras.

Na tabela 8 se encontram os resultados da avaliação da expressão dos genes de biofilme pela técnica de RT-PCR.

Tabela 8: Expressão dos genes de biofilme nas amostras de ECN.

| Gene/ Expressão          | PCR       | RT-PCR    |
|--------------------------|-----------|-----------|
|                          | N(%)      | N(%)      |
| <i>icaC</i> /            | 7 (6,25)  | -         |
| <i>icaD</i> /            | 16 (14,3) | -         |
| <i>icaB</i> /            | 3 (2,7)   | -         |
| <i>icaCD</i> /           | 12 (10,7) | -         |
| <i>icaCB</i> /           | 1 (0,9)   | -         |
| <i>icaCDB</i> /          | 7 (6,25)  | -         |
| <i>icaADBC</i> /ADBC     | 2 (1,8)   | 2 (1,8)   |
| <i>bap</i> /Bap          | 12 (10,5) | 7 (6,25)  |
| <i>aap</i> /Aap          | 2 (1,8)   | 1 (0,9)   |
| <i>bap+icaC</i> /        | 1 (0,9)   | -         |
| <i>icaCDB+bap</i> /      | 1 (0,9)   | -         |
| <i>icaD+bap</i> /Bap     | 2 (1,8)   | 1 (0,9)   |
| <i>icaCDB+bhp+aap</i> /  | 1 (0,9)   |           |
| <i>icaB+bhp+aap</i> /Aap | 1 (0,9)   | 1 (0,9)   |
| <i>bhp+aap</i> /         | 1 (0,9)   | -         |
| <i>icaD+aap</i> /Aap     | 1 (0,9)   | 1 (0,9)   |
| <i>icaB+aap</i> /        | 1 (0,9)   | -         |
| <b>Total</b>             | 71 (63,3) | 13 (11,6) |

*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *bhp*, *aap*: presença dos genes de biofilme; ADBC, Bap, Aap: expressão dos genes de biofilme.

A tabela 9 apresenta os resultados dos fatores de virulência das diferentes espécies de ECN isolados de casos de mastite subclínica e colonização. Os genes de toxinas foram mais encontrados em amostras de ECN isolados de colonização (38 amostras), enquanto

que o gene da formação de biofilme foi mais encontrado em amostras de casos de mastite subclínica (38 amostras), entretanto, a expressão dos genes de biofilme por RT-PCR ocorreu mais em amostras isoladas de colonização (nove amostras).

Tabela: 9: Fatores de virulência das diferentes espécies de ECN isolados de casos de mastite subclínica e colonização.

| Espécies               | Total de amostras N(%) | Mastite |          |                    | Colonização |          |                    |
|------------------------|------------------------|---------|----------|--------------------|-------------|----------|--------------------|
|                        |                        | Genes   |          | Expressão biofilme | Genes       |          | Expressão biofilme |
|                        |                        | Toxina  | Biofilme |                    | Toxina      | Biofilme |                    |
| <i>S. simulans</i>     | 33 (29,4)              | 12      | 15       | 0                  | 12          | 7        | 0                  |
| <i>S. haemolyticus</i> | 16 (14,3)              | 7       | 6        | 0                  | 3           | 2        | 0                  |
| <i>S. warneri</i>      | 13 (11,6)              | 1       | 4        | 0                  | 6           | 4        | 0                  |
| <i>S. xylosus</i>      | 13 (11,6)              | 3       | 5        | 2                  | 5           | 5        | 3                  |
| <i>S. devriesei</i>    | 12 (10,7)              | 1       | 2        | 0                  | 5           | 4        | 1                  |
| <i>S. epidemidis</i>   | 8 (7,2)                | 1       | 1        | 1                  | 2           | 7        | 4                  |
| <i>S. chromogenes</i>  | 8 (7,1)                | 3       | 5        | 1                  | 1           | 2        | 1                  |
| <i>S. auricularis</i>  | 6 (5,4)                | 3       | 0        | 0                  | 3           | 0        | 0                  |
| <i>S. caprae</i>       | 1 (0,9)                | -       | -        | -                  | 1           | 1        | 0                  |
| <i>S. arlettae</i>     | 1 (0,9)                | 1       | 0        | 0                  | -           | -        | -                  |
| <i>S. hominis</i>      | 1 (0,9)                | -       | -        | -                  | 0           | 1        | 0                  |
| <b>Total</b>           | 112 (100)              | 32      | 38       | 4                  | 38          | 33       | 9                  |

### 3.4 Discussão

Bactérias do gênero *Staphylococcus* foram os micro-organismos mais isolados nas amostras de leite, sendo encontrado em 132 (78,1%) amostras dos quais 20 eram *S. aureus* e 112 eram ECN.

Dentre os *Staphylococcus* spp. que causam a mastite, os que apresentam maior frequência de isolamento nos casos de mastite subclínica ovina são os ECN (Coutinho et al., 2006; Blagitz et al., 2008), o que foi observado no presente trabalho. ECN é composto por uma grande diversidade de espécies. No diagnóstico da mastite os ECN normalmente não são identificados no nível de espécie, mas são todos agrupados em um único grupo. Nos estudos em que os ECN são identificados, a identificação das espécies geralmente é realizada por métodos fenotípicos, entretanto, estudos que comparam a identificação fenotípica e genotípica dos ECN mostram que muitas vezes os resultados não se correlacionam (Taponen et al., 2006). De maneira geral, os métodos genotípicos têm maior poder discriminatório das espécies que os métodos fenotípicos (Zadooks e Watts, 2009). No presente trabalho, apenas 31 (27,7%) amostras que puderam ser identificadas pelo método bioquímico simplificado apresentaram concordância com os resultados da identificação genotípica pela técnica de *rpoB*. Esses resultados podem ser explicados pelo perfil diferente de espécies de ECN encontradas em humanos e animais, já que a maioria das provas e chaves encontradas na literatura para identificação desses micro-organismos se baseia nas espécies mais frequentes em humanos, mostrando a importância do desenvolvimento de testes bioquímicos e uma chave específica para ECN isolados de animais.

De acordo com Bergonier et al (2003), *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. crhomogenes* e *S. simulans* são as espécies de ECN mais frequentemente isoladas de casos de mastite em

ovinos. Nos resultados obtidos por método genotípico (*rpoB*), as espécies de ECN mais prevalentes foram *S. simulans* com 33 (29,4%), seguido por *S. haemolyticus* com 16 (14,3%), *S. warneri* e *S. xylosus* com 13 (11,6%) de cada espécie e *S. devriesei* com 12 (10,7%).

É importante destacar a presença de *S. devriesei*, espécie recentemente descrita por Supré et al. (2010) encontrada em nove amostras isoladas dos tetos de vacas e uma amostra isolada de leite bovino. Esse é o primeiro relato do isolamento dessa espécie em leite de ovelhas, sendo uma das mais encontradas, presente em 12 (10,7%) amostras, sendo quatro associadas com mastite.

O controle da mastite causada por ECN é dificultado pelo fato de ECN ser composto por um grande número de diferentes espécies, mas que são tratados da mesma forma. Ocorre que cada espécie possui características próprias, sendo algumas espécies mais virulentas que outras, ou que podem apresentar características clínicas diferentes (Taponen, Pyorala, 2009), o que torna importante a identificação correta das espécies de ECN.

O tratamento da mastite infecciosa é realizado com diferentes antimicrobianos (Naccari et al., 2003). As infecções causadas por *Staphylococcus* spp. são difíceis de serem combatidas quando muitas das amostras são resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento (Bochniarz e Wawron, 2011). O uso constante de antibióticos beta-lactâmicos, tem selecionado cepas resistentes a penicilina, ampicilina e amoxicilina (Moon et al., 2007). Além disso, *Staphylococcus* resistentes a meticilina podem também ser resistentes a outras classes de drogas. No presente trabalho, o gene *mecA* foi encontrado em quatro (3,6%) amostras de ECN, sendo que todas foram resistentes a oxacilina e a penicilina, entretanto as duas amostras de *S. simulans* foram sensíveis a

cefoxitina. A cepa de *S. epidermidis* foi ainda resistente a tetraciclina, gentamicina, cotrimoxazol e rifampicina, e a cepa de *S. haemolyticus* foi resistente também a eritromicina e cotrimoxazol.

A maior parte das amostras foi sensível a maioria das drogas testadas. Os maiores percentuais de resistência foram frente à oxacilina (20,5%), penicilina (17,0%) e tetraciclina (10,7%). Todas as amostras de ECN foram sensíveis a vancomicina, incluindo as portadoras do gene *mecA*, o que foi diferente do observado por Bochniarz e Wawron (2011), no qual a vancomicina foi efetiva contra 83,8% das amostras de ECN negativas para o gene *mecA* e 75,0% das amostras positivas para o gene.

Das 23 amostras resistentes ao disco de oxacilina, quatro apresentaram o gene *mecA*, sendo que das amostras *mecA* positivas, duas foram sensíveis a cefoxitina o que mostra a importância do uso dos dois discos (oxacilina e cefoxitina) para confirmação da resistência à oxacilina, principalmente a resistência mediada pelo gene *mecA*, que está relacionada com heteroresistência e portanto a dificuldade da detecção dessa resistência por métodos de disco difusão e outros métodos fenotípicos, sendo a pesquisa do gene *mecA* o método padrão ouro (CLSI, 2011).

Os resultados também mostraram amostras resistentes a oxacilina e a cefoxitina que não carregaram o gene *mecA*. Das 19 amostras resistentes a oxacilina *mecA* negativas, oito foram também resistente a penicilina, o que sugere que para essas amostras a resistência a oxacilina pode ser mediada pela hiperprodução de beta-lactamase (Gerh et al., 1994). Nas demais amostras sensíveis a penicilina, a resistência a oxacilina pode ser justificada pela presença do gene *mecA* homólogo encontrada em amostras de estafilococos e outras espécies filogeneticamente relacionadas (Ito et al., 2012) ou outros mecanismos que precisam ser elucidados.

Além da resistência antimicrobiana, os ECN também são capazes de produzir toxinas patogênicas para os seres humanos e para os animais. Nos últimos anos com o avanço de novas metodologias para a classificação e identificação desses micro-organismos tem permitido aos pesquisadores se interarem das diferentes espécies de ECN e pesquisas tem comprovado que algumas espécies de ECN podem ser potencialmente patogênicas para o ser humano e animais pela produção de fatores de virulência antes descritos somente em *S. aureus* (Baladan e Rasooly, 2001). No presente trabalho 70 (62,5%) amostras apresentaram algum gene para toxina, o que demonstra o potencial toxigênico dessas amostras, entretanto, nenhuma expressou esses genes de toxinas pela técnica de RT-PCR. Vários estudos descrevem sistemas regulatórios estafilocócicos, tais como o sistema Agr (Gene Regulador Acessório) que pode afetar diretamente na produção das enterotoxinas estafilocócicas. O exato mecanismo pelo qual esses sistemas são ativados ou inibidos ainda não está bem esclarecido. A presença de um *locus agr* em espécies de *S. epidermidis* deixa evidente que o sistema está atuando e não exclui a possibilidade de produção de enterotoxinas em algum momento (Wamel et al. 1998).

Apesar dos resultados obtidos, outros autores já relataram a expressão de toxinas por ECN por métodos fenotípicos ou genotípicos; Vernozy-Rosand et al., (1996), encontraram onze cepas de ECN produtores de enterotoxinas isolados de amostras de leite cru e queijo de cabra. As amostras toxigênicas encontradas pertenciam às espécies *S. simulans*, *S. equorum*, *S. capitis*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, e *S. xylosus*. Valle et al., (1991) em estudo com cabras saudáveis, relataram o isolamento de ECN isolados de diferentes partes anatômicas e também do leite, sendo 45 amostras produtoras da toxina da síndrome do choque-tóxico (TSST-1). Mariano et al (2007) encontraram diversas espécies de ECN isolados de leite de cabra (*S. capitis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. warneri*, *S. epidermidis*)

produtores das enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED. Order et al (1992) observaram a produção de TSST-1 por 3 amostras de ECN isoladas de casos de mastite ovina, sendo duas cepas da espécie *S. xylosus* e uma de *S. epidermidis*. Vasconcelos et al (2011) ao avaliarem a presença e expressão por RT-PCR dos genes SEE, SEG, SEH em 90 amostras de ECN isoladas de humanos, encontraram um ou mais genes em 29 ECN e a expressão verificada em 10 amostras.

O gene da toxina PVL não foi encontrado em nenhuma das amostras de ECN, a ocorrência de ECN que carregam o gene *luk-PV* ainda é pouco investigada tanto em amostras de origem humana quanto animal, entretanto, Unal e Çinar (2012) ao analisarem a presença do gene *luk-PV* em 121 amostras de ECN isoladas de ovelhas e vacas com mastite subclínica (81 vacas e 40 ovelhas), encontraram o gene em cinco amostras (três isolados de vaca e dois isolados de ovelhas), sendo três pertencentes à espécie *S. simulans*, um *S. haemolyticus* e um *S. warneri*.

A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência em ECN. Durante a infecção intramamária, aglomerados de bactérias podem se desenvolver dentro do úbere, e o biofilme facilita a adesão e colonização do epitélio da glândula mamária (Oliveira et al., 2011). Em estafilococos, o polissacarídeo denominado Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA) é responsável pela adesão entre as células, e sua síntese é controlada pelo produto do gene *ica* (Intercelular adhesion) que corresponde a quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* que estão organizados em um operon (Gotz, 2002; Arciola et al., 2001). No presente trabalho, o operon completo foi encontrado em apenas duas amostras de *S. epidermidis*, que também foram as únicas amostras que expressaram os genes do operon *ica*. As demais amostras que apresentaram algum dos genes do operon não expressaram. Alguns estudos demonstraram que os genes *icaA* e *icaD* são genes importantes na formação de biofilme em estafilococos (Arciola et al.,

2001), o que pode explicar porque as demais amostras não expressaram os genes do operon, pois o gene *icaA* foi encontrado apenas nas duas amostras que expressaram.

Além do polissacarídeo PIA, proteínas também estão envolvidas na produção de biofilmes, como é o caso da proteína Bap, Bhp e Aap. Os resultados obtidos mostram que biofilme de origem protéica é o mais importante na formação de biofilme em ECN isolados de leite ovino, principalmente o gene *bap* que codifica uma proteína envolvida tanto na adesão primária do micro-organismo na superfície como na adesão entre as células para formação de um biofilme maduro (Latasa et al., 2006), e que foi encontrado nesse estudo em 16 amostras de ECN e expresso por oito amostras. A proteína Bap é encontrada em poucas amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina (Cucarella et al 2001), mas também tem sido encontrada em outras espécies de estafilococos incluindo *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hyicus* (Tormo et al., 2005).

Além de Bap, outras proteínas envolvidas na formação de biofilme foram investigadas. A proteína Bhp e Aap foi encontrada em amostras de *S. epidermidis*. O gene *bhp* foi encontradas em três amostras, mas sem expressão, e *aap* em cinco e expressão por três ECN. Embora os genes *bhp* e *aap* tenham sido pesquisados e encontrados em ECN isolados de amostras clínicas humanas (Qin et al., 2007, Vandecasteele et al., 2003), esse é o primeiro relato do isolamento desses genes em espécies de ECN isoladas de leite ovino.

### 3.5 Conclusão

Os ECN foram os micro-organismos mais isolados em amostras de leite ovino, sendo *S. simulans* a espécie mais encontrada. Diferentes espécies de ECN foram encontradas

no leite ovino, incluindo o primeiro relato de *S. devriesei* em ovinos, o que mostra a importância da identificação de espécies de ECN, já que cada espécie pode apresentar características de virulência e resistência diferentes, e dessa forma, a identificação pode orientar quanto a etiologia mais frequente e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cada espécie, possibilitando o tratamento adequado da mastite. As amostras foram sensíveis a maioria dos agentes antimicrobianos testados, sendo que as amostras mais resistentes foram as que apresentaram o gene *mecA*. Algumas espécies de ECN, principalmente *S. xylosus* revelaram outro mecanismo de resistência à oxacilina que precisa ser investigado. Quanto aos fatores de virulência, as amostras de ECN apresentaram potencial toxigênico, com 62,5% das amostras positivas para algum gene de toxina, embora não tenham expressado esses genes quando pesquisados pela técnica de RT-PCR. A expressão mais frequente do gene *bap* relacionado com a formação de biofilme sugere a importância dessa proteína na formação de biofilme nos ECN isolados de ovinos.

### 3.6 Referências Bibliográficas

- Aguilar, B., Amorena, B., Iturralde, M. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol.* 78, 183-191.
- Arciola, C.R., Gamberini, S., Campoccia, D., Visai, L., Speziale, P., Baldassarri, L., Montanaro, L. 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A.* 75, 408-413.
- Arciola, C.R., Baldassari, L., Montanaro, L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strain from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 39, 2151-56.
- Balaban, N., Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 61, 1-10.

Baladan, N., Rasooly, A. 2001. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. *Int J Food Microbiol.* 64, 33-40.

Bergonier, D., Berthelot, X. 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *LIVEST PROD SCI.* 79, 1-16.

Bergonier, D., Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res*, 2003; 34:689-716.

Blagit, M.G., Batista, C.F., Souza, F.N., Benites, N.R., Melville, P.A., Stricagnolo, C.R., Ricciardi, M., Gomes, V., Azevedo, M.R., Sanches, B.G.S., Della Libera, A.M.M.P. 2008. Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. *Pesq Vet Bras.* 28, 417-422.

Bochniarz, M., Wawron, W. 2011. Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Pol J Vet Sci.* 14, 405-410.

Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J., Gonzalo, C. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Res*, 2007; 68:145-153.

Coutinho, D.A., Costa, J.N., Ribeiro, M.G., Torres, J.A. 2006. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. *RBSPA.* 7, 139-151.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183, 2888-2896.

Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schlitz, F.J., Smayevsky, J., Jones, R.N., Beach, M. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 32, 114-132.

Ebrahimi, A., Lotfalian, S., Karimi, S. 2007. Drug resistance in isolated bacteria from milk of sheep and goats with subclinical mastitis in Shahrekord district. *Iran J Vet Res.* 8, 76-79.

Fagundes, H., Oliveira, C.A.F. 2004. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural.* 34, 1315-132.

Fox, L.K., Zadoks, R.N., Gaskins, C.T. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol.* 107, 295-299.

Fthenakis, G.C., Jones, J.E. 1990. The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. *Br. Vet. J.* 146, 43-49.

Geha, D.J., Uhl, J.R., Gustafiero, C.A., Persing, D.H. 1994. Multiplex PCR for identification of Methicillin-Resistant Staphylococci in the Clinical Laboratory. J Clin Microbiol. 32, 1768-1772.

Gonzalo, C., Tardáguila, J.A, De La Fuente, L.F., San Primitivo, F. 2004. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. J Dairy Res. 71, 33-38.

Gotz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol. 43, 1367-1378, 2002.

Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M.T.G, Coleman, D.C., Goering, R., Giffard, P.M., Skovi, R.L., Zhang, K., Westh, H, O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vrava, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B, Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John Jr, J.F., Daum, R., Soderquist, B, Buist, G. Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. 2012. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 4997-4999.

Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E, Pollard, D.R., Rozee, K.R.1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 29, 426-430.

Latasa, C., Solano, C., Penadés, J.R., Lasa, I. 2006. Biofilm-associated proteins. C R Biologies. 329, 849-857.

Leitner, G., Chaffer, M., Caraso, Y., Ezra, E., Kababea, D., Winkler, M., Glickman, A., Saran, A. 2003. Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition - fat, protein and lactose - in Israeli-Assaf and Awassi sheep. Small Ruminant Res. 49, 157-164.

Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J. 1999. Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 29, 1128-1132.

Mariano, F.A., Folly, M.M., Teixeira, G.N., Carmo, L., Vieira-da-Motta, O. 2007. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. Rev Bras Ciênc Vet., 14, 105-110.

Mellmann, A., Becker, K., Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P., Harmsen, D. 2006. Sequencing and staphylococci identification. Emerg Infect Dis. 12, 333-336.

Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y.H., Park, Y.H., Joo, Y.S., Koo, H.C. 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. J. Dairy Sci. 90, 1176-1185.

- Murakami, K., Minamide, K., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S. 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 29, 2240-2244.
- Naccari, F., Martino, D., Giofrè, F., Passantino, A., De Montis, P. 2003. Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. *Small Ruminant Res.* 47, 1-9.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Vilela, C.L. 2011. Invasive potential of biofilm-forming staphylococci bovine subclinical mastitis isolates. *J Vet Sci.* 12, 95-97.
- Orden, J.A., Cid, D., Blanco, M.E., Ruiz Santa Quiteria, J.A., Gómez-Lucia, E., De la Fuente, R. 1992. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-one production by staphylococci isolated from mastitis in sheep. *APMIS.* 100, 132-134.
- Qin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S., Qu, D. 2007. Formation and properties of in vitro biofilms of icanegative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 56, 83-93.
- Santos, R.A., Mendonça, C.L., Afonso, J.A.B., Simão, L.C.V. 2007. Aspéctos clínicos e características do leite de ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Pesq Vet Bras.* 27, 6-12.
- Stewart, P.S. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 40, 2517-2522.
- Supré, K., De Vliegher, S., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Van Trappen, S., Piepers, S., Sampimon, O.C., Zadoks, R.N., De Vos, P., Haesebrouck, F. 2010. *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60, 2739-2744.
- Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H.D., Pyörälä, S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol.* 115, 199-207.
- Taponen, S., Pyorala, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol.* 134, 29-36.
- Tormo, A.M., Martí, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., Penadés, J.R. 2005. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J. Bacteriol.* 187, 2348-2356.
- Unal, N., Çinar, O.D. 2012. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 369-375.

- Valle, J., Vadillo, S., Piriz, S., Gomez-Lucia, E. 1991. Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum and milk. *Appl Environ Microbiol.* 57, 889–891.
- Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., Van, E.J. 2003. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *J Infect Dis.* 188, 730-37.
- Vasconcelos, N.G., Cunha, M.L.R.S. 2010. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *J Public Health Epidemiol.* 2, 29-42.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Prevost, G., Lapeyre, C., Bes, M., Brun, Y., Fleurette, J. 1996. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats and cheese. *Int J Food Microbiol.* 30, 271-280.
- Wamel, W.J.B., Rossum G., Verhoef, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Fluit, A.C. 1998. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)- like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol.* 163, 1-9
- Zadoks, R.N., Watts, J.F. 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Vet Microbiol.* 134, 20-28.