

RAPHAEL CONTELLI KLEIN

**EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*  
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA EM RESPOSTA A CONCENTRAÇÕES  
SUBINIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2010

RAPHAEL CONTELLI KLEIN

**EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*  
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA EM RESPOSTA A CONCENTRAÇÕES  
SUBINIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2010

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Mara Soares Bazzolli  
(Co-orientadora)

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito  
(Co-orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Poliane Alfenas Zerbini

---

Prof<sup>a</sup>. Juliana Lopes Rangel Fietto

---

Prof<sup>a</sup>. Andréa de Oliveira Barros Ribon  
(Orientadora)

*“Aprender é a única coisa  
de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende”*

Leonardo da Vinci

*A Deus,  
Aos meus pais, Urânia e Gervásio  
A meus avós Solange e Antônio  
A minha noiva Mary Hellen  
A minha irmã Thiara*

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus pelo dom da vida e por estar sempre presente em minha vida, iluminando meu caminho e me dando saúde, fé e força de vontade para seguir em frente.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e dedicação incondicionais e por estarem sempre torcendo por mim e fazendo de tudo para que meus sonhos pudessem se realizar.

Ao meu amado avô, Contelli, e minha amada avó, Solange, que me deram amor, carinho, atenção e apoio durante toda minha vida.

A minha noiva Mary Hellen, pelo amor, paciência, atenção, carinho e pela eterna disposição em me ajudar e apoiar em todos os momentos.

A minha irmã e Antônio, pela amizade, companheirismo e apoio.

A todos os meus familiares, principalmente meus tios Daniela e Maurício, e minhas primas, Ana Paula e Catarina, pelo amor, apoio e incentivo.

A família de Mary Hellen pelo carinho e, mesmo de longe, sempre torcerem por mim.

A minha orientadora, professora Andréa de Oliveira Barros Ribon, por ter me aceito e me conduzir durante esses dois anos com muita competência, dedicação, paciência e pelo imenso apoio.

Ao super casal Luciano e Juliana, por serem pessoas amáveis, por nos transmitirem paz e sabedoria e estarem sempre disponíveis para nos ajudarem em todas as situações, e aos seus filhos, Matheus e Rafinha, por nos trazerem momentos de felicidades.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos trabalhos prestados.

A Universidade Federal de Viçosa, por ter oferecido toda a estrutura necessária e pelo seu belo *campus* que serve de inspiração para trabalhar, mesmo nos finais de semana e feriados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de crescimento, realização profissional e aprendizado durante o desenvolvimento deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida V. Paiva Brito, pela disposição e apoio nos experimentos de microbiologia, por ceder os isolados utilizados neste trabalho e pela participação na banca examinadora proporcionando discussões que enriqueceram muito esta dissertação.

A professora Denise Mara Soares Bazzolli, pela preocupação, disposição e co-orientação deste trabalho e pela participação na banca examinadora com sugestões que servirão para o crescimento desta pesquisa.

A professora Poliane Alfenas Zerbini, pela receptividade, ajuda, conselhos e pela participação na banca examinadora com muito empenho e dedicação.

A minha amiga Pricila, pelo imenso apoio na realização dos experimentos de PCR em tempo real e seu pai, o grande “Seu Afonso”, por estar sempre disposto a ajudar.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular, em especial a Ancély e Marina, que são dois amores de pessoa, e ao Carlos por estar sempre disposto a ajudar, ser atencioso e prestativo.

A Livia e Gustavo, pelo apoio nos momentos de dificuldade.

A Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, por sua gestão neste programa, inteligência e por ser um exemplo de pesquisadora a ser seguido.

A chefe do departamento, Prof<sup>a</sup>. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, e todos os demais professores pela disponibilização de equipamentos, apoio e momentos de sabedoria.

Ao secretário da pós-graduação, Eduardo, por sua competência, agilidade, paciência, atendendo a todos os alunos com muito bom humor e por ser nosso guia nesses dois anos.

A minhas queridas vizinhas que estão sempre presentes no dia a dia trazendo carinho e atenção.

Aos meus amigos Luís Eugênio e Guilherme, pela amizade e apoio em todos os momentos.

A todos meus amigos, Arthur, André, Paulo, Diógenes, Pedro, Murilo, que de perto ou de longe torceram para que este trabalho fosse concluído.

A todos os colegas do curso de bacharelado em bioquímica que contribuíram nos momentos de estudos e de diversão.

As grandes amigas de quatro patas Lola, Lilu e Luli, pelos momentos de felicidades.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Raphael Contelli Klein, filho de Gervásio Klein e Urânia Contelli Klein, nasceu em 14 de novembro de 1983, em Eunápolis, Bahia.

Em fevereiro de 1999 foi aceito no Centro Federal de Educação Tecnológica (CEFET) de Eunápolis, onde concluiu o ensino médio em dezembro de 2001.

Em março de 2003, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso de Bacharelado em Bioquímica em janeiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em 23 de fevereiro de 2010.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO APÊNDICE.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Mastite Bovina.....	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
2.3. Tratamento da mastite bovina.....	9
2.4. Concentrações subinibitórias de antimicrobianos.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo Geral.....	13
3.2. Objetivos Específicos.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo.....	14
4.2. Extração do DNA genômico.....	14
4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	14
4.4. Diversidade genética dos isolados.....	15
4.5. Antibióticos.....	16
4.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	16
4.7. Curvas de crescimento.....	17
4.8. Extração de RNA total.....	18
4.9. Síntese de cDNA.....	18
4.10. Quantificação dos transcritos por RT-PCR em tempo real.....	19
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
APÊNDICE.....	53

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de agr	8
<b>Figura 2.</b> Avaliação da presença do gene <i>clfB</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	21
<b>Figura 3.</b> Avaliação do padrão de bandas de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> por meio da reação em cadeia da polimerase multiplex em gel de agarose 2 %.	22
<b>Figura 4.</b> Dendograma obtido da análise de agrupamento pelo programa GENES utilizando DICE como índice de dissimilaridade.	24
<b>Figura 5.</b> Curvas de crescimento obtidas para os isolados 4006 (A, B, C, D) e 4125 (E, F, G, H), quando crescidos na presença de diferentes concentrações dos antibióticos ampicilina (AMP), oxacilina (OXA), tilosina (TIL) e gentamicina (GEN).	25
<b>Figura 6.</b> Expressão relativa de genes de <i>Staphylococcus aureus</i> 4006 quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.	28
<b>Figura 7.</b> Expressão relativa de genes de <i>Staphylococcus aureus</i> 4125 quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.	29
<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos empregados para reação em cadeia da polimerase utilizados neste estudo.	15
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR em tempo real.	20
<b>Tabela 3.</b> Prevalência das proteínas de superfície entre as bactérias estudadas.	22
<b>Tabela 4.</b> Valores da Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de diferentes antibióticos para <i>Staphylococcus aureus</i> 4006 e 4125.	23
<b>Tabela 4.</b> Valores médios de Ct para os genes normalizadores <i>16S rRNA</i> e <i>gyrB</i> .	26

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO APÊNDICE

<b>Figura 1A.</b> Avaliação da presença do gene <i>clfB</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	53
<b>Figura 2A.</b> Avaliação da presença do gene <i>cna</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	54
<b>Figura 3A.</b> Avaliação da presença do gene <i>clfB</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	55
<b>Figura 4A.</b> Avaliação da presença do gene <i>fnBP</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	56
<b>Figura 5A.</b> Avaliação da presença do gene <i>spA</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	57
<b>Figura 6A.</b> Avaliação da presença do gene <i>sspA</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	58
<b>Figura 7A.</b> Avaliação da presença do gene <i>sdrCDE</i> em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%.	59
<b>Figura 8A:</b> Curvas de <i>melting</i> para os genes avaliados por RT-PCR em tempo real.	60
<b>Figura 9A.</b> Eficiência (E) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica por PCR em tempo real.	62
<b>Figura 10A.</b> Expressão relativa de genes de <i>Staphylococcus aureus</i> 4006 (repetição biológica B) quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.	63
<b>Figura 11A</b> Expressão relativa de genes de <i>Staphylococcus aureus</i> 4125 (repetição biológica B) quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP - Ampicilina

BHI - Infusão cérebro-coração

CCS - Contagem de células somáticas

CIM - Concentração inibitória mínima

ClfA - Fator de agregação plaquetária A

ClfB- - Fator de agregação plaquetária B

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Cna - Proteína de ligação ao colágeno

Ct - *Cycle threshold*

D.O - Densidade ótica

DNA - Ácido desoxirribonucleotídeo

dNTP - Desorribonucleotídeo trifosfatado

E - Eficiência

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FnBP - Proteína de ligação à fibronectina

g – Gramas

GEN - Gentamicina

h – Hora

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística

L – Litro

LB - Luria-Bertani

m – Mili

M – Molar

μ - Micro

min - Minuto

MLVA - *Multi-locus VNTR analysis*

MLVF - *Multi-locus VNTR fingerprinting*

MSCRAMMs - *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

°C - Graus Celsius

OXA - Oxacilina

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PFGE - *Pulsed-field gel electrophoresis*  
PIA - Polissacarídeo de adesão intercelular  
RNA - Ácido ribonucleotídeo  
rRNA - Ácido ribonucleotídeo ribossomal  
RT-PCR - *Reverse transcription-polymerase chain reaction*  
*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*  
*S. epidermidis* - *Staphylococcus epidermidis*  
*sdrCDE* - Proteínas de ligação ao fibrinogênio  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
seg - Segundos  
Spa - Proteína estafilocócica A  
*sspA* - Serino protease V8  
*Strep. agalactiae* - *Streptococcus agalactiae*  
*Strep. uberis* - *Streptococcus uberis*  
Sub-CIM - Concentrações subinibitórias  
TIL - Tilosina  
U - Unidade  
UFC - Unidades formadoras de colônia  
VNTR - *variable numbers of tandem repeat*

## RESUMO

KLEIN, Raphael Contelli, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010.

**Expressão de genes de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina em resposta a concentrações subinibitórias de antimicrobianos.**

Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-orientadores: Denise Mara Soares Bazzolli, Luciano Gomes Fietto e Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito.

*Staphylococcus aureus* é um dos principais micro-organismos causadores da mastite bovina, doença que provoca as maiores perdas na pecuária leiteira mundial. Este patógeno possui diversos fatores de virulência que contribuem para a grande diversidade genética observada entre isolados e auxiliam no estabelecimento das infecções. Nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado que o uso de antibióticos em concentrações subinibitórias modula a expressão gênica influenciando a virulência de patógenos bacterianos. Este trabalho teve por objetivo investigar o efeito de concentrações subinibitórias de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina, antibióticos usados em formulações veterinárias para o tratamento da mastite, na expressão de genes de duas cepas de *S. aureus* de origem bovina. Inicialmente, foi realizada uma investigação da presença de genes que codificam alguns fatores de virulência em 85 bactérias isoladas de animais com manifestação de mastite bovina. Os genes *clfB* e *sdr* foram os mais prevalentes, sendo detectados em 83,5% e 75,3% dos isolados, respectivamente. A diversidade genética dos isolados, avaliada por PCR *multiplex*, também foi alta e permitiu a discriminação de mais de 60 grupos. Esses resultados nortearam a escolha de *S. aureus* 4006 e 4125, com dissimilaridade genética de 80%, para os ensaios posteriores. RNA total das duas culturas crescidas em valores equivalentes a 0,5X, 0,25X e 0,125X da concentração inibitória mínima definida para cada antibiótico foi extraído e usado em análises de RT-PCR em tempo real. A expressão dos genes *spa*, *clfB*, *sdrC*, *fnBP*, *icaD*, *icaR*, *murF* e *sarA* foi normalizada para o gene *gyrB*. Todos os antibióticos testados causaram alteração na expressão dos genes avaliados. Um mesmo antibiótico usado em diferentes doses, assim como diferentes antibióticos em dose similar, modulou diferencialmente a expressão dos genes. Para o isolado 4006, a proteína regulatória SarA, que regula a transcrição de vários fatores de virulência, foi muito expressa em vários tratamentos. Já para o isolado 4125, o regulador *icaD* foi positivamente influenciado, quando diferentes condições foram testadas. Em suma, os dados confirmam que genes de *S. aureus* se expressam de

forma diferenciada em resposta a concentrações de antibióticos abaixo das consideradas inibitórias e que a variação existente entre cepas de *S. aureus* dificulta que um padrão de expressão seja estendido a toda espécie.

## ABSTRACT

KLEIN, Raphael Contelli, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2010.  
**Gene expression of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in response to subinhibitory concentrations of antibiotics.** Adviser: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-Advisers: Denise Mara Soares Bazzolli, Luciano Gomes Fietto and Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito.

*Staphylococcus aureus* is one of the main micro-organisms causing bovine mastitis, a disease that causes the greatest losses in dairy farming worldwide. This pathogen has several virulence factors that contribute to the great genetic diversity observed among isolates and assist in the establishment of infections. In recent years, several studies have shown that the use of antibiotics in subinhibitory concentrations modulates gene expression, influencing the virulence of bacterial pathogens. This study aimed to investigate the effect of subinhibitory concentrations of ampicillin, gentamicin, oxacillin and tylosin, antibiotics used in veterinary formulations for the treatment of mastitis, in the expression of genes from two strains of *S. aureus* of bovine origin. Initially, we conducted a preliminary investigation of the presence of genes encoding some virulence factors in 85 bacteria isolated from animals with bovine mastitis outbreak. Genes *clfB* and *sdrCDE* were the most prevalent, detected in 83.5% and 75.3% of the isolates, respectively. The genetic diversity of isolates, assessed by multiplex PCR, was also high and allowed the discrimination of more than 60 groups. These results guided the choice of *S. aureus* 4006 and 4125, with genetic similarity of 80% for the later trials. Total RNA from two cultures grown in values equivalent to 0.5X, 0.25X, 0.125X and the minimum inhibitory concentration defined for the four antibiotics was extracted and used in the analysis of real time RT-PCR. The expression of genes *spa*, *clfB*, *sdrC*, *fnBP*, *icaD*, *icaR*, *murf* and *sarA* was normalized to the *gyrB* gene. All antibiotics tested caused alterations in the expression of genes evaluated. The same antibiotics used in different doses, as well as different antibiotics at the same dose, differentially modulate the expression of genes. Only for 4006, the SarA regulatory protein, which regulates the transcription of several virulence factors, was expressed in many different treatments. As for 4125 isolate, the *icaD* regulator gene was positively influenced when different conditions were tested. In short, the data confirm that genes of *S. aureus* are expressed differently in response to concentrations of antibiotics below

the considered inhibitory concentration and that the variance between strains of *S. aureus* makes difficult a pattern of expression is extended to all species.

## 1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada primariamente pela invasão e multiplicação de bactérias no parênquima glandular. Ela representa a doença de maior significância econômica na pecuária leiteira mundial, sendo responsável por perdas anuais de US\$ 35 bilhões (Ruegg, 2005). No Brasil, estimativas mostram que 2,4 bilhões de litros de leite são perdidos anualmente devido à mastite bovina (Dias, 2007).

*Staphylococcus aureus* é considerada um dos principais patógenos associados à mastite dado à sua alta incidência nos rebanhos leiteiros mundiais, inclusive na Zona da Mata mineira (Brito *et al.*, 1999; Arcuri *et al.*, 2006). Trata-se de um patógeno contagioso encontrado no úbere de vacas infectadas que pode ser disseminado para quartos mamários não infectados e para animais sadios no momento da ordenha. *S. aureus* pode ser isolado de infecções clínicas, mas, está associado com uma frequência muito maior, às manifestações subclínicas, onde os sintomas característicos da doença podem passar despercebidos. Além disso, animais infectados com a bactéria nem sempre apresentam elevada contagem de células somáticas no leite, o que torna o diagnóstico insensível e ineficiente (Persson-Waller *et al.*, 2003).

Vários estudos têm demonstrado grande heterogeneidade encontrada em populações naturais de *S. aureus* de origem bovina (Lange *et al.*, 1999; Francois *et al.*, 2005; Reinoso *et al.*, 2008). Outros estudos mostraram que os isolados podem ser agrupados em complexos clonais e concluíram que as infecções intramamárias são causadas por um pequeno número de clones especializados (Kapur *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2005). Porém, um mesmo rebanho pode possuir isolados pertencentes a diferentes clones, o que dificulta o controle e o tratamento da doença. Por isso a análise da diversidade genética de *S. aureus* e o estudo de diferentes cepas têm sido vistos como etapas indispensáveis para o controle mais efetivo da doença (von Eiff *et al.*, 2004; Haslinger-Löffler *et al.*, 2005).

A presença de diferentes fatores de virulência contribui para a diversidade genética de *S. aureus* e auxilia no estabelecimento das infecções causadas pelo patógeno. A esses fatores são atribuídos os mais diversos papéis como reconhecimento e ligação a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, resistência à fagocitose, lise de células eucariotas e capacidade de metabolizar substratos presentes no leite (Chhatwal, 2002; Patti *et al.*, 1994). Essas características são, em grande parte, conferidas por proteínas presentes na superfície do patógeno. A expressão dessas

proteínas, contudo varia entre as cepas e o tecido colonizado (Sutra e Poutrel, 1994). Apesar disso, muitas pesquisas se propõem a avaliar a eficácia de vacinas baseadas nesses fatores de virulência (Arrecubieta *et al.*; 2008).

O tratamento da mastite é feito principalmente com uso de antimicrobianos pela via intramamária. Porém, a taxa de cura é variável e sofre influência direta de uma série de fatores como idade, fase da lactação, posição dos quartos mamários infectados e contagem de células somáticas (Joshi e Gorkhale, 2006).

As infecções causadas por *S. aureus* são difíceis de serem eliminadas, o que muito se deve às características do patógeno dentre as quais se destaca a capacidade de sobreviver intracelularmente (Anaya-Lopez *et al.*, 2006), o que o mantém protegido do sistema imune e dos antibióticos usados na prática veterinária (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Além do crescente aumento da resistência de cepas de *S. aureus* aos antibióticos, é possível que o produto adotado no tratamento se distribua de forma desigual pelo úbere do animal, fazendo com que o sítio de infecção seja exposto a uma concentração do antibiótico menor que a considerada inibitória. Estudos recentes têm demonstrado que concentrações subinibitórias causam alterações diferenciadas na expressão gênica de bactérias patogênicas podendo, em alguns casos, aumentar a virulência do patógeno (Andrews, 2001; Shaw *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005). Desta forma, o antibiótico, ao invés da ação bactericida esperada, acaba desencadeando um efeito contrário.

Nesse sentido, esse trabalho teve como o objetivo avaliar o efeito, na expressão gênica, de concentrações subinibitórias de quatro antibióticos empregados em formulações usadas para o tratamento da mastite bovina, duas cepas geneticamente distintas foram cultivadas na presença de ampicilina, oxacilina, gentamicina e tilosina. Em seguida, a alteração na expressão de sete genes importantes para a patogenicidade de *S. aureus* foi estimada por RT-PCR em tempo real. Acredita-se que esse trabalho representou um passo inicial no entendimento de como a prática veterinária pode influenciar molecularmente a virulência de *S. aureus* de origem bovina, além de contribuir para o desenvolvimento de novas práticas para prevenção e tratamento da mastite bovina voltadas para o rebanho brasileiro.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Mastite Bovina**

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo, sendo responsável por 5% da produção mundial (FAO, 2007). Em 2007 o Brasil produziu 26,4 bilhões de litros de leite, sendo Minas Gerais o maior produtor nacional, com 28,1%, seguido por Rio Grande do Sul (10,0%) (IBGE, 2007). O saldo da balança comercial brasileira de lácteos, em 2008, foi de US\$ 290,7 milhões, com exportações atingindo o recorde de US\$ 483,1 milhões, um crescimento de 91,7% em relação ao mesmo período de 2007. Minas Gerais foi o Estado que mais contribuiu para o resultado das exportações, com embarques de US\$ 224,5 milhões (Carvalho *et al.*, 2008). Entretanto, estimativas mostraram que ocorreu uma queda de 12 a 15% na produção de leite todos os anos, representando um desperdício de 2,4 bilhões de litros de leite/ano. Uma das principais razões para este baixo rendimento é a mastite bovina (Dias, 2007).

A mastite bovina é a doença de maior significância econômica na pecuária leiteira mundial (Fonseca e Santos, 2000) e acarreta um prejuízo, de aproximadamente, US\$ 35 bilhões/ano (Ruegg *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos, as despesas anuais chegam a US\$ 2 bilhões/ano, devido aos gastos diretos com o tratamento (serviços e medicamentos) bem como prejuízos indiretos decorrentes da morte dos animais, decréscimo da produção e descarte do leite (National Mastitis Council, 2001; Rainard, 2005; Petrovskia, 2006). A doença também traz prejuízos para a indústria de laticínios, isto porque em animais infectados, o leite produzido apresenta menor teor de lactose, gordura, proteínas e minerais, um número elevado de proteínas séricas e células somáticas, isto reduz significativamente a qualidade do leite e derivados, comprometendo o valor nutricional do alimento e sua aceitabilidade pelo consumidor (Urech *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2000; Bruckmaier *et al.*, 2004; Oliveira e Timm, 2006).

A mastite bovina é uma infecção da glândula mamária que acontece principalmente em resposta à invasão da teta por micro-organismos, mas também pode ter origem traumática, alérgica ou metabólica. Quanto à forma de apresentação, a doença é classificada como clínica ou subclínica. O edema do quarto mamário, a sensibilidade ao toque, além da presença de coágulos e, algumas vezes, sangue no leite, são os sintomas mais comuns da mastite clínica. Nos casos mais severos, o que se

observa é uma reação generalizada, onde o animal apresenta febre, perda de apetite, desidratação e septicemia, que pode evoluir para morte (Freitas *et al.*, 2005).

Na mastite subclínica, a doença se manifesta sem sintomas visíveis, sendo o diagnóstico feito por testes indiretos que se baseiam na elevação da contagem de células somáticas (CCS), tais como células leucocitárias, presentes no leite. Essa contagem indireta de CCS é feita através do *California Mastitis Test* (CMT), um teste muito usado por ser rápido e acessível aos produtores, além de poder ser realizado em campo. Entretanto, os resultados do teste CMT não devem ser utilizados na definição do tratamento, pois ele não identifica o agente etiológico (Sears e McCarthy, 2003). Relatos mostram que para cada caso clínico, existem 20 a 40 casos da forma subclínica (Wattiaux, 1996), sendo as infecções subclínicas constantemente detectadas em 50-70% do rebanho (Gruet *et al.*, 2001). No Brasil faltam estatísticas recentes sobre a prevalência da mastite, porém sabe-se que na região Sudeste, cerca de 20% dos quartos mamários é afetado pela mastite subclínica, enquanto 1% é afetado clinicamente. Sem o diagnóstico precoce, a mastite subclínica pode se tornar crônica, e assim vacas, aparentemente saudáveis, tornam-se reservatórios de patógenos, que acabam se disseminando entre outros animais do rebanho (Veiga *et al.*, 1994).

A mastite pode ter como causa diversos patógenos, mas são as bactérias os principais agentes etiológicos, normalmente divididas em duas categorias: bactérias contagiosas e bactérias ambientais. Na mastite contagiosa, o patógeno se encontra no próprio úbere do animal e a transmissão ocorre de animal para animal. Na mastite ambiental, o reservatório do patógeno é o próprio ambiente, que pode estar presente no ar, cama, água e fezes das vacas leiteiras. Dentre os principais patógenos contagiosos podemos citar *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*. Os patógenos ambientais mais comuns são divididos em dois grupos: coliformes e estreptococos do ambiente (National Mastitis Council, 2001).

O controle da mastite bovina é feito com base em programas de manejo onde são adotadas medidas preventivas, princípios rígidos de higiene e tratamento de animais doentes (National Mastitis Council, 2001). Vários trabalhos confirmam que a adoção dessas medidas reduz significativamente a prevalência e a incidência da mastite no rebanho leiteiro. Porém, as práticas de controle preventivas, baseadas em higiene e manejo, são muitas vezes desconhecidas ou mal aplicadas pelos produtores brasileiros (Carvalho, 2004; Dias, 2007).

## 2.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é um dos principais agentes causadores da mastite bovina e, por isso, tem sido foco de numerosos estudos que buscam compreender a patogênese e epidemiologia da doença. *S. aureus* é uma bactéria da família Staphylococcaceae, Gram-positiva de forma cocóide, que pode ocorrer em cachos ou isoladamente (Lowy, 1998), imóvel, não formadora de esporos, coagulase positiva, produtora de hemólise, maltose e manitol positivos. Possui metabolismos fermentativo e respiratório, sendo classificada como anaeróbia facultativa, com temperatura ótima de crescimento variando de 30 a 37 °C (Bergey, 1994).

*S. aureus* é uma bactéria encontrada no úbere de vacas infectadas, sendo disseminada para quartos mamários não infectados e para animais sadios no momento da ordenha. Embora *S. aureus* cause frequentemente mastite subclínica, animais infectados com a bactéria nem sempre apresentam elevada contagem de células somáticas no leite, o que torna o diagnóstico baseado neste parâmetro, nem sempre sensível e eficiente (Jones *et al.*, 1984).

O isolamento de *S. aureus* em animais com manifestação de mastite subclínica no Brasil vem sendo descrito desde a década de 50 (Lacerda Jr. *et al.*, 1953) e sua predominância sobre os demais agentes da doença já foi comprovada em um estudo realizado em diferentes regiões do país (Brito e Brito, 1996). Em Minas Gerais, a análise de 44 rebanhos leiteiros revelou a predominância de uma cepa, embora várias cepas possam ocorrer simultaneamente em um mesmo rebanho (Brito *et al.*, 2000). Porém, fatores sócio-ambientais como práticas de manejo, localização da propriedade, composição do rebanho e até mesmo a estação do ano afetam a distribuição e incidência dos isolados (Shpigel *et al.*, 1998; Sommerhauser *et al.*, 2003; Joshi e Gorkhale, 2006).

A diversidade genética vem sendo utilizada para a tipagem de *S. aureus* e tem sido vista como um passo indispensável para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos (Jarraud *et al.*, 2002; von Eiff *et al.*, 2004; Haslinger-Loffler *et al.*, 2005). Cada vez mais, estudos comprovam a grande diversidade existente em populações naturais de *S. aureus*, o que contribui para dificultar o controle e o tratamento da mastite estafilocócica (Smith *et al.*, 2005; Francois *et al.*, 2007; Morandi *et al.*, 2007).

Como se não bastassem as diferenças entre os isolados de origem bovina, trabalhos recentes mostram que eles possuem características próprias quando comparados aos isolados humanos, o que vem motivando pesquisas com patógenos

veterinários (Kapur *et al.*, 1995; Zadoks *et al.*, 2000; Reinoso *et al.*, 2008). O processo molecular responsável pela especificidade do hospedeiro ainda é pouco entendido, mas presume-se que seja devido a diferenças nos genes ou por variações em regiões codificadoras de alguns genes, como aqueles que codificam algumas proteínas de superfície, dentre as quais podemos citar o gene *cna*, que codifica a proteína de ligação ao colágeno, e *fnb*, que codifica a proteína de ligação à fibronectina (Francois, *et al.*, 2005).

*S. aureus* é conhecida em todo o mundo como um importante patógeno, com uma grande versatilidade, capaz de colonizar diferentes hospedeiros e diferentes sítios anatômicos. Essa bactéria produz uma série de fatores de virulência que contribuem sobremaneira para o sucesso da infecção. Esses fatores promovem a adesão da bactéria ao hospedeiro, a invasão da célula eucariota e protegem o patógeno do sistema imune do hospedeiro (Lowy, 1998).

O processo de adesão é crucial para a colonização e é mediado por proteínas conhecidas como adesinas. Elas pertencem à família das proteínas associadas à parede celular, denominadas MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* - componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz). As adesinas possuem características estruturais em comum que incluem um sinal secretório na extremidade N-terminal, aminoácidos carregados positivamente na região C-terminal e a presença de um domínio com um motivo conservado denominado LPXTG, que as ancora na parede celular (Foster e Höök, 1998).

Durante o cultivo, muitos fatores de virulência, principalmente os associados à superfície bacteriana, são expressos durante a fase exponencial de crescimento, enquanto que aqueles secretados são liberados ao final da fase exponencial (Foster e Höök, 1998). Este controle diferenciado da expressão rege o processo de infecção. *In vivo*, as adesinas inicialmente reconhecem a estrutura da superfície do hospedeiro, facilitando a colonização. Posteriormente, segue o crescimento dos micro-organismos e a secreção de toxinas e enzimas, tais como toxinas hemolíticas (toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ), leucotoxinas (LukFS), enterotoxinas (como EntB), toxina do choque tóxico 1 e várias proteases (serino proteases e cisteíno proteases) (Kahl *et al.*, 1998; Lowy, 1998; Proctor *et al.*, 1994).

Apesar de *S. aureus* possuir um grande número de adesinas, as proteínas que se ligam à fibronectina, como as proteínas FnBP, desempenham um papel principal na

infecção (Hauck e Ohlsen, 2006). A maioria dos isolados de *S. aureus* possui dois genes proximamente relacionados, *fnbA* e *fnbB*, que estão localizados *em tandem* no cromossomo. As proteínas codificadas por esses genes, FnBP-A e FnBP-B são cruciais para a invasão de células eucarióticas e já foi demonstrado que mutantes que não possuem estes genes são incapazes de realizar tal atividade (Dziewanowska *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Grundmeier *et al.*, 2004). Em *S. aureus* isolados de infecções humanas a prevalência do gene *fnb* pode variar de 60% à quase 100% dependendo do tipo de infecção (Peacock *et al.*, 2000; Arciola *et al.*, 2003).

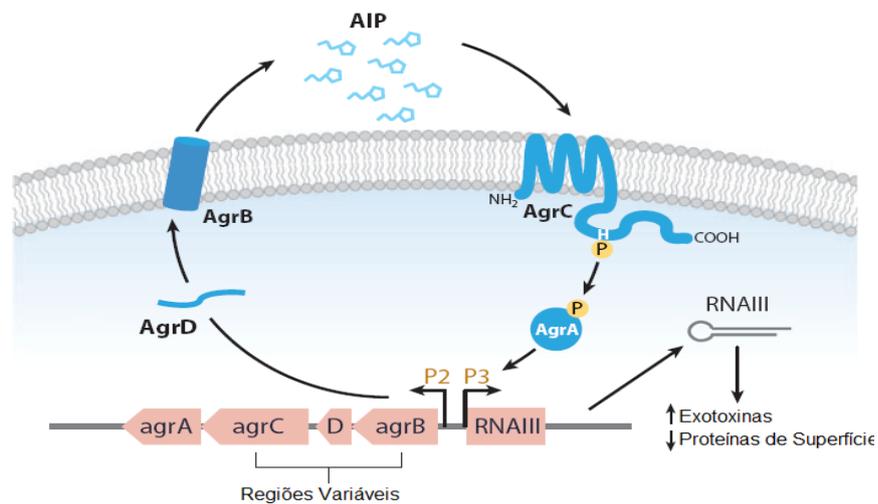
Os fatores de agregação A (ClfA) e B (ClfB) são adesinas expressas, *in vitro*, apenas durante a fase exponencial do crescimento bacteriano. Os genes *clfA* e *clfB* são genes distintos que codificam proteínas que auxiliam na adesão de *S. aureus* ao fibrinogênio imobilizado e promove a agregação da bactéria ao fibrinogênio solúvel (Ní Eidhin *et al.*, 1994; McAleese *et al.*, 2001).

Outras adesinas não tão bem caracterizadas são as proteínas Sdr, ainda não tiveram seu papel estabelecido na infecção. Sabe-se, porém que elas têm similaridade estrutural às proteínas ClfA e ClfB (McCrea *et al.*, 2000). A proteína Cna é responsável pela adesão ao colágeno, e sua presença em *S. aureus* é variável, dependendo do tipo de infecção e de tecido colonizado. Normalmente essa adesina é encontrada em cepas isoladas de infecções ósseas (Foster e Höök, 1998; Navarre e Scheneewind, 1999).

A proteína estafilocócica A (Spa) é uma proteína associada a superfície de *S. aureus* que está covalentemente ligada ao peptidoglicano e possui um domínio de ligação à região Fc da imunoglobulina IgG (O'Seaghdha *et al.*, 2006). A presença da proteína Spa auxilia na evasão da resposta imune do hospedeiro, característica facilitada pela capacidade dessa proteína em ligar aos fragmentos Fc das imunoglobulinas G, evitando a fagocitose e a via clássica de fixação do complemento (Atkins *et al.*, 2008).

O operon *sar* foi identificado por Cheung e colaboradores (1992) como sendo um *locus* regulatório de *S. aureus*. A proteína regulatória acessória SarA influencia na expressão de proteínas regulatórias e de superfície. O *locus sar* contém três transcritos sobrepostos designados *sarA*, *sarC* e *sarB*, que são transcritos em diferentes fases do ciclo de crescimento, sendo que *sarA* é mais transcrito na fase exponencial do ciclo de crescimento (Bayer *et al.*, 1996). SarA liga-se a regiões conservadas denominadas *Sar boxes* dentro de regiões promotoras de genes que codificam proteínas de superfície (*spa*), exoproteínas (*hla*, que codifica  $\alpha$ -hemolisina) e *agr*, outro importante *locus* regulatório global (Chien *et al.*, 1999). SarA se liga a elementos do promotor de *agr*

alterando a expressão de transcritos que contribuem, indiretamente, para a regulação de fatores de virulência, como exoproteínas e proteínas de superfície (Cheung *et al.*, 1997; Chien *et al.*, 1998). Alguns estudos têm demonstrado que SarA pode controlar a regulação de alguns fatores de virulência de maneira independente de *agr* (Dunman *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Mecanismo de *agr*. O peptídeo AgrD é processado e secretado por AgrB na forma da AIP, que atua no receptor de membrana AgrC, ativando-o através de fosforilação. AgrC fosforilado ativa AgrA, o qual ativa os promotores P2 e P3. O promotor P2 promove a auto-ativação do circuito enquanto P3 dirige a transcrição de RNAIII, que regula a expressão de exoproteínas e proteínas de superfície (Novick e Geisinger, 2008 – Modificado)

A patogênese em *S. aureus* também é influenciada pela produção de biofilme (Melchior *et al.*, 2006). Biofilmes são comunidades estruturadas de bactérias unidas por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas como, os polissacarídeos de adesão intercelular (PIA) e outros componentes, como ácido teicóico e proteínas associadas ao biofilme (BAP), que aderem a uma superfície viva ou inerte (Costerton *et al.*, 1999). Esse arranjo pode constituir em um modo de proteção, que permite o crescimento bacteriano em ambientes hostis (Melchior *et al.*, 2006).

O operon *ica*, responsável pela produção de biofilme, é formado por quatro genes (*icaADBC*) e está presente em grande parte dos *S. aureus* estudados (Götz, 2002). As proteínas codificadas são responsáveis pela produção de PIA e parecem ser reguladas pelo operon *sigB* e pelos *loci* regulatórios *agr* e *sar* (Rachid *et al.*, 2000; Gotz, 2002). Além dessas quatro proteínas, o *locus ica* codifica uma proteína reguladora denominada IcaR. O gene *icaR* é transcrito de forma divergente de *icaADBC* e é considerado um regulador negativo (Cramton *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2005).

Apesar de sua ocorrência abundante, a expressão do *locus ica* e a formação de biofilme parecem ser altamente variáveis entre isolados de *S. aureus* (Rachid *et al.*, 2000). Vários fatores ambientais podem modular a expressão de PIA, incluindo etanol, cloreto de sódio e concentrações subinibitórias de antibióticos (Conlon *et al.*, 2002; Rachid *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado a relação entre o desenvolvimento da mastite e a presença de *ica*, além de vincular a presença deste *locus* com a virulência da bactéria (Ziebuhr *et al.*, 1997; Arciola *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002; Vandecasteele *et al.*, 2001), indicando que cepas formadoras de biofilme estão, frequentemente, mais relacionadas com a infecção (Melchior *et al.*, 2006).

### **2.3. Tratamento da mastite bovina**

A administração de drogas antimicrobianas por via intramamária oferece uma opção conveniente, e também a mais usual, para o tratamento da mastite bovina. A meta da antibioticoterapia é alcançar concentrações efetivas da droga no sítio de infecção. Por outro lado, a concentração da droga deve diminuir o suficiente para permitir que níveis seguros sejam alcançados antes da liberação do leite para o consumo humano (Gruet, 2001).

Dependendo das características dos antimicrobianos, eles podem apresentar diferentes níveis de distribuição na glândula mamária, o que é usado por alguns autores para a sua classificação. Segundo Gruet e colaboradores (2001), os antibióticos administrados por via intramamária podem ser divididos em i) antibióticos com boa distribuição ii) antibióticos com distribuição limitada e iii) antibióticos com baixa distribuição. A distribuição inicial envolve a dissolução da formulação e distribuição passiva das moléculas da droga pelo leite, o qual é essencialmente um ambiente hidrofílico. Drogas hidrofílicas podem, portanto se distribuir bem pelo compartimento central do úbere. Mas a distribuição em tecidos mais profundos requer uma difusão passiva através de membranas lipofílicas que separam os diferentes compartimentos da glândula mamária (Gehring *et al.*, 2006).

As vantagens da via intramamária são as altas concentrações alcançadas pelo antibiótico no úbere infectado, a rápida taxa de distribuição da droga para várias partes do úbere (Moretain e Boisseau, 1989) e o baixo consumo de substâncias antimicrobianas. Citam-se como desvantagens o risco de contaminação durante a aplicação no canal da teta, uma possível irritação do tecido mamário e a distribuição

desigual de muitas substâncias por todo o úbere fazendo com que o sítio de infecção seja exposto a concentração do antibiótico menor que a inibitória, o que pode levar à seleção de novas cepas resistentes (Gruet *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos revelam que após o tratamento com antimicrobianos, a taxa de cura de infecções bacterianas pode variar entre 0% e 80%, dependendo de uma série de fatores como idade, fase da lactação, posição dos quartos mamários infectados e contagem de células somáticas (Sol *et al.*, 2000). Por exemplo, novilhas possuem uma taxa de cura entre 90 e 100%, enquanto que, para vacas em lactação, a taxa varia de 0 a 52%. Tratamentos de vacas com nível elevado de contagem de células somáticas geralmente são pouco eficazes (Owens *et al.*, 2001).

Em particular, infecções causadas por *S. aureus* são mais resistentes ao tratamento. A falha em eliminar a infecção estafilocócica do rebanho leiteiro deve-se a uma resposta adaptativa do patógeno para a sobrevivência na glândula mamária apesar da presença de antibióticos (Sandholm *et al.*, 1990), combinado com a incapacidade das defesas do hospedeiro em eliminar o patógeno (Sutra e Poutrel, 1994). Em infecções agudas causadas por *Streptococcus dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. uberis* e *Escherichia coli* observa-se entre 33 e 100% de eficácia do tratamento (Owens *et al.*, 1997; Pyorala e Pyorala, 1998; Deluyker *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Sol *et al.*, 2000).

A probabilidade de a mastite clínica reaparecer no mesmo quarto mamário infectado nos meses seguintes é aumentado em 4,8 vezes se o tratamento não for inteiramente efetivo (Houben *et al.*, 1993). Outros estudos mostram que até 40% dos casos de mastite parecem ser recorrentes de doenças que não foram completamente curadas (Hillerton e Kliem, 2002).

Vários agentes antimicrobianos, com diferentes modos de ação, são utilizados em formulações de medicamentos para o tratamento da mastite bovina (Salmon *et al.*, 1998). Uma das classes de antibióticos mais utilizadas são as penicilinas, que atuam como bactericidas por impedir a síntese de peptidoglicanos, o que resulta na lise e morte bacteriana (Whitten e Gaon, 1998; Crespilho *et al.*, 2007). A ampicilina pertence ao grupo de penicilinas denominado aminopenicilinas, que são compostos similares às penicilinas naturais. Segundo Gruet *et al.* (2001), a ampicilina pode ser considerada um antibiótico com boa distribuição. Embora a oxacilina seja uma penicilina semi-sintética, resistente à penicilinase, ao contrário dos outros  $\beta$ -lactâmicos, ela possui distribuição limitada no úbere (Gruet *et al.*, 2001). Outro antibiótico utilizado no tratamento da mastite bovina é a gentamicina, um aminoglicosídeo que provoca erro de leitura ao se

ligar na subunidade ribossomal 30S, bloqueando a passagem do peptidil-tRNA do sítio aceptor para o sítio doador, impedindo, portanto, a síntese protéica. A tilosina é um antibiótico de boa distribuição, da classe dos macrolídeos, que interfere na síntese de proteínas bacterianas por se ligar na subunidade ribossomal 50S (Tan *et al.*, 2009).

Todos os antibióticos supracitados têm sido amplamente utilizados no tratamento da mastite bovina (Gruet *et al.*, 2001). Trabalhos têm demonstrado que cerca de 6% de *S. aureus* isolados de mastite clínica são resistentes a penicilinas, mas essa porcentagem pode ultrapassar os 30% se isolados são de mastite subclínica ou crônica. A resistência aos antibióticos oxacilina e gentamicina também já foi observada em cerca de 5% do isolados *S. aureus* de origem bovina, enquanto a resistência a antibióticos da classe dos macrolídeos é ainda mais rara (Lange *et al.*, 1999; Gentilini *et al.*, 2000; Pitkala *et al.*, 2004).

#### **2.4. Concentrações subinibitórias de antimicrobianos**

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração do antimicrobiano que inibe o crescimento visível do micro-organismo. Este valor é definido *in vitro* e normalmente norteia a dose de antibiótico aplicada *in vivo*. Porém, como descrito acima, vários fatores podem contribuir para que o sítio de infecção seja exposto a concentrações menores (Andrews, 2001).

Estudos recentes vêm demonstrando que em concentração abaixo da CIM, ou seja, em concentrações subinibitórias (sub-CIM), os antibióticos podem alterar a expressão gênica de micro-organismos causadores de infecções. Desta forma, o antibiótico, ao invés da ação bactericida esperada, acaba desencadeando um efeito contrário, como por exemplo, estimulando a produção de biofilme, o que torna a infecção mais difícil de ser tratada (Andrews, 2001; Shaw *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2006).

Já foi relatado que concentrações subinibitórias de penicilina aumentam significativamente a taxa de mutação em *Streptococcus pneumoniae*, sugerindo que a exposição a este antibiótico poderia ajudar o patógeno a induzir adaptações que conferem resistência a outros antibióticos (Cortes *et al.*, 2008). Em estudos realizados com *S. aureus* de origem humana, a clidamicina quando utilizada em concentrações subinibitórias, eliminou a produção de praticamente todas as exoproteínas secretadas e

aumentou a produção de proteínas de superfície, aumentando a virulência do patógeno (Herbert *et al.*, 2008).

O efeito de diferentes antibióticos sobre a expressão de genes relacionados a produção de biofilme foi recentemente estudado (Melchior *et al.*, 2006). Antibióticos utilizados em sub-CIM foram capazes de estimular a expressão do gene *icaA*, que codifica enzima relacionada com a produção de biofilme. O uso de concentração subinibitória de tetraciclina foi capaz de aumentar a expressão do operon *ica* em *S. epidermidis* (Rachid *et al.*, 2000), efeito também observado em *S. lugdunensis*, quando submetido à sub-CIM de nafcilina (Frank *et al.*, 2007). Mas resultados divergentes foram encontrados quando *S. epidermidis* foi tratado com sub-CIM de diferentes antibióticos como vancomicina, cefazolina e ofloxacina (Rupp e Hamer, 1998; Rachid *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2007).

Atualmente várias ferramentas moleculares de avaliação da expressão diferencial de genes bacterianos têm sido utilizadas, dentre as quais se destaca a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real. Essa estratégia foi empregada para avaliar a produção de toxinas por cepas de *Clostridium difficile*, crescidas na ausência e na presença de sub-CIM de metronidazol, vancomicina, clidamicina e linezolida. Todos os antibióticos utilizados, exceto a clidamicina, aumentaram a expressão dos genes *tcdA* e *tcdB*, responsáveis pela expressão das toxinas A e B, mais uma vez comprovando que concentrações abaixo da CIM causam mudanças na transcrição gênica de fatores de virulência (Gerber *et al.*, 2008).

Até o momento, um grupo de genes de assinatura responsivo a cada antibiótico não foi claramente identificado e o que tem sido observado é que dependendo do tipo de antibiótico e do organismo, diferentes grupos de genes são afetados (Adhikari e Novick, 2005; Cerca *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005; Henderson-Begg *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2006). A interpretação dos dados obtidos tem se mostrado difícil e por isso converter os resultados determinados *in vitro* para um regime de uso *in vivo*, ainda é um desafio para todos os tipos de antibióticos (Soto *et al.*, 2006). Porém, existe um consenso que o estudo dos efeitos de concentrações subinibitórias sobre bactérias deverá gerar importantes informações que poderão ser úteis para otimização de terapias (Diarra *et al.*, 1999; Braga *et al.*, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. *Objetivo Geral***

Esse trabalho teve por objetivo analisar a expressão de genes de duas cepas de *S. aureus* geneticamente distintas em resposta a concentrações subinibitórias de quatro antimicrobianos usados para o tratamento da mastite bovina.

#### **3.2. *Objetivos Específicos***

1. Identificar a presença dos genes *sspA*, *spa*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *fnBP* e *sdrCDE*, que codificam proteínas envolvidas na patogênese bacteriana.
2. Estimar a diversidade genética de isolados de *S. aureus* por meio de análises de *loci* polimórficos;
3. Determinar, para isolados geneticamente distintos (4006 e 4125), a concentração inibitória mínima dos antibióticos ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina;
4. Avaliar a expressão dos genes *clfB*, *fnbA*, *spA*, *icaD*, *icaR*, *sdrC*, *sarA* e *murF* em concentrações subinibitórias por meio de RT-PCR em tempo real.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa.

### **4.1. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo**

Os oitenta e cinco isolados de *S. aureus* utilizados neste estudo fazem parte da coleção de culturas da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG e foram obtidos de animais com manifestação de mastite bovina em rebanhos leiteiros da região Sudeste, principalmente do estado de Minas Gerais. As culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar infusão cérebro-coração (BHI; Himedia) e mantidas por 16 h a 37 °C. Para preparo dos estoques cada isolado foi inoculado em 5 mL de caldo BHI, e mantido em estufa a 37 °C por 24 h. Esse volume foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado a 5000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram mantidos a -80°C.

### **4.2. Extração do DNA genômico**

O DNA genômico dos isolados foi extraído conforme sugerido por Pospiech e Neumann (1995) a partir de cultivo celular em 10 mL de meio BHI. As amostras foram armazenadas a -20 °C para uso posterior.

A qualidade do DNA extraído foi analisada em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e as imagens registradas em sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (Loccus Biotecnologia).

### **4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Inicialmente, os isolados foram avaliados por PCR quanto à presença dos genes de *sspA* (serino protease V8), *spa* (proteína A), *clfA* (fator de agregação A), *clfB* (fator de agregação B), *cna* (proteína de ligação ao colágeno A), *fnBP* (proteína de ligação à

fibronectina) e *sdrCDE* (proteínas de ligação ao fibrinogênio) com oligonucleotídeos já descritos na literatura (Tabela 1).

A reação de amplificação continha 20 ng/μL de DNA genômico, 2,0 μL de tampão de amplificação 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 1U de *GoTaq* DNA Polimerase (Promega) e o par de *primers* específicos para cada gene alvo nas concentrações descritas na Tabela 1, totalizando um volume final de 20 μL. As condições de amplificação consistiram de uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 5 min, seguidos por 20 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C e 30 seg a 72 °C, com uma extensão final a 72 °C por 5 min (Sabat *et al.*, 2003). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídeo. As imagens foram registradas em sistema de fotodocumentação L-PIX HE (Loccus Biotecnologia).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos empregados para reação em cadeia da polimerase utilizados neste estudo.

Gene alvo	Seqüência (5' - 3')	Concentração (μM)	Amplicon esperado (bp)	Fonte
<i>sspA</i>	F-ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA R-TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC	1,0	132	Francois <i>et al.</i> , 2005.
<i>spa</i>	F-AGCACCAAAAAGAGGAAGACAA R-GTTTAAACGACATGTACTCCGT	1,0	290	Francois <i>et al.</i> , 2005.
<i>clfA</i>	F-GATTCTGACCCAGGTTTCAGA R-CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT	1,0	945	Francois <i>et al.</i> , 2005.
<i>clfB</i>	F-ATGGTGATTTCAGCAGTAAATCC R-CATTATTTGGTGGTGTAACTCTT	0,5	880	Francois <i>et al.</i> , 2005.
<i>fnBP</i>	F-GGTCAAGCRCAAGGACCART R-AATAATCCGCCGAACAACAT	1,0	1045	Francois <i>et al.</i> , 2005.
<i>cna</i>	F-AAAATGACAAAAATGGCAAG R-CAGGTTTGTAGTTGGTGGTGTT	1,0	1888	Francois <i>et al.</i> , 2005.
<i>sdrCDE</i>	F-GTAACAATTACGGATCATGATG R-TACCTGTTTCTGGTAATGCTTT	1,0	648/580/622	Sabat <i>et al.</i> , 2003.

#### 4.4. Diversidade genética dos isolados

A diversidade genética dos isolados foi avaliada por PCR *multiplex*, empregando os *primers* citados na tabela 1. Uma mistura dos 7 conjuntos de *primers* foi preparada juntamente com 20 ng/μL do DNA genômico, 2,0 μL de tampão de amplificação 10X,

3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de *JumpStart* Taq DNA Polimerase (Sigma, D4184), totalizando um volume final de 20 µL (Sabat *et al.*, 2003). As condições de amplificação adotadas consistiram de uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 5 min, seguidos por 20 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C e 30 seg a 72 °C, com uma extensão final a 72 °C por 5 min (Sabat *et al.*, 2003). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As imagens foram registradas em sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (Loccus Biotecnologia). Os isolados foram agrupados por análise de diversidade genética em relação ao resultado do PCR *multiplex*. Utilizou-se o programa GENES (Cruz, 1997), utilizando como índice de dissimilaridade o Dice (Sorenso ou Nei e Li =  $2a/(2a + b + c)$ ) para obter um dendrograma, de acordo com o qual dois isolados geneticamente distintos foram selecionados e utilizados nos estudos posteriores.

#### **4.5. Antibióticos**

Estoques de soluções de antibióticos ampicilina (Sigma, A9518), gentamicina (Sigma, G8648), oxacilina (Sigma, O1002) e tilosina (Sigma, T6134) foram preparados em água deionizada, a uma concentração de 50 mg/mL, esterilizados por filtração e alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

#### **4.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para os isolados selecionados foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas de quatro diferentes antibióticos, ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina. A determinação da CIM foi feita pelo método da microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). Para cada isolado, o pré-inóculo foi preparado partindo-se de uma colônia isolada, a qual foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) e mantido em agitador orbital a 37 °C por 18 h. O volume de 1,5 mL foi submetido a centrifugação a 5000 g por 5 min. O sedimento de células obtido foi lavado, ressuspenso em solução salina (0,9% NaCl, p/v) e ajustado para densidade ótica (DO) a 600nm igual a 0,1, que corresponde a  $5 \times 10^7$  UFC/mL. Todas as leituras de absorvância foram feitas em leitor de microplaca *VersaMax* (Molecular

Device). A suspensão de células foi diluída em solução salina para que a concentração final de bactérias fosse padronizada entre  $5 \times 10^4$  e  $5 \times 10^5$  UFC/mL (solução padrão A).

Inicialmente, em placa de 96 poços, foram estimados os valores aproximados de CIM para os quatro antibióticos, considerando os isolados 4006 e 4125. Foi preparado um tubo de ensaio contendo 4 mL caldo Mueller-Hinton (Himedia). Nesse tubo foi adicionado uma quantidade de antibiótico quatro vezes maior que o valor de CIM estimado, seguido de homogenização vigorosa. Uma alíquota de 2 mL desse tubo de ensaio foi transferida para outro tubo contendo 2 mL de caldo Mueller-Hinton, diluindo pela metade a concentração do antibiótico. A transferência foi realizada mais cinco vezes, de forma que a concentração de um tubo fosse sempre metade do valor do tubo antecessor. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 20  $\mu$ L da solução padrão A, seguidos por incubação a 37 °C, 180 rpm, durante 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração de antibiótico no qual não houve crescimento bacteriano. Os testes para determinação da CIM foram feitos em triplicata. Os mesmos procedimentos foram feitos para todos os antibióticos e para os dois isolados.

#### **4.7. Curvas de crescimento**

Foram feitas curvas de crescimento dos isolados 4006 e 4125 nas concentrações correspondentes a 0,50X, 0,25X e 0,125X da CIM previamente determinada conforme descrito acima. A um tubo de ensaio contendo 12 mL de caldo Mueller-Hinton foi adicionada uma quantidade de antibiótico equivalente ao valor de CIM. Uma alíquota de 6 mL foi transferida para outro tubo contendo 6 mL de caldo Mueller-Hinton, de tal modo a obter 0,5X CIM. Esse procedimento foi repetido até que se obtivessem valores correspondentes a 0,25X e 0,12X da CIM. A curva de crescimento também foi determinada na ausência de antibióticos (controle). A cada tubo de ensaio foram adicionados 60  $\mu$ L da solução padrão A, que foram incubados a 37 °C, 180 rpm, por 24 h. A cada hora foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L para leitura de absorvância a 600nm em leitor de microplaca *Versamax* (Molecular Device). Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.8. Extração de RNA total

O experimento consistiu de quatro repetições biológicas cujos sedimentos de células foram agrupados em dois *pools* os quais foram submetidos, separadamente, a extração de RNA. Para cada *pool* foram realizadas duas repetições técnicas. Para cada repetição biológica, 1,5 mL de cultura crescida em meio Mueller-Hinton contendo concentrações subinibitórias (0,5X, 0,25X, 0,125X) de antibióticos foram coletadas observando a  $D.O_{600\text{ nm}} = 0,15-0,20$  e centrifugadas a 5.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de células obtidos de duas repetições foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de tampão TE contendo 5 mg/mL de Lisozima (Sigma, L7651) e 0,5 U/ $\mu\text{L}$  de Lisostafina (Sigma, L7386). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min, com inversão a cada 5 min. Posteriormente, centrifugou-se a 5.000 g, por 6 min. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de TriReagent (Sigma, 93289) e 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Sigma, C2432), etapa a partir da qual adotou-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Todas as etapas de extração, exceto as centrifugações, foram realizadas a 4°C e em condições livres de ribonucleases. O controle consistiu de cultura crescida na ausência de antibiótico.

A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1% (Sambrook, *et al.*, 2001). A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pelas leituras de absorvância a 260 nm e 280nm de 1  $\mu\text{L}$  de amostra no aparelho *Evolution 60* (Thermo Scientific).

A preparação de RNA total foi tratada com 1 U/ $\mu\text{L}$  de DNase-RNase Free (Promega), para eliminação de DNA contaminante, seguindo especificações do fabricante. As amostras foram amplificadas por PCR convencional utilizando *primers* para o gene *16S* rRNA para confirmar a ausência de contaminação por DNA total bacteriano. Foi usado como controle positivo uma amostra contendo DNA de *S. aureus*. A pureza e a concentração das amostras foram novamente determinadas pela leitura de 1  $\mu\text{L}$  de amostra no aparelho *Evolution 60* (Thermo Scientific) e o RNA total foi armazenado a -80 °C.

#### 4.9. Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit *ImPromII Reverse Transcriptase System* (Promega), de acordo com as recomendações do

fabricante. Amostras de RNA total (1 µg) das diferentes condições de crescimento foram incubadas com 1 µL de *primer* randômico a 70 °C por 5 min e, em seguida, incubadas a 4 °C por 5 min. A seguir foi adicionado tampão de reação *ImPromII* 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, *mix* de dNTPs (0,5 mM de cada), 1 U/µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNasin* e a enzima transcriptase reversa *ImpromII* (200 U). As amostras foram incubadas a 25 °C por 5 min, para anelamento dos *primers*, 42 °C por 60 min para extensão da fita de DNA e a 70 °C, por 15 min, para inativação da transcriptase. Os cDNAs obtidos foram armazenados a -20°C.

#### 4.10. Quantificação dos transcritos por RT-PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando o aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Baseado nos valores de Ct (*Cycle threshold*), que é o ponto em que a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído, foi realizada a quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak e Schmittgen (2001). A detecção foi realizada pelo sistema *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), sendo o gene que codifica DNA girase (*gyrB*) (Korem *et al.*, 2009) e *16S* rRNA (Ster *et al.*, 2005) utilizados como normalizador para quantificação dos genes alvos *clfB*, *fnbA*, *spA* (Ster *et al.*, 2005) *icaD*, *icaR*, *sdrC*, *sarA* (Korem *et al.*, 2009) e *murF*. O desenho do par de oligonucleotídeos *murF* foi realizada através do programa *Primer3 plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), de acordo com os requisitos para PCR em tempo real.

As amostras foram analisadas em duas repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata em cada placa de reação. As análises de quantificação relativa de cada gene foram feitas em tubos individuais.

Inicialmente, foram feitos ensaios para a determinação da concentração ótima de *primer* e da eficiência da reação. Os componentes para cada reação foram 3µL de cDNA, 6,0 µL de 2X *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystem) e *primer* nas concentrações de 100, 200, 400 e 600 nM. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> do cDNA. Para o cálculo do valor do coeficiente angular da reta (*slope*) foi utilizada a fórmula Eficiência PCR=  $(10^{(1/-slope)} - 1) \times 100$ .

As condições de amplificação para todos os sistemas foram 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg e anelamento e extensão a 60 °C durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1 °C durante 30 seg, partindo de 60 °C até atingir o limite de 94 °C.

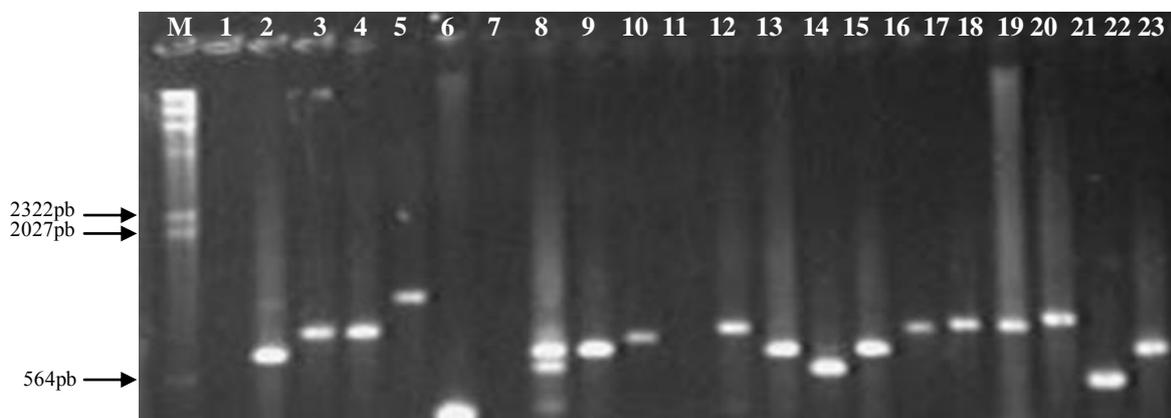
**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR em tempo real.

<b>Gene alvo</b>	<b>Seqüência (5'- 3')</b>	<b>Concentração (µM)</b>	<b>Fonte</b>
<i>clfB</i>	F-TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAC R-CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTTG	0,4 µM	Ster <i>et al.</i> , 2005
<i>fnBP</i>	F-CGACACAACCTCAAGACAATAGCGG R-CGTGGCTTACTTTCTGATGCCGTTTC	0,4 µM	Ster <i>et al.</i> , 2005
<i>icaD</i>	F-GGGTGGATCCTTAGTGTTACAATTTT R-TGACTTTTTGGTAATTCAAGGTTGTC	0,4 µM	Korem <i>et al.</i> , 2009
<i>icaR</i>	F-TTGCGAAAAGGATGCTTTCA R-GATAAAGATGACAAAAGAAGACTTTCAG	0,2 µM	Korem <i>et al.</i> , 2009
<i>murF</i>	F-CGGGCCTATTATATGGTTTG R-AGACCCTGTGACGGCAATTA	0,2 µM	Desenhado neste trabalho
<i>sarA</i>	F- GCTTTGAGTTGTTATCAATGGTCAC R- CTCTTTGTTTTCGCTGATGTATGTC	0,2 µM	Ster <i>et al.</i> , 2005
<i>SdrC</i>	F-AAGACAATACGCAAACCTGCAACTG R-GTCGTGATTGCATGTTACTACTAGTTTCT	0,2 µM	Korem <i>et al.</i> , 2009
<i>spa</i>	F-ATATCTGGTGGCGTAACACCTGCTG R-CGCATCAGCTTTTGGAGCTTGAGAG	0,4 µM	Korem <i>et al.</i> , 2009
<i>gyrB</i>	F-ATCGGTGGCGACTTTGATCTA R- CCACATCGGCATCAGTCATAA	0,2 µM	Korem <i>et al.</i> , 2009
<i>16S</i>	F-TAT GGAGGAACACCAGTGGCGAAG R-TCATCGTTTACGGCGTGGACTACC	0,4 µM	Ster <i>et al.</i> , 2005

## 5. RESULTADOS

Este trabalho teve por objetivo investigar o efeito de concentrações subinibitórias de quatro antibióticos na expressão de genes responsáveis pela patogenicidade e virulência de duas cepas de *S. aureus* de origem bovina. Porém estudos têm demonstrado que nem todos os fatores são expressos por todas as cepas, o que motivou uma investigação prévia da ocorrência de genes que codificam proteínas de superfície entre os isolados cedidos pela Embrapa Gado de Leite. Isso permitiu a escolha dos genes e das cepas cujas expressões seriam analisadas quantitativamente.

Inicialmente, a presença no genoma, dos genes que codificam o fator de agregação (*clfA* e *clfB*), a proteína A (*spa*), as proteínas de ligação a fibronectina (*fnbP*), ao colágeno (*cna*), ao fibrinogênio (*sdrCDE*) e a serino-protease (*sspA*) foram avaliadas por PCR (Fig. 2 e apêndice 1A a 7A). Embora se esperasse de cada amplificação fragmentos de DNA de tamanhos definidos (Tab. 1), o que se observou foram amplicons de tamanhos variados para cada gene. A variação observada foi de aproximadamente 300 a 700 pb para *clfB*, 980 a 1100 pb *clfA*, 450 a 1000 pb para *sdrCDE*, 700 1900 pb para *cna*, 600 a 650 pb para *fnBP*, aproximadamente 290 pb para *spa* e aproximadamente 132 pb para *sspA*.



**Figura 2.** Avaliação da presença do gene *clfB* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%. Número da canaleta, seguida pela identificação do isolado: M- marcador molecular ( $\lambda$  *HindIII*); 1-3811; 2-2878; 3-3006; 4-3652; 5-3987; 6-3974; 7- 2927; 8- 3930; 9- 3900; 10- 4769; 11-4651; 12-4118; 13-4162; 14-4156; 15-4236; 16-4746; 17-4784; 18-4716; 19-4760; 20-4627; 21-4130; 22-2927; 23-2927.

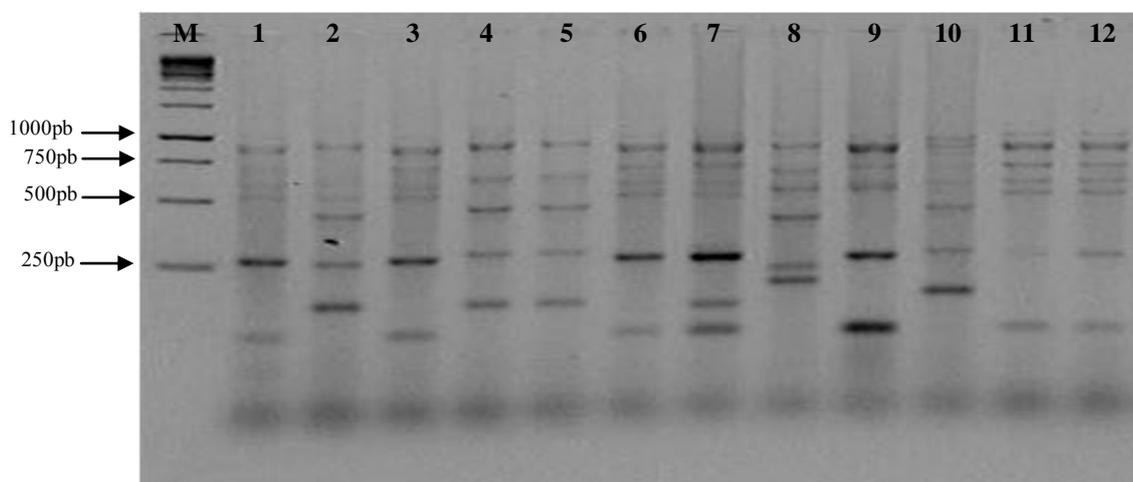
Com base nas amplificações foi calculada a porcentagem da presença dos genes considerando as 85 bactérias (Tab. 3). Conforme pode ser observado, o gene *clfB* foi o

mais encontrado entre os isolados estudados, seguido por *spa* e *sdrCDE*, enquanto que *cna* foi encontrado em menos que 20% deles.

**Tabela 3.** Prevalência das proteínas de superfície entre as bactérias estudadas.

Gene	Porcentagem
<i>clfA</i>	38,8 % (33/85)
<i>clfB</i>	83,5 % (71/85)
<i>sdrCDE</i>	75,3 % (64/85)
<i>cna</i>	18,8 % (16/85)
<i>sspA</i>	63,5 % (54/85)
<i>spa</i>	77,6 % (66/85)
<i>fnBP</i>	43,0 % (37/85)

Para fins de selecionar as cepas para os estudos posteriores, um PCR *multiplex* usando o conjunto de *primers* usados para o PCR convencional foi realizado para constatar a diversidade genética dos 85 isolados pertencentes à coleção. O padrão de bandas obtido para alguns isolados está apresentado na Figura 3. Os demais géis estão apresentados no apêndice (Fig 8A).



**Figura 3.** Avaliação do padrão de bandas de isolados de *Staphylococcus aureus* por meio da reação em cadeia da polimerase *multiplex* em gel de agarose 2 %. Número da canaleta, seguida pela identificação do isolado: M- Marcador Molecular (GeneRuler 1kb); 1-4074; 2-4192; 3-4184; 4- 4235; 5-4124; 6-4005; 7- 4628; 8- 4018; 9- 4075; 10- 4628; 11-4627; 12-4130.

Um máximo de oito fragmentos foi obtido para cada isolado. Um total de 21 bandas de diferentes tamanhos foram analisados para a construção de um dendograma (Fig. 4). A tipagem molecular permitiu a subdivisão dos isolados em 61 grupos diferentes, quando considerada uma dissimilaridade de 20%, conforme Peles e

colaboradores (2007). Os grupos que continham mais isolados considerados similares foram os grupos 1 e 14 (7 isolados) e o grupo 42 (5 isolados).

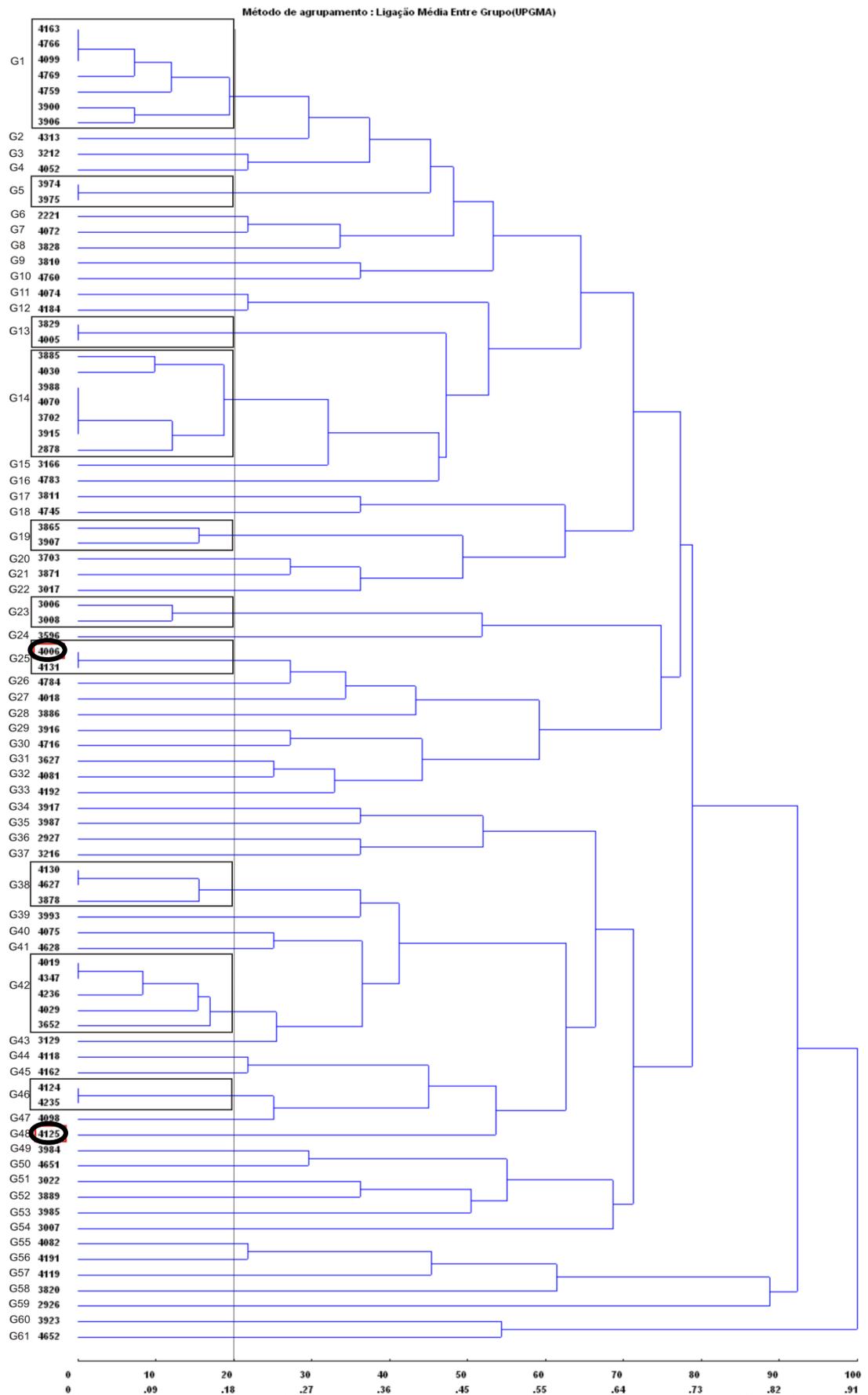
Baseada na análise de diversidade genética e na presença de fatores de virulência, os isolados 4006 e 4125 foram selecionados para dar continuidade aos estudos. De acordo com as amplificações, esses isolados apresentaram os genes *clfB*, *fnBP*, *spa*, *sdr* e *sspA*, e foram geneticamente distantes, possuindo apenas 20% de similaridade. Para eles, foram determinados os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina (Tab. 4). Pelos dados obtidos, 4125 é muito mais resistente à ampicilina que 4006. O isolado 4006 pertence ao grupo 25 e o isolado 4125 pertence ao grupo 48.

Após a determinação da CIM, cada isolado foi cultivado em meio de cultura contendo concentrações subinibitórias dos antibióticos. As curvas de crescimento foram determinadas sem o antibiótico e na presença dos quatro antibióticos nas concentrações correspondentes a 0,5X, 0,25X e 0,125X da CIM, até que alcançassem a fase estacionária (Fig. 5). Os gráficos apresentaram as três fases típicas das curvas de crescimento de bactérias. Para a extração de RNA total as culturas foram recuperadas estipulando-se  $D.O_{600\text{ nm}} = 0,15-0,20$ , o que representa a fase exponencial de crescimento.

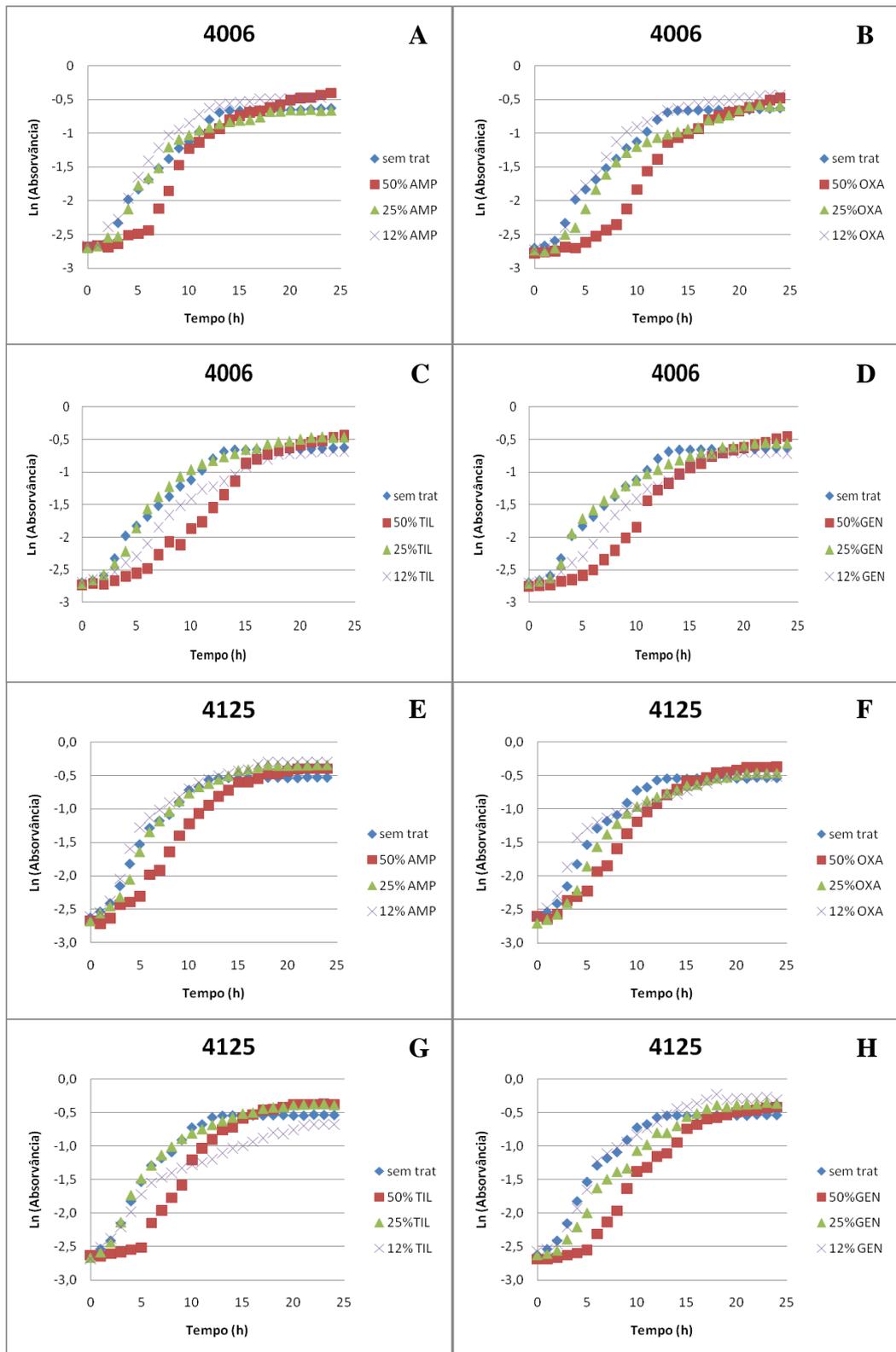
**Tabela 4.** Valores da Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de diferentes antibióticos para *Staphylococcus aureus* 4006 e 4125.

	<b>Isolado</b>	
	<b>4006</b>	<b>4125</b>
<b>Ampicilina</b>	0,05	40,00
<b>Gentamicina</b>	0,80	0,80
<b>Oxacilina</b>	0,05	0,10
<b>Tilosina</b>	0,80	0,40

Para a quantificação dos transcritos por RT-PCR em tempo real foi inicialmente averiguada a especificidade dos conjuntos de *primers* utilizados. A Figura 8A (apêndice) apresenta, para cada oligonucleotídeo, as curvas de dissociação e os  $T_m$ 's, onde a obtenção de um pico único confirma a amplificação de apenas um fragmento de DNA.



**Figura 4.** Dendrograma obtido da análise de agrupamento pelo programa GENES utilizando DICE como índice de dissimilaridade. Isolados pertencentes a um mesmo grupo estão identificados por retângulos. Os dois isolados selecionados para os estudos de expressão gênica estão identificados por círculos.



**Figura 5.** Curvas de crescimento obtidas para os isolados 4006 (A, B, C, D) e 4125 (E, F, G, H), quando crescidos na presença de diferentes concentrações dos antibióticos ampicilina (AMP), oxacilina (OXA), tilosina (TIL) e gentamicina (GEN).

A eficiência (E) da PCR em tempo real foi calculada através de gráfico onde os valores obtidos de Ct foram dispostos no eixo das ordenadas e o logaritmo dos valores de cada diluição, no eixo das abscissas. A PCR apresenta 100 % de eficiência quando o resultado do *slope* se aproxima de -3,32. Os valores das eficiências da PCR para os *primers* foram 86,35 % (*clfB*), 95,49 % (*fnBP*), 95,46 % (*sarA*), 91,13 % (*spa*) e 94,04% (16S rRNA); os gráficos se encontram no apêndice (Fig. 9A). Esses valores elevados de eficiência validam o experimento e conseqüentemente permitem as análises de quantificação de transcrito utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001). Os valores de E para os primers *gyrB*, *murF*, *icaD*, *icaR* e *sdrC* não foram determinados.

Dentre os dois genes endógenos (16S rRNA e *gyrB*) analisados, o que apresentou menor variação nos valores de Ct foi o *gyrB*, que foi escolhido como normalizador (Tab. 5).

**Tabela 5.** Valores médios de Ct para os genes normalizadores 16S rRNA e *gyrB*.

	Isolado 4006				Isolado 4125			
	Desvio	Desvio	Desvio	Desvio	Desvio	Desvio	Desvio	
	Média	Padrão	Média	Padrão	Média	Padrão	Média	Padrão
	<i>16S</i>	<i>16S</i>	<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i>	<i>16S</i>	<i>16S</i>	<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i>
	<i>rRNA</i>	<i>rRNA</i>			<i>rRNA</i>	<i>rRNA</i>		
<b>sem tratamento</b>	10,20	3,22	26,05	1,60	7,65	3,61	24,03	2,07
<b>0,50x CIM Amp</b>	10,26	1,47	22,35	0,18	16,29	0,49	33,82	0,13
<b>0,25x CIM Amp</b>	12,24	2,47	25,30	0,14	9,23	0,42	24,83	0,10
<b>0,125x CIM Amp</b>	9,34	1,99	24,44	0,73	7,11	0,45	23,94	0,02
<b>0,50x CIM Gen</b>	17,63	3,29	28,11	4,00	6,33	2,15	23,03	2,66
<b>0,25x CIM Gen</b>	5,88	0,24	22,91	0,01	7,77	3,57	23,91	3,40
<b>0,125x CIM Gen</b>	6,67	0,06	23,73	0,11	15,49	15,61	15,39	7,84
<b>0,50x CIM Oxa</b>	6,13	0,16	23,32	0,35	7,08	0,18	23,24	0,08
<b>0,25x CIM Oxa</b>	6,78	0,13	23,93	0,03	7,33	1,98	24,10	1,20
<b>0,125x CIM Oxa</b>	9,39	1,43	24,86	0,37	8,16	2,45	24,92	1,40
<b>0,50x CIM Til</b>	9,86	0,47	24,75	0,04	6,06	0,20	25,55	0,41
<b>0,25x CIM Til</b>	11,03	0,50	22,50	0,16	6,90	0,32	25,35	0,81
<b>0,125x CIM Til</b>	6,86	0,13	24,16	0,30	10,78	0,03	25,51	0,52

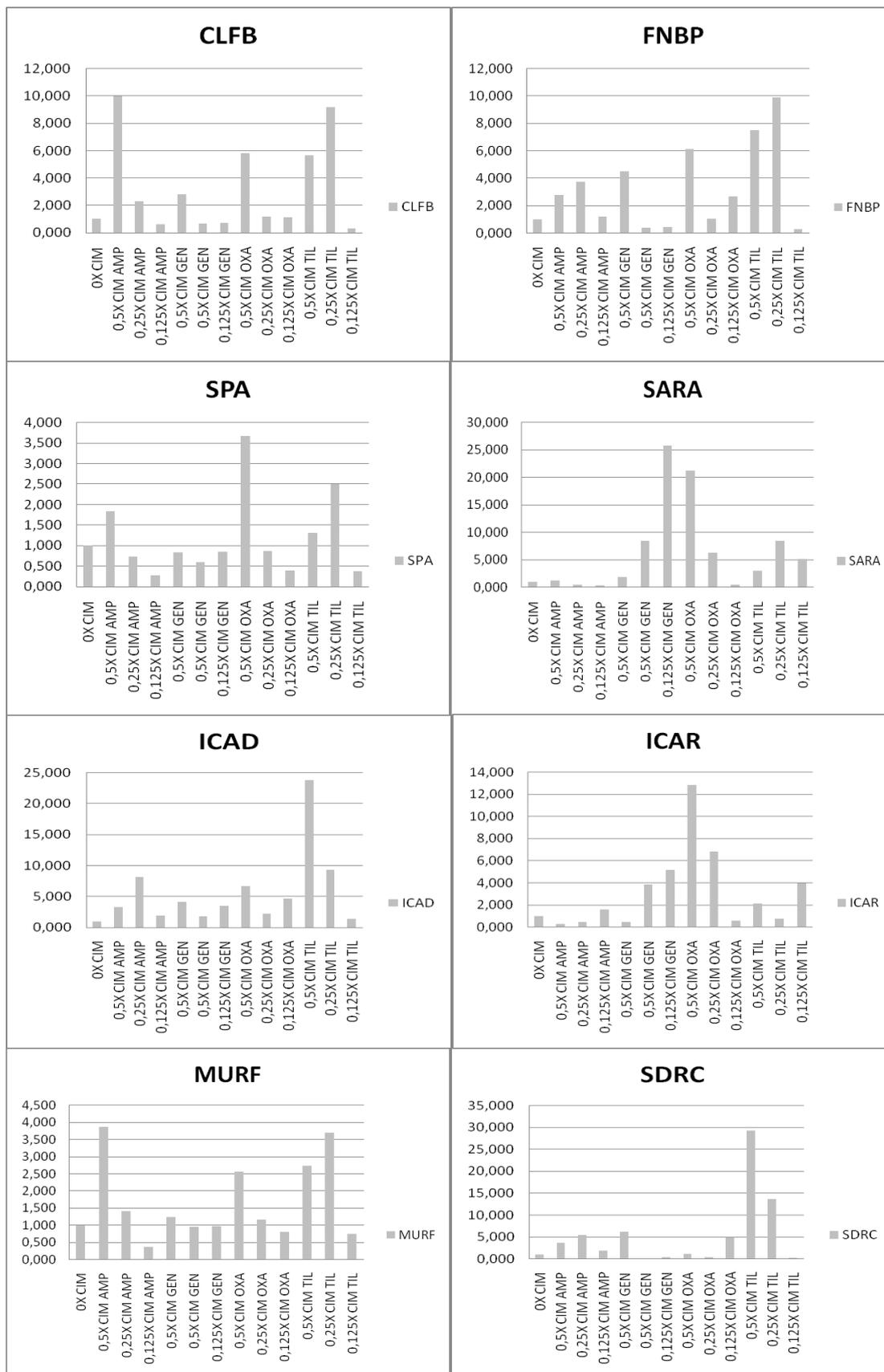
Neste trabalho, os isolados 4006 e 4125 tiveram os genes *spa*, *clfB*, *sdrC* e *fnBP*, *icaD*, *icaR*, *murF*, *sarA*, 16S rRNA e *gyrB*, avaliados quanto a alterações na expressão gênica quando submetidos a sub-CIM. Os dados da expressão relativa dos genes estão apresentados na Figuras 5 e 6. Os dados relativos à repetição biológica B estão na Figura 10A e 11A (Apêndice). Apenas os resultados que tiveram concordância entre as

duas repetições biológicas foram considerados. Entretanto, foi possível observar que o perfil de expressão foi semelhante para a maior parte das duas repetições biológicas, embora a amplitude de variação da expressão tenha sido diferente.

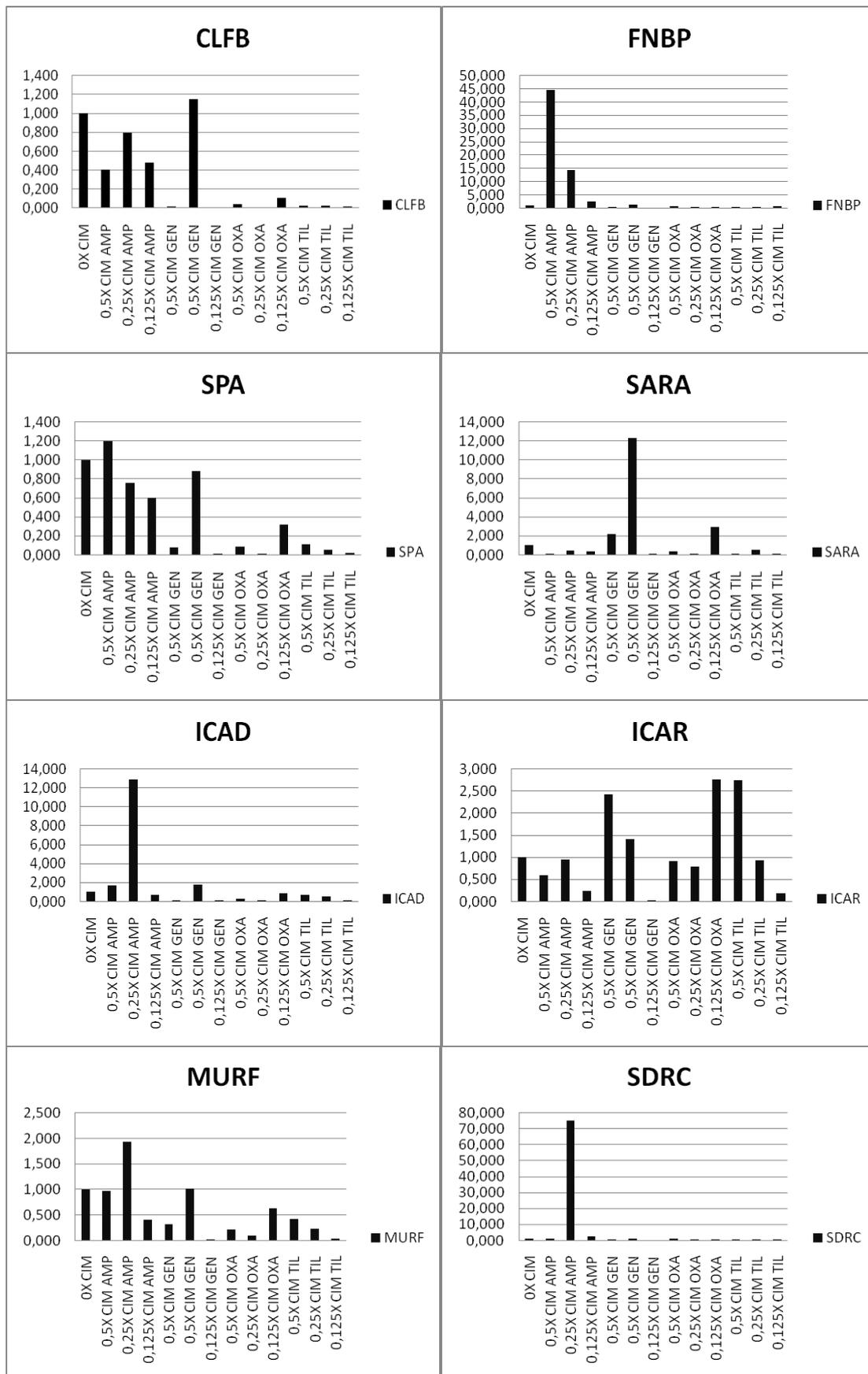
De maneira geral, para os dois isolados analisados, a grande maioria dos genes teve sua expressão aumentada quando submetidos a sub-CIM dos antibióticos. Embora 4006 e 4125 sejam representantes de uma mesma espécie, eles nem sempre mostraram comportamento semelhante em resposta à mesma condição testada, o que pode ser observado na comparação dos resultados obtidos. Todos os genes do isolado 4006 tiveram sua expressão aumentada quando submetidos à concentração de 0,50X CIM de ampicilina, exceto *icaR*, para ambos os isolados. O valor de 0,50X CIM de quase todos os antibióticos induziu a expressão dos genes que codificam as proteínas de superfície FnBP, SdrC, Spa e ClfB, resultado semelhante para 0,25X CIM de ampicilina e tilosina. Já a produção da proteína regulatória SarA foi altamente estimulada no isolado 4006 pelas concentrações dos antibióticos 0,125X CIM de gentamicina e 0,50X CIM de oxacilina. Além disso, para o isolado 4125, este gene também foi estimulado por 0,25X CIM dos antibióticos gentamicina, oxacilina e 0,125X CIM de tilosina.

O gene *icaD* foi altamente expresso quando o isolado 4006 foi submetido a 0,50X e 0,25X CIM de tilosina. Sua expressão também foi aumentada na presença de 0,50X CIM de ampicilina e oxacilina. Para o *locus* regulatório, *icaR*, a expressão foi maior nas presenças de 0,25X CIM de gentamicina e oxacilina e também para 0,125X CIM de gentamicina e tilosina para o isolado 4006. O gene *murF* teve sua expressão aumentada quando tratado com todos os antibióticos na concentração de 0,50X CIM, e para 0,25X CIM de oxacilina, ampicilina e tilosina para o mesmo isolado. O gene *icaR* teve sua expressão reduzida pela metade em 0,50X CIM de gentamicina para o isolado 4006.

A redução da expressão para o isolado 4125 foi observada em várias concentrações subinibitórias. O gene *clfB* teve sua expressão reduzida, pela metade, em 0,25X CIM e 0,125X CIM de gentamicina e 0,125X CIM de tilosina, enquanto a expressão de *spa* foi diminuída quando submetido à tratamento de 0,25X CIM de ampicilina e oxacilina. Os genes que codificam as proteínas de parede celular FnBP e Spa tiveram suas expressões aumentadas em 0,50X CIM de ampicilina. A concentração de 0,25X CIM de ampicilina também aumentou a expressão de *fnBP*. Os genes *murF*, *icaD* e *sdrC* foram induzidos apenas na presença de 0,25X CIM de ampicilina para o mesmo isolado.



**Figura 6.** Expressão relativa de genes de *Staphylococcus aureus* 4006 quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.



**Figura 7.** Expressão relativa de genes de *Staphylococcus aureus* 4125 quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.

As reduções de expressão para o *S. aureus* 4125 ocorreram para o gene *clfB*, que teve sua expressão diminuída em 0,125X CIM de oxacilina. O *fnbP* teve sua expressão reduzida em 0,25X CIM de oxacilina e 0,50X e 0,25X CIM de tilosina. *spa* foi menos expresso nas condições de 0,50X e 0,25 de CIM para gentamicina. O gene *sdrC* foi teve sua expressão reprimida quando tratado com 0,25X e 0,125X CIM de oxacilina e 0,25XCIM de tilosina

Os *loci* relacionados à produção de biofilme também foram reprimidos sob determinadas condições. Para o isolado 4125, o gene *icaD* foi menos expresso em 0,125X CIM de oxacilina e 0,50X CIM de tilosina; *icaR* teve sua expressão reprimida em 0,125X CIM de ampicilina e tilosina e 0,50X CIM de oxacilina. Para o mesmo isolado, o gene *murF* foi menos expresso quando tratado com 0,50X CIM de tilosina e ampicilina.

## 6. DISCUSSÃO

*Staphylococcus aureus* é um patógeno versátil responsável por várias infecções em diversos hospedeiros (Lowy, 1998). Devido a esta versatilidade, e pela sua importância clínica, muitos estudos são focados no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na sua patogenicidade, visando contribuir para que novas ferramentas de prevenção e tratamento possam ser criadas. Com essa perspectiva, este trabalho foi desenvolvido.

As infecções causadas por *S. aureus* são normalmente tratadas com antibióticos cujas dosagens são estabelecidas com base nos resultados de sensibilidade observados *in vitro* e em dados farmacológicos da droga usada. Porém, sabe-se que fatores inerentes ao animal e às propriedades do antimicrobiano podem afetar a concentração efetiva no sítio de (Gruet *et al.*, 2001; Barkema *et al.*, 2006).

Os estudos sobre o efeito de concentrações subinibitórias sobre a expressão de genes em *S. aureus* foram realizados para isolados humanos (Ohlsen *et al.*, 1998). Porém, a grande variação existente entre isolados de origem humana e bovina (Reinoso *et al.*, 2008), justifica a condução de novos estudos com isolados veterinários.

Neste trabalho, alguns dos genes que codificam importantes fatores de virulência foram avaliados por PCR convencional para subsidiar a escolha dos genes cujas expressões seriam avaliados por RT-PCR em tempo real. O fator mais prevalente foi a adesina *clfB*, que ocorreu em 83,5 % dos isolados, enquanto que o fator de agregação A (*clfA*), mostrou-se presente em apenas 38,8 % deles. Esses dois genes estão relacionados com a produção de proteínas que interagem com o fibrinogênio, presente na matriz extracelular da célula hospedeira. Estudos realizados por Fitzgerald *et al.* (2000) relataram a prevalência de *clfA* em 74,3 % dos isolados de mastite bovina da Irlanda e dos EUA, o que contrasta com os resultados obtidos em nossos experimentos. Entretanto, 93% dos isolados avaliados possuem um dos dois genes, indicando um importante papel desses fatores na virulência dos isolados bovinos. Como as bactérias foram obtidas de rebanhos leiteiros da região Sudeste, a alta prevalência de *clfB* pode ser sugestivo de que a prevalência dessa proteína no rebanho nacional também seja alto.

O par de *primers sdr* utilizado neste trabalho é capaz de amplificar os três genes do *locus sdr* (Francois *et al.*, 2005). Em 75,3 % (64/85) dos isolados foi possível detectar os genes *sdr*, cujas funções ainda são desconhecidas. Porém, tem sido proposto que essas proteínas exerçam diferentes papéis na patogenicidade de *S. aureus*, como

ligação a sialoproteína e ao fibrinogênio (Foster e Höök; 1998; Sabat *et al.*, 2006). A glutamil endopeptidase SspA, (protease V8) também foi bastante encontrada nos isolados (63,5 %). Além de atuar na adesão de *S. aureus* à fibronectina por alterar a composição protéica da superfície bacteriana, ela processa formas precursoras de outras enzimas secretadas e proteínas de superfície celular de ligação à fibronectina (Nickerson *et al.*, 2007), auxiliando no desenvolvimento da infecção (Arvidson, 2000).

A proteína Cna é considerada um dos principais fatores de virulência em diferentes infecções estafilocócicas (Patti *et al.*, 1994; Hienz *et al.*, 1996; Mamo *et al.*, 2000; Rhem *et al.*, 2000; Elasri *et al.*, 2002). Contudo, poucos isolados analisados apresentaram este gene, em concordância com Vancraeynest e colaboradores (2004), onde a porcentagem de isolados que continham este gene também foi pequena. Embora existam muitas informações demonstrando a importância da proteína Cna na patogênese de infecções ósseas por *S. aureus*, vários estudos clínicos indicam que esta adesina não é essencial na patogênese de infecções músculo-esqueléticas em humanos e, portanto, pode também não ser importante para infecções intramamárias em bovinos (Elasri *et al.*, 2002), o que justificaria sua baixa prevalência.

A proteína A estafilocócica (Spa) foi a primeira proteína de ligação à imunoglobulinas não-imune identificada (Forsgren e Sjöquist, 1966). A presença da proteína Spa auxilia na evasão da resposta imune do hospedeiro. Essa característica é facilitada pela capacidade dessa proteína em ligar aos fragmentos Fc das imunoglobulinas G, evitando a fagocitose e a via clássica de fixação do complemento (Atkins *et al.*, 2008). Neste estudo, o gene *spa* foi detectado em 77,6 % dos isolados estudados, o que pode ser explicado pela sua importância no processo de evasão do sistema imune, fator determinante para a patogenicidade de *S. aureus* na mastite, já que a glândula mamária apresenta várias linhas de defesa para se manter livre de patógenos (Araujo e Gheller, 2005). Outros estudos identificaram o gene *spa* em 93 a 100% (Johne e Jarp, 1988; Pozza *et al.*, 1999).

*S. aureus* pode se ligar a fibronectina pela interação de uma proteína de superfície codificada pelo gene *fnbpA*, denominada FnBPA (Signas *et al.*, 1989). Outra proteína de ligação à fibronectina, FnBPB, é codificada pelo gene *fnbpB* que está apenas 682 nucleotídeos *downstream* do primeiro (Jonsson *et al.*, 1991). Em nosso estudo a detecção dos genes *fnbpA* e *fnbpB* por meio de PCR utilizou um *primer* desenhado para alinhar as seqüências presentes em ambos os genes. Embora estudos anteriores relatem que esses genes são amplamente distribuídos, nossos dados

mostraram que apenas 43 % (37/85) dos isolados apresentaram um deles. Isso também foi mostrado para outros isolados de *S. aureus* (Foster e McDevitt, 1994).

Em síntese, a concordância dos dados sobre a prevalência das proteínas de superfície disponíveis na literatura ratificam a importância de algumas delas no processo de infecção. A discrepância de alguns valores confirma a grande variedade dos *S. aureus* e, portanto, a necessidade de estudar sua diversidade para que novas estratégias efetivas de prevenção e tratamento sejam elaboradas.

Durante os últimos anos, os avanços mais notáveis na tipagem molecular foram alcançados por meio de análises de *loci* com número variável de repetições em *tandem* (VNTR-*variable numbers of tandem repeat*), identificados nos genomas de eucariotos e procariotos (Jeffreys *et al.*, 1992; Adair *et al.*, 2000; Keim *et al.*, 2000; Farlow *et al.*, 2001). O sequenciamento do genoma de *S. aureus* indicou a presença de vários *loci* VNTR. O número das unidades de repetição de um mesmo *locus* frequentemente varia, tanto intra- quanto inter-espécie, mas pode ser detectado por PCR com *primers* flanqueando estas regiões variáveis. Sabat *et al.* (2003) descreveram um sistema de análise por multi-locus VNTR, denominado MLVA (*multi-locus VNTR analysis*), para discriminar diferentes isolados de *S. aureus* baseado na análise de cinco *loci* (*sdr*, *clfA*, *clfB*, *ssp* e *spa*) com regiões repetitivas (Sabat, *et al.*, 2003; Sabat, *et al.*, 2006), que foi posteriormente estendido por Francois e colaboradores (2005) pela utilização de mais dois *loci* (*fnBP* e *cna*). A designação MLVA foi assim modificada para MLVF (*multi-locus VNTR fingerprinting*), também conhecido como PCR *multiplex*. Este método permite a tipagem molecular de *S. aureus* e a determinação de sua diversidade e relações evolucionárias com poder de discriminação e reprodutibilidade semelhante à técnica de PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) (Strommenger *et al.*, 2006). O poder discriminatório da técnica foi comprovado neste estudo uma vez que 61 grupos diferentes foram obtidos para uma mesma espécie, quando considerada uma dissimilaridade de 20%, adotada por outros autores (Peles *et al.*, 2007).

O uso de antibióticos para o tratamento da mastite é um passo importante para o controle da doença, mas o uso inadequado pode induzir o surgimento de cepas resistentes. Diversos estudos sobre susceptibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina vêm demonstrando o aumento crescente no padrão de resistência, sendo o maior aumento observado para os  $\beta$ -lactâmicos, como a ampicilina. Neste trabalho foi observado a presença de uma cepa resistente e outra susceptível à ampicilina. A variação no padrão de susceptibilidade é relatado em diversos trabalhos realizados

utilizando *S. aureus* isolados de mastite do mundo inteiro (De Oliveira *et al.*, 2000, Brito *et al.*, 2001; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008), inclusive relatando valores de CIM ainda mais elevados (De Oliveira *et al.*, 2000).

O isolado 4125 apresentou um crescimento mais rápido do que o isolado 4006 em todas as condições. O valor equivalente a 0,125X CIM de todos os antibióticos foi o que menos alterou o crescimento das bactérias. Este resultado é esperado, uma vez que o crescimento em concentrações mais baixas de antibiótico é muito pouco alterado (Herbert *et al.*, 2001). Na concentração equivalente à metade do valor de CIM, os isolados tiveram seus crescimentos diminuídos, o que retardou a entrada na fase estacionária. Apesar dessas alterações, o padrão sigmóide, típico do crescimento de bactérias foi mantido.

Foi utilizada a técnica RT-PCR em tempo real para avaliar as possíveis alterações na expressão de vários genes relacionados com a patogênese bacteriana, como aqueles relacionados à formação de biofilme e à proteínas de superfície. Estes últimos são importantes, pois os fenômenos que ocorrem no ambiente ao redor da bactéria são percebidos por elementos presentes na superfície externa da bactéria e então comunicados ao interior desta. Essa comunicação é crucial para a sobrevivência da bactéria e, portanto para o processo de infecção (Navarre e Schneewind, 1999).

O primeiro passo para iniciar os estudos sobre expressão gênica através do RT-PCR em tempo real é a escolha do gene normalizador (endógeno). A escolha de um gene endógeno ótimo para esse tipo de análise é feita com base em sua uniformidade. Dos dois genes testados, *16S* rRNA e *gyrB*, o último se mostrou a melhor escolha, pois sua expressão foi pouco alterada pelos tratamentos com antibióticos. Um gene endógeno (normalizador) ideal não deve ter variações nos níveis de expressão sob as condições experimentais (Radonić *et al.*, 2004). Porém, estudos realizados com *S. epidermidis* mostraram que o nível de expressão de cinco *housekeeping* genes, entre eles o *16S* rRNA, variou conforme a fase de crescimento (Vandecasteele *et al.*, 2001). O mesmo foi observado para três genes em *S. aureus* (Eleaume e Jabbouri, 2004).

Todos os sete genes alvos tiveram seus valores de Ct normalizados em relação ao *gyrB*. Uma vez normalizados, os valores de Ct de cada gene tratado foram subtraídos dos valores de Ct do gene não tratado, fornecendo os dados de  $\Delta\Delta Ct$ , que foram utilizados para calcular os valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Embora não fosse esperado, foi observada uma variação nos valores de expressão quando as duas réplicas biológicas usadas para a extração de RNA total

foram comparadas. A instabilidade do RNA bacteriano e as várias etapas durante a preparação do cDNA podem contribuir para tal discrepância (Eleaume e Jabbouri, 2004). Porém, o padrão de expressão foi o mesmo para as duas réplicas.

Tem sido mostrado que os antibióticos modulam a transcrição em bactérias de maneira dose-dependente, o que também pode ser observado em nossos estudos já que diferentes concentrações subinibitórias de um mesmo antibiótico tiveram diferentes efeitos. Estudos relatam que em baixas concentrações os antibióticos podem atuar como moléculas sinalizadoras, alterando a expressão de genes específicos. À medida que a concentração aumenta genes de resposta ao estresse começam a ser ativados, enquanto que, em altas concentrações inibitórias, as mudanças podem ocorrer no crescimento na bactéria, perda de viabilidade ou desencadeando resposta que levam a morte (Fajardo e Martínez, 2008).

De maneira geral, para os dois isolados analisados, a grande maioria dos genes teve sua expressão aumentada quando submetidos às concentrações subinibitórias dos antibióticos. Enquanto os genes isolado 4006 foram induzidos em 0,50X CIM de ampicilina, o 4125 teve sua expressão alterada em 0,25X CIM para o mesmo antibiótico. Já o *locus* regulatório *icaR* foi altamente expresso apenas para o isolado 4006 quando submetido à 0,50X CIM de oxacilina. Dessa forma, as concentrações subinibitórias desse antibiótico aumentaram a expressão de *icaD* para ambos os isolados, mas ao mesmo tempo atuou sobre o isolado 4125 diminuindo a expressão de *icaR*. A estimulação de um gene relacionado com a produção de biofilme e a atenuação de um *locus* regulatório produzem o mesmo efeito de aumentar a produção de biofilme, uma vez que *icaR* tem sido considerada um repressor de *icaADBC* (Conlon *et al.*, 2002; Cerca *et al.*, 2008).

Estudos recentes tem proposto *sarA* como um regulador positivo de *icaR*. De acordo com os dados obtidos para o isolado 4006 esses dois genes tiveram sua expressão estimulada pelos mesmos antibióticos gentamicina, oxacilina e tilosina (Tormo *et al.*, 2005). O perfil de expressão de *sarA* e *icaR* foi muito semelhante. Nas mesmas concentrações dos mesmos antibióticos onde *sarA* foi induzido, *icaR* também foi mais expresso. Esses dados sugerem que esse dois *locus* possam ter regulação de sua expressão interligada.

Os dois antibióticos  $\beta$ -lactâmicos utilizados, ampicilina e oxacilina, foram os que mais aumentaram a expressão da maioria dos genes testados. Para alguns genes o padrão de expressão foi semelhante quando um mesmo isolado foi considerado.

Pesquisas têm mostrado que concentrações subinibitórias de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos aumentam a expressão de toxinas em *S. aureus* (Kernodle *et al.*, 1995). Os valores de CIM para ambos isolados foram semelhantes, diferindo apenas para a ampicilina, uma vez que esta possui um valor de CIM 80 vezes maior para o isolado 4125. Apesar dessa grande diferença, os dois tiveram a expressão alterada para vários genes quando submetido a sub-CIM. Apenas o gene *sarA* não teve sua expressão alterada pela ampicilina em ambas bactérias estudadas.

Os dois isolados tiveram a expressão de *murF* estimulada quando tratada com concentrações subinibitórias de ampicilina. Esse gene é responsável pela síntese de peptidoglicano, local de ação da ampicilina (Sobral *et al.*, 2006). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que o antibiótico, em concentrações subinibitórias atue sobre a parede celular, e em resposta a esta ação, a bactéria aumente a transcrição de *murF*, para tentar suprir a necessidade de peptidoglicano.

A sub-CIM de ampicilina (0,50X CIM) foi capaz de aumentar a expressão de *spa*, para ambos isolados, mas 0,25X CIM do mesmo antibiótico diminuiu a expressão de *spa*. A diminuição da expressão de exoproteínas como SpA resulta em um menor número destas na superfície da célula e, portanto, em um maior aumento de sítios receptores livres para o elemento C3b do sistema complemento, o que acarreta em um aumento da fagocitose (Gemmell e O'Dowd, 1983; Milatovic, 1983; Gemmell, 1984).

O locus *sar* desempenha um importante papel na regulação de proteínas de superfície (Tegmark *et al.*, 2000; Manna e Cheung, 2001; Schmidt *et al.*, 2001). Sabe-se que SarA, a principal proteína reguladora do locus *sar*, pode ativar os genes *fnb* e *clfB*, e, por outro lado pode reprimir a transcrição de *spa* (Cheung *et al.*, 1997; Chien *et al.*, 1998; Wolz *et al.*, 2000). Poucos estudos têm demonstrado as alterações provocadas por concentrações subinibitórias de antibióticos sobre adesinas, principalmente para isolados de mastite bovina. De maneira geral, estudos anteriores têm demonstrado o efeito de locus regulatórios sobre essas adesinas. Nossos resultados mostraram que a maioria das sub-CIM dos antibióticos testados foi capaz de induzir a expressão das adesinas. De acordo com os dados, para o isolado 4006, 0,50X CIM de oxacilina, tilosina e gentamicina aumentou a expressão de *sarA*, assim como a expressão de *fnBP* e *clfB*. Isso pode sugerir que os antibióticos podem ter alterado a expressão das adesinas ou, ao terem aumentado a expressão de *sarA*, e por consequência, os genes *fnBP* e *clfB*. Em contrapartida, 0,25X CIM e 0,125X CIM de gentamicina não influenciaram a expressão de *sarA*, mas foram capazes de reprimir a expressão de *fnBP* e *clfB*.

Os dois isolados de *S. aureus* usados neste estudo foram capazes de regular, embora nem sempre de forma semelhante, a expressão de importantes genes em resposta a presença de diferentes antibióticos. A regulação aumentada de fatores de virulência é preocupante, pois pode aumentar a virulência do patógeno, dificultando o combate à infecção. Estudos futuros e mais conclusivos realizados com outros patógenos serão necessários para determinar se existe um comportamento semelhante para cada classe de antibióticos e até que ponto as diferenças entre isolados devem ser um fator a ser considerado durante o tratamento. As informações geradas deverão ser analisadas juntamente com dados farmacocinéticos para auxiliar na definição de concentrações mais efetivas usadas para a otimização de terapias.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por este trabalho permitem concluir as seguintes questões:

- Das proteínas de superfície avaliadas, o gene *clfB* foi o de maior prevalência entre as 85 bactérias estudadas, seguido pelos genes *e* e *cna*. A ampla distribuição de *clfB* entre *S. aureus* isolados de mastite bovina é um indicativo da importância dessa adesina para a virulência desse patógeno.
- Um grande polimorfismo foi detectado nos genes *clfB*, *clfA*, *sdrCDE* e *cna*, o que permite que eles sejam utilizados para tipagem de *S. aureus* de origem bovina.
- Pela *PCR multiplex* foi possível agrupar os 85 isolados em 61 diferentes grupos, revelando a grande heterogeneidade genética de *S. aureus* associado à mastite bovina na Região Sudeste.
- *S. aureus* 4006 e 4125 apresentaram uma similaridade nos perfis de susceptibilidade aos antibióticos testados, exceto para ampicilina, onde o valor de CIM para o isolado 4125 foi oitenta vezes superior ao do isolado 4006.
- Os genes 16S rRNA e *gyrB*, testados como referência endógena, não apresentaram, nas condições estudadas, um comportamento ideal para estudos de RT-PCR em tempo real, o que motiva a busca por novos normalizadores.
- Alguns dos tratamentos avaliados foram capazes de aumentar a expressão de fatores de virulência em *S. aureus*, sugerindo que determinados antibióticos podem, ao contrário do esperado, ter um efeito negativo durante o tratamento de infecções intramamárias.
- A resposta de *S. aureus* 4006 e 4125 aos tratamentos utilizados nem sempre foi a mesma, o que dificulta uma generalização a respeito do efeito de concentrações subinibitórias sobre a modulação da expressão gênica em *S. aureus*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adair, D.M.; Worsham, P.L.; Hill, K.K.; Klevytska, A.M.; Jackson, P.J.; Friedlander, A.M.; Keim, P. 2000. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1516–1519.
- Adhikari, R.P.; Novick, R.P. 2005. Subinhibitory cerulenin inhibits staphylococcal exoprotein production by blocking transcription rather than by blocking secretion. *Microbiol.*, 151, 3059-3069.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48, 5-16.
- Araujo, D.; Gheller, V. 2005. Morphological, cellular and molecular aspects of the immunology of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) mammary gland: literature review. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29, 77-83.
- Arciola, C.R.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2151–2156.
- Arciola, C.R.; Bustanji, Y.; Conti, M.; Campoccia, D.; Baldassarri, L.; Samorì, B.; Montanaro, L. 2003. *Staphylococcus epidermidis*-fibronectin binding and its inhibition by heparin. *Biomater.*, 24, 3013-3019.
- Arvidson, S. 2000. Extracellular enzymes. In *Gram-Positive Pathogens*. Editado por Fischetti, V.A. Washington, DC: Amer. Soc. for Microbiol., 379–385.
- Atkins, K.; Burman, J.; Chamberlain, E.; Cooper, J.; Poutrel, B.; Bagby, S.; Jenkins, T.; Feil, E.; van den Elsen, J. 2008. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol. Immunol.*, 45, 1600–1611.
- Barkema, H. W.; Schukken, Y.H.; Zadoks, R.N. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89, 1877-95.
- Bayer, M.G.; Heinrichs, J.H.; Cheung, A.L. 1996. The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 178, 4563–4570.
- Bergey, D.H.; Holt, J.G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams e Wilkins, 9ª edition, 787p.
- Braga, P.C.; Sasso, M.D.; Sala, M.T. 2000. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. *J. Antimicrob.*

- Chemother., 45, 15-25.
- Brito M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Cordeiro, F.M.; Costa, W.A.; Fortes T.O. 2000. Caracterização de biótipos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 52, 425-429.
- Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F. 1996. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: Brito, J.R.F., Bressan, M. (eds.) Controle integrado da mastite bovina. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 68-96.
- Bruckmaier, R.M.; Ontsouka, C.E.; Blum, J.W. 2004. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. Vet. Med., 49, 283-290.
- Carvalho, G. 2008. Desempenho estadual das exportações brasileiras de lácteos: 2000 e 2007. Panorama do Leite – Seapa. Edição nº 16 do informativo eletrônico, Embrapa Gado de Leite.
- Carvalho, G.F.; Molina, L.R.; Cunha, R.P.L.; Cruz, J.C.M. 2004. Efeito da implementação de um programa de mastite. 3f. Disponível em: [http://www.rehagro.com.br/siterehagro/artigostécnicos/cd\\_noticia=713](http://www.rehagro.com.br/siterehagro/artigostécnicos/cd_noticia=713).
- Cerca, N.; Brooks, J.L.; Jefferson, K.K. 2008. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (*icaR*) by *SarA*, *sigmaB*, and *IcaR* in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 19, 6530-6533.
- Cerca, N.; Martins, S.; Sillankorva, S.; Jefferson, K.K.; Pier, G.B.; Oliveira R.; Azeredo, J. 2005. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. Appl. Environ. Microbiol., 71:8677-8682.
- Cheung, A.L.; Bayer, M.G.; Heinrichs, J.H. 1997. *sar* genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 179, 3963–3971.
- Cheung, A.L.; Eberhardt, K.; Heinrichs, J.H. 1997. Regulation of protein A synthesis by the *sar* and *agr* loci of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun., 65, 2243–2249.
- Cheung, A.L.; Koomey, J.M.; Butler, C.A.; Projan, S.J.; Fischetti, V.A. 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6462–6466.
- Chhatwal, G.S. 2002. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. Trends Microbiol. 10, 205-8.

- Chien, Y.T.; Cheung, A.L. 1998. Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 273, 2645–2652.
- Chien, Y.T.; Manna, A.C.; Projan, S.J.; Cheung, A.L. 1999. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J. Biol. Chem.*, 274, 37169–37176.
- Cho, S.H.; Naber, K.; Hacker, J.; Ziebuhr, W. 2002. Detection of the *ica*A<sub>DBC</sub> gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 19, 570–575.
- Conlon, K.M.; Humphreys, H.; O’Gara, J.P. 2002. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 216, 171–177.
- Cortes, P.R.; Pinas, G.E.; Albarracin Orío, A.G.; Echenique, J.R. 2008. Subinhibitory concentrations of penicillin increase the mutation rate to optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62, 973-977.
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322.
- Cramton, S.E.; Gerke, C.; Schnell, N.F.; Nichols, W.W.; Götz, F. 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.*, 67, 5427–5433.
- Crespilho, A.M.; Martins, M.I.; Souza, F.F.; Lopes, M.D.; Papa, F.O. 2007. Abordagem terapêutica do paciente neonato canino e felino: Aspectos relacionados a terapia intensiva, antiparasitários e antibióticos *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 31, 425-432.
- Davies, J.; Spiegelman, G.B.; Yim, G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9, 445-53.
- De Oliveira, A.P.; Watts, J.L.; Salmon, S.A.; Aarestrup, F.M. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.*, 83, 855-62.
- Deluyker, H.A.; Van Oye, S.N.; Boucher, J.F. 2005. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 88, 604-614.
- Diarra, M. S.; Malouin, F., Jacques, M. 1999. Postantibiotic and physiological effects of tilmicosin, tylosin, and apramycin at subminimal and suprainhibitory concentrations on some swine and bovine respiratory tract pathogens. *Int. J.*

- Antimicrob. Agents, 12, 229-37.
- Dias, R.V.C. 2007. Principal methods for diagnostics and control of dairy mastitis. *Acta Vet. Bras.*, 1, 23-27.
- Dunman, P.M.; Murphy, E.; Haney, S.; Placios, D.; Tucker-Kellogg, G.; Wu, S. 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol.*, 183, 7341–7353.
- Dziewanowska, K.; Patti, J.M.; Deobald, C.F.; Bayles, K.W.; Trumble, W.R.; Bohach, G.A. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.*, 67, 4673-4678.
- Elasri, M.O., Thomas, J.R., Skinner, R.A., Blevins, J.S., Beenken, K.E., Nelson, C.L. and Smelter, M.S. 2002. *Staphylococcus aureus* collagen adhesion contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone*, 30, 275–280.
- Eleaume, H.; Jabbouri, S. 2004. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *J. Microbiol. Methods*, 59, 363-370.
- Fajardo, A.; Martínez, J.L. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11, 161-167.
- Farlow, J.; Smith, K.L.; Wong, J.; Abrams, M.; Lytle, M.; Keim, P. 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3186–3192
- Fitzgerald, J.R.; Hartigan, P.J.; Meaney, W.J.; Smyth, C.J. 2000. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 1028-1037.
- Fonseca, L.F.L.; Santos, M.V. 2000. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo, Lemos Editorial. 175p.
- Forsgren, A., Sjöquist, J. 1966. “Protein A” from *S. aureus*. I. Pseudoimmune reaction with human gamma-globulin. *J. Immunol.*, 97, 822–827.
- Foster, T.J.; Höök, M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, 6, 484-488.
- Francois, P.; Huyghe, A.; Charbonnier, Y.; Bento, M.; Herzig, S.; Ivan Topolski, I.; Fleury, B.; Lew, D.; Vaudaux, P.; Harbarth, S.; Leeuwen, W.; Belkum, A.; Blanc, D.; Pittet, D. e Schrenzel, J. 2005. Use of an automated multiple-locus,

- variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol., 43, 3346 – 3355.
- Frank, K.L.; Reichert, E.J.; Piper, K. E.; Patel, R. 2007. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother., 51, 888-895.
- Freitas, M.F.L.; Pinheiro Junior, J.W.; Stamford, T.L.M.; Rabelo, S.S.A.; Silva, D.R.; Silveira Filho, V.M.; Santos, F.G.B.; Sena, M.J.; Mota, R.A. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. Arq. Inst. Biol., 72, 171-177.
- Gehring, R.; Smith, G.W. 2006. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. J. Vet. Pharmacol. Ther., 29, 237-41.
- Gemmell, C.G. 1984. Clindamycin and its action on the susceptibility of pathogenic bacteria to phagocytosis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 43, 17–23.
- Gemmell, C.G.; A. O’Dowd. 1983. Regulation of protein A biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by certain antibiotics: its effect on phagocytosis by leukocytes. J. Antimicrob. Chemother., 12, 587–597.
- Gentilini, E.; Denamiel, G.; Llorente, P.; Godaly, S.; Rebuelto, M.; DeGregorio, O. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci., 83, 1224–1227.
- Gerber, M.; Walch, C.; Löffler, B.; Tischendorf, K.; Reischl, U.; Ackermann, G. 2008. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol., 57, 776-83.
- Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. Mol. Microbiol., 43, 1367–1378.
- Gruet, P.; Maincent, P.; Berthelot, X.; Kaltsatos, V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv. Drug Deliv. Rev., 50, 245-59.
- Grundmeier, M.; Hussain, M.; Becker, P.; Heilmann, C.; Peters, G.; Sinha, B. 2004. Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell

- wall anchor function. *Infect. Immun.*, 72, 7155-7163.
- Haslinger-Löffler, B.; Kahl, B.C.; Grundmeier, M.; Strangfeld, K.; Wagner, B.; Fischer, U.; Cheung, A.L.; Peters, G.; Schulze-Osthoff, K.; Sinha, B. 2005. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell. Microbiol.*, 7, 1087–1097.
- Hauck, C.R.; Ohlsen, K. 2006. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9, 5-11.
- Henderson-Begg, S.K.; Livermore, D.M.; Hall, L.M. 2006. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57, 849-854.
- Herbert, S.; Barry, P.; Novick, R.P. 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 5, 2996-3003.
- Hienz, S.A.; Schennings, T.; Heimdahl, A.; Flock, J.I. 1996. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.*, 174, 83–88.
- Hillerton, J.E.; Kliem, K.E. 2002. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *J. Dairy Sci.*, 85, 1009–1014.
- Houben, E.H.; Dijkhuizen, A.A.; Van Arendonk, J.A.; Huirne, R.B. 1993. Short- and long-term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 76, 2561–2578.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2007. Produção da Pecuária Municipal. <http://www.ibge.gov.br/estadosat>.
- Jarraud, S.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Lina, G.; Meugnier, H.; Forey, F.; Nesme, X.; Etienne, J.; Vandenesch, F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (Alleles), and human disease. *Infect. Immun.*, 70, 631–641.
- Jeffreys, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. 1992. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Bio/Technol.*, 24, 467–472.
- Johne, B. e Jarp, J. 1988. A rapid assay for protein-A in *Staphylococcus aureus* strains, using immunomagnetic monosized polymer particles. *Acta Pathol. Microbiol. et Immunol. Scandinavica*, 96, 43-49.

- Jones, G.M.; Pearson, R.E.; Clabaugh, G.A.; Heald, C.W. 1984. Relationships between somatic cell counts and milk production. *J. Dairy Sci.*, 67, 1823.
- Jonsson, K.; Signas, C.; Muller, H. P.; Lindberg, M. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem.*, 202, 1041–104.
- Joshi, S.; Gokhale, S. 2006. Status of mastitis as an emerging disease in improved and periurban dairy farms in India. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1081, 74-83.
- Kahl, B.; Herrmann, M.; Everding, A.S.; Koch, H.G.; Becker, K.; Harms, E.; Proctor, R.A.; Peters, G. 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.*, 177, 1023-1029.
- Kapur, V.; Sisco, W.; Greer, R.; Whittam, T.; Musser, J. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 376–380.
- Keim, P.; Price, L.B.; Klevytska, A.M.; Smith, K. L.; Schupp, J.M.; Okinaka, R.; Jackson, P. J.; Hugh-Jones, M.E. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, 182, 2928–2936.
- Kernodle, D.S.; McGraw, P.A.; Barg, N.L.; Menzies, B.; Voldari, E. R.K.R.; Harshman, S. 1995. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces  $\alpha$ -toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J. Infect. Dis.*, 172, 410–419.
- Korem, M.; Gov, Y.; Rosenberg, M. 2009. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb. Pathog.*, 48, 74–84.
- Lacerda Jr., P.M.G.; Zani Neto, L.; Freitas, D.C. 1953. Estudos sobre as mastites bovinas - contribuição ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas. *Rev. Fac. Med. Vet.*, 5, 55-64.
- Lange, C.; Cardoso, M.; Senczeka, D.; Schwarza, S. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, 67, 127-141.
- Li, D.; Renzoni, A.; Estoppey, T.; Bisognano, C.; Francois, P.; Kelley, W.L.; Lew, D.P.; Schrenzel, J.; Vaudaux, P. 2005. Induction of fibronectin adhesins in

- quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by sigma B transcription factor activity is mediated by two separate pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 916-924.
- Lin, J.T.; Connelly, M.B.; Amolo, C.; Otani, S.; Yaver, D.S. 2005. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics that inhibit protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 1915-1926.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method.. *Methods*, 25, 402-8.
- Lowy, F.D.1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.*, 339, 520-532.
- Ma, Y.; Ryan, C.; Barbano, D.M.; Galton, D.M.; Rudan, M.A.; Boor, K.J. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.*, 83, 264-274.
- Mamo, W., Jonsson, P.; Flock, J. I.; Lindberg, M.; Muller, H. P.; Wadstrom, T.; Nelson, L. 1994. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine*, 12, 988–992.
- Manna, A.; Cheung, A.L. 2001. Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 69, 885–896.
- McAleese, F.M.; Walsh, E.J.; Sieprawska, M.; Potempa, J.; Foster, T.J. 2001. Loss of clumping factor b fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J. Biol. Chem.*, 276, 29969–29978.
- Mccrea, K.W.; Hartford, O.; Davis, S.; Eidhin, D.N.; Lina, G.; Speziale, P. 2000. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol.*, 146, 1535–1546.
- Melchior, M.B.; Vaarkamp, H.; Fink-Gremmels, J. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.*, 171, 398–407.
- Milatovic, D.; Braveny, I.; Verhoef, J. 1983. Clindamycin enhances opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24: 413–417.
- Morandi, S.; Brasca, M.; Lodi, R.; Cremonesi, P.; Castiglioni, B. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol.*, 124, 66–72.

- Moretain, J.P.; Boisseau, J. 1989. Excretion of penicillins and cephalixin in bovine milk following intramammary administration. *Food Add. Contamin.*, 6, 79-90.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 3rd ed. Approved Standards. NCCLS Doc. M7-A3. Natl. Com. Clin. Lab. Stand., Villanova, PA.
- National Mastitis Council. 2001. Current concepts of bovine mastitis. 4th ed. Madison. 64 p.
- Navarre, W.W.; Schneewind, O. 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol.*, 63, 174–229
- Ní Eidhin, D.; Perkins, S.; Francois, P.; Vaudaux, P.; Hook, M.; Foster, T.J. 1994. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 30, 245–257.
- Nickerson, N.; Prasad, L.; Jacob, L.; Delbaere, L.; McGavin, M. 2007. Activation of the SspA Serine Protease Zymogen of *Staphylococcus aureus* Proceeds through Unique Variations of a Trypsinogen-like Mechanism and Is Dependent on Both Autocatalytic and Metalloprotease-specific Processing. *The J. Of Biol. Chem.*, 47, 34129–34138.
- Novick, R.P., Geisinger, E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42, 541-64.
- Ochoa-Zarzosa, A.; Loeza-Lara, P.D.; Torres-Rodríguez, F.; Loeza-Ángeles, H.; Mascot-Chiquito, N.; Sánchez-Baca, S.; López-Meza, J.E. 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94, 199-206.
- Ohlsen, K.; Ziebuhr, W.; Koller, K.P.; Hell, W.; Wichelhaus, T.A.; Hacker, J. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11, 2817-2823.
- Oliveira, D.S.; Timm, C.D. 2006. Composição do leite com instabilidade da caseína. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 26, 259-263.
- Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). 2007. Previsões para o mercado mundial de leite e produtos lácteos.

- O'Seaghda, M.; van Schooten, C.J.; Kerrigan, S.W.; Emsley, J.; Silverman, G.J.; Cox, D.; Lenting, P.J.; Foster, T.J. 2006. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. FEBS J., 273, 4831-41.
- Owens, W.; E.; Nickerson, S.; C.; Boddie, R.; L.; Tomita, G.; M.; Ray, C.; H. 2001. Prevalence of mastitis in dairy heifers and effectiveness of antibiotic therapy. J. Dairy Sci., 84, 814–817.
- Owens, W.E.; Nickerson, S.C.; Ray, C.H. 1999. Efficacy of parenterally or intramammarily administered tilmicosin or ceftiofur against *Staphylococcus aureus* mastitis during lactation. J. Dairy Sci., 82, 645-647.
- Patti, J.M.; Bremell, T.; Krajewska-Pietrasik, D.; Abdelnour, A.; Tarkowski, A.; Ryden, C.; Höök, M. 1994. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. Infect. Immun., 62, 152–161.
- Patti, J.M.; Allen, B.L.; McGavin, M.J.; Höök, M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu. Rev. Microbiol. 48, 585-617.
- Peacock, S.J.; Day, N.P.; Thomas, M.G.; Berendt, A.R.; Foster, T.J. 2000. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. J. Infect., 41, 23–31.
- Peles, F.; Wagner, M.; Varga, L.; Hein, I.; Rieck, P.; Gutser, K.; Keresztúri, P.; Kardos, G.; Turcsányi, I.; Béri, B.; Szabó, A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. Int. J. Food Microbiol., 2, 186-93.
- Petrovski, K. R.; Trajcev, M.; Buneski, G. 2006. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. J. S. Afr. Vet. Assoc., 77, 52-60.
- Pitkala, A.; Haveri, M.; Pyorala, S. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci., 87, 2433-2441.
- Pospiech, A., Neumann, B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. Trends Genet., 11: 217-218.
- Pozza, M.; Ricci, A.; Vicenzoni, G. 1999. Protein A gene polymorphism analysis in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis. Journal of Dairy Research, 66, 449-453.

- Proctor, R.A.; Balwit, J.M.; Vesga, O. 1994. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect. Agents Dis.*, 3, 302-312.
- Pyörälä, S.; Pyörälä, E. 1998. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 212, 407-412.
- Rachid, S.; Ohlsen, K.; Witte, W.; Hacker, J.; Ziebuhr, W. 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 3357–3363.
- Radonić, A.; Thulke, S.; Mackay I.M.; Landt, O.; Siegert, W.; Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 4, 856-862.
- Rainard, P. 2005. Tackling mastitis in dairy cows. *Nature Biotech.*, 23, 430-432.
- Ramos, J. L.; Martinez-Bueno, M.; Molina-Henares, A. J.; Teran, W.; Watanabe, K.; Zhang, X.; Gallegos, M. T.; Brennan, R.; Tobes, R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69, 326–356.
- Reinoso, E.B.; El-Sayed, A.; Lammler, C.; Bogni, C.; Zschock, M. 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol. Res.*, 163, 314—322.
- Rhem, M.; Lech, E.; Patti, J.; McDevitt, D.; Hook, M.; Jones, D.; Wilhelmus, K. 2000. The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. *Infect. Immun.*, 68, 3776–3779.
- Ruegg, P. 2005. Premiums, production and pails of discarded milk how much money does mastitis cost you? *Resources Milk Money*, 3, 50-56.
- Rupp, M.; E.; Hamer, K.; E. 1998. Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41, 155–161.
- Sabat, A., Malachowa, N., Miedzobrodzki, J., Hryniewicz, W. 2006. Comparison of PCR-Based Methods for Typing *Staphylococcus aureus* Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 3804–3807.
- Sabat, A.; Krzyszton-Russjan, J.; Strzalka, W.; Filipek, R.; Kosowska, K.; Hryniewicz,

- W.; Travis, J.; Potempa, J. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphisms and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1801-1804.
- Salmon, S.A.; Watts, J.L.; Aarestrup, F.M.; Pankey, J.W.; Yancey, R.J. 1998. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J. Dairy Sci.*, 81, 570–578.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandholm, M.; Kaartinen, L.; Pyörala, S. 1990. Bovine mastitis-why does antibiotic therapy not always work? An overview. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 13, 248-60.
- Schmidt, K.A.; Manna, A.C.; Gill, S.; Cheung, A.L. 2001. SarT, a repressor of  $\alpha$ -hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 69, 4749– 4758.
- Sears, P.M.; McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 19, 171-185.
- Shaw, K.J.; Miller, N.; Liu, X.; Lerner, D.; Wan, J.; Bittner, A.; Morrow, B.J. 2003. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 5, 105-122.
- Shpigel, N.Y.; Winkler, M.; Ziv, G.; Saran, A. 1998. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 35, 1-9.
- Signas, C., Raucci, G.; Jonsson, K.; Lindgren, P. E.; Anantharamaiah, G. M.; Höök, M.; Lindberg, M. 1989. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 699–703.
- Smith, E.M.; Green, L.E.; Medley, G.F.; Bird, H.E.; Fox, L.K.; Schukken, Y.H.; Kruze, J.V.; Bradley, A.J.; Zadoks, R.N.; Dowson, C.G. 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 4737–4743.
- Sobral, R.G.; Ludovice, A.M.; de Lencastre, H. Tomasz A. 2006. Role of *murF* in cell wall biosynthesis: isolation and characterization of a *murF* conditional mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.*, 7, 2543-2553.
- Sol, J.; Sampimon, O.C.; Barkema, H.W.; Schukken, Y.H. 2000. Factors associated

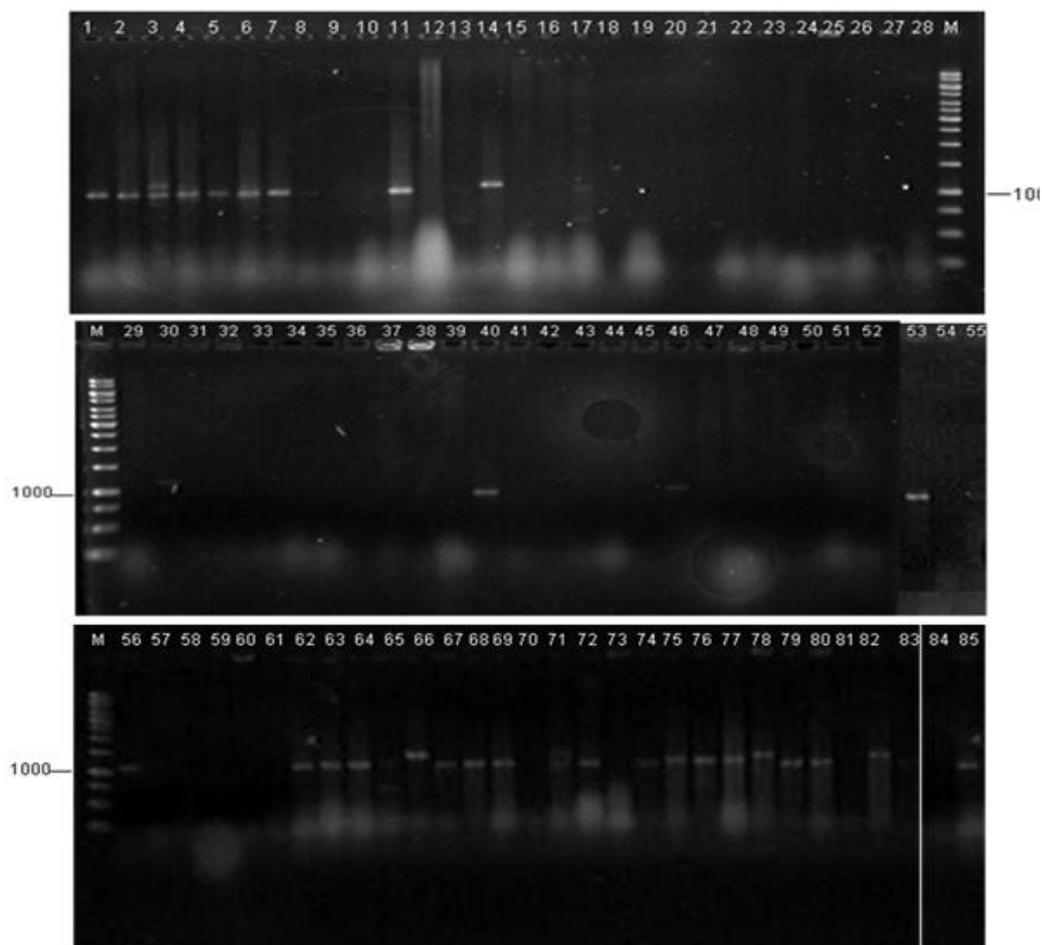
- with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci., 83, 278-84.
- Sommerhauser, J.; Kloppert, B.; Wolter, W.; Zschock, M.; Sobiraj, A.; Failing, K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. Vet. Microbiol., 96, 91-102.
- Soto, S.M.; Jimenez de Anta, M.T.; Vila, J. 2006. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or independent pathways, respectively. Antimicrob. Agents Chemother., 50, 649-653.
- Ster, C.; Gilbert, F. B.; Cochard, T.; Poutrel, B. 2005. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. Mol. Cel. Probes, 19, 227–235.
- Strommenger, B.; Kettlitz, C.; Weniger, T.; Harmsen, D.; Friedrich, A. W.; Witte, W. 2006. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol., 44, 2533–2540.
- Sutra, L.; Poutrel, B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol, 40, 79-89.
- Tan, X.; Jiang, Y.W.; Huang, Y.J.; Hu, S.H. 2009. Persistence of gentamicin residues in milk after the intramammary treatment of lactating cows for mastitis. J. Zhejiang Univ. Sci. B., 10, 280-4.
- Tanaka, M.; Hasegawa, T.; Okamoto, A.; Torii, K.; Ohta, M. 2005. Effect of antibiotics on group A *Streptococcus* exoprotein production analyzed by two dimensional gel electrophoresis. Antimicrob. Agents Chemother., 49, 88-96.
- Tegmark, K.; Karlsson, A.; Arvidson, S. 2000. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol., 37, 398–409.
- Tormo, M.A.; 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., 7, 2348-2356.
- Urech, E.; Puhan, Z.; Scha Llibaum, M. 1999. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. J. Dairy Sci., 82, 2402-2411.

- Vancraeynest, D.; Hermans, K.; Haesebrouck, F. 2004. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet. Microbiol.*, 103, 241-247.
- Vandecasteele, S.J.; Peetermans, W.E.; Merckx, R.; Van Eldere, J. 2001. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *J. Bacteriol.*, 183, 7094– 7101.
- Veiga, V.M.; Teixeira, M.R.; Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F. 1994. Manejo sanitário, prevenção e controle de parasitoses e mamite em rebanhos de leite. Furlong, J. Org. EMBRAPA, CNPGL. 70p
- von Eiff, C.; Friedrich, A.W.; Peters, G.; Becker, K. 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.*, 49, 157–162.
- Watiaux, M. 1996. Lactancia e ordeno <http://babcock.cals.wisc.edu/des/lacS/mastitis.html>.
- Whittem, T.; Gaon, D. 1998. Principles of antimicrobial therapy. *Vet Clin North Am: Small Anim. Pract.*, 28, 197-214.
- Wilson, D.J.; Gonzalez, R.N.; Case, K.L. 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.*, 82, 1664-1670.
- Zadoks, R.; van Leeuwen, W.; Barkema, H.; Sampimon, O.; Verbrugh, H.; Schukken, Y.; van Belkum, A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1931–1939.
- Ziebuhr, W.; Heilmann, C.; Gotz, F.; Meyer, P.; Wilms, K.; Straube, J.; Hacker, J.; 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infec. Immun.*, 65, 890–896.

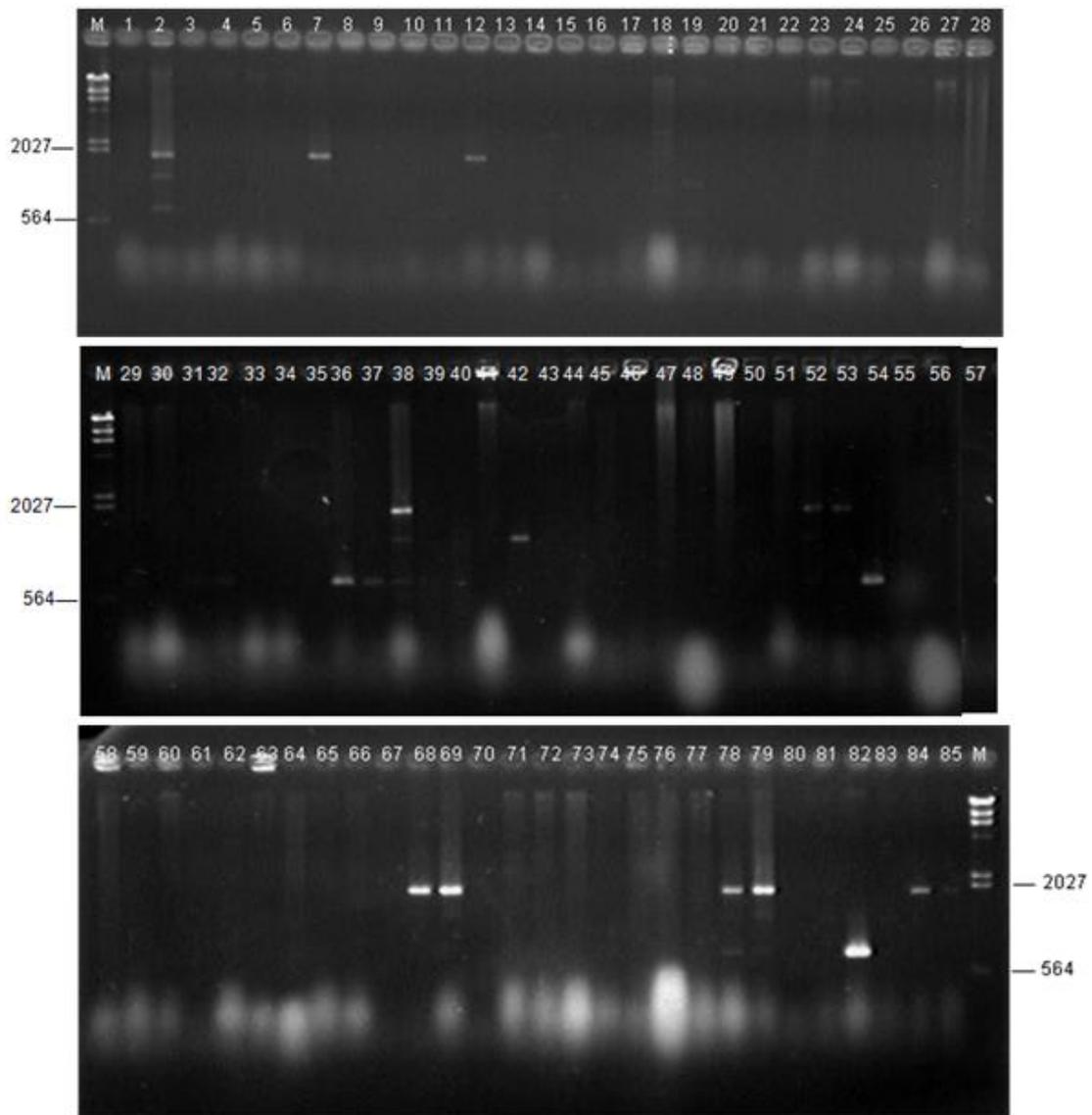
## APÊNDICE

Números correspondentes aos oitenta e cinco isolados de *S. aureus* utilizados neste estudo fazem parte da coleção de culturas da Embrapa Gado de leite, Juiz de Fora, MG e foram obtidos de animais com manifestação de mastite bovina em rebanhos leiteiros da região Sudeste.

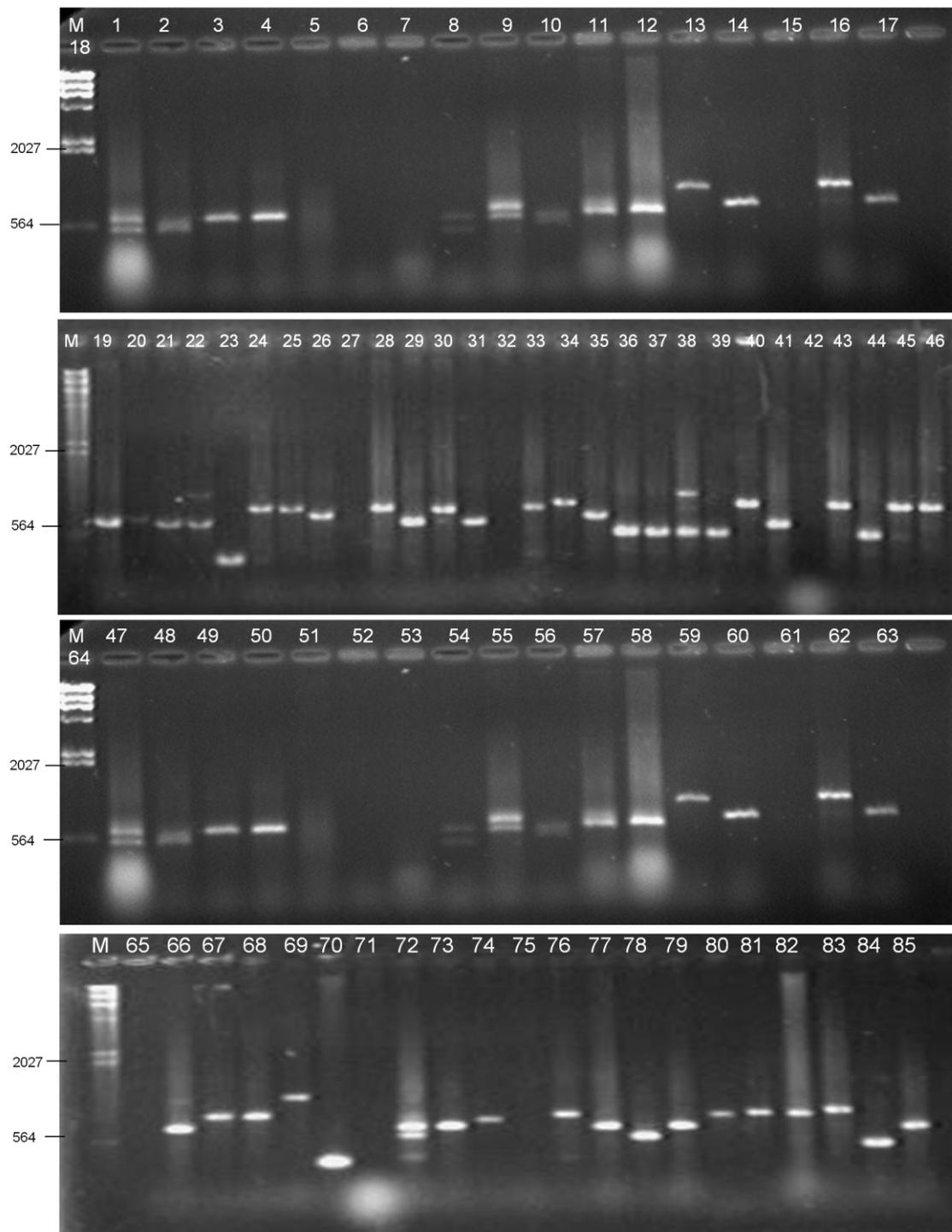
01-3820, 02-3654, 03-3988, 04-3017, 05-3923, 06-4131, 07-3985, 08-2926, 09-3596, 10-3702, 11-3019, 12-3703, 13-3022, 14-3008, 15-3007, 16-4191, 17-3212, 18-3885, 19-3907, 20-2027, 21-3570, 22-3811, 23-2878, 24-3006, 25-3652, 26-3987, 27-3974, 28-2927, 29-3930, 30-3900, 31-4628, 32-4627, 33-4130, 34-2979, 35-3627, 36-3829, 37-3870, 38-3916, 39-3992, 40-3993, 41-4006, 42-4030, 43-4070, 44-4081, 45-4082, 46-4098, 47-4119, 48-4163, 49-4182, 50-4313, 51-4745, 52-4759, 53-4769, 54-4651, 55-4118, 56-4125, 57-4162, 58-4156, 59-4236, 60-4746, 61-4784, 62-4716, 63-4770, 64-4760, 65-3828, 66-4783, 67-4072, 68-4051, 69-4157, 70-4052, 71-4784, 72-4074, 73-4192, 74-4184, 75-4235, 76-4124, 77-4005, 78-4628, 79-4018, 80-4075, 81-3166, 82-3916, 83-4766, 84-3821, 85-3886.



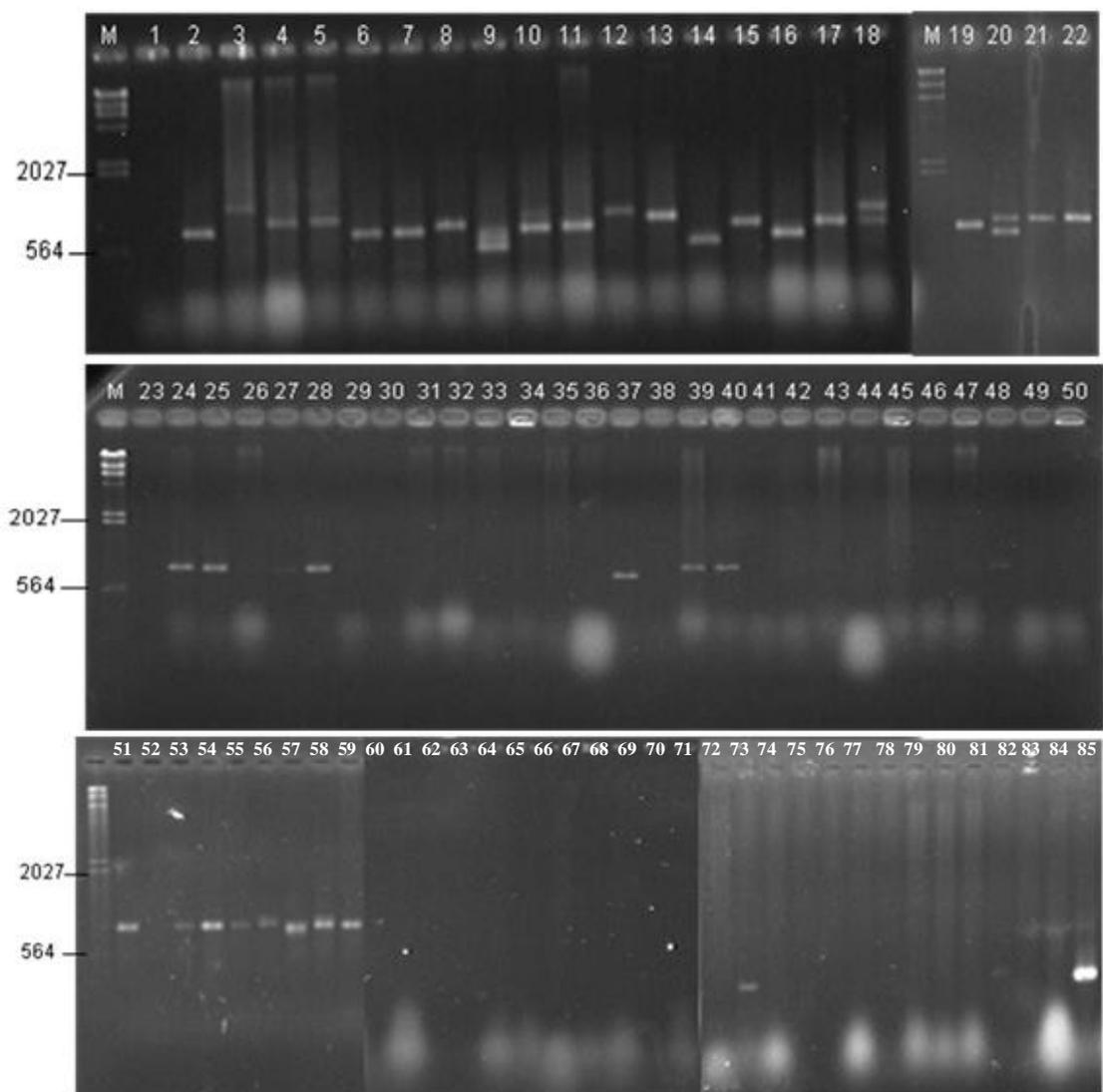
**Figura 1A.** Avaliação da presença do gene *clfB* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%. Número da canaleta corresponde à identificação do isolado.



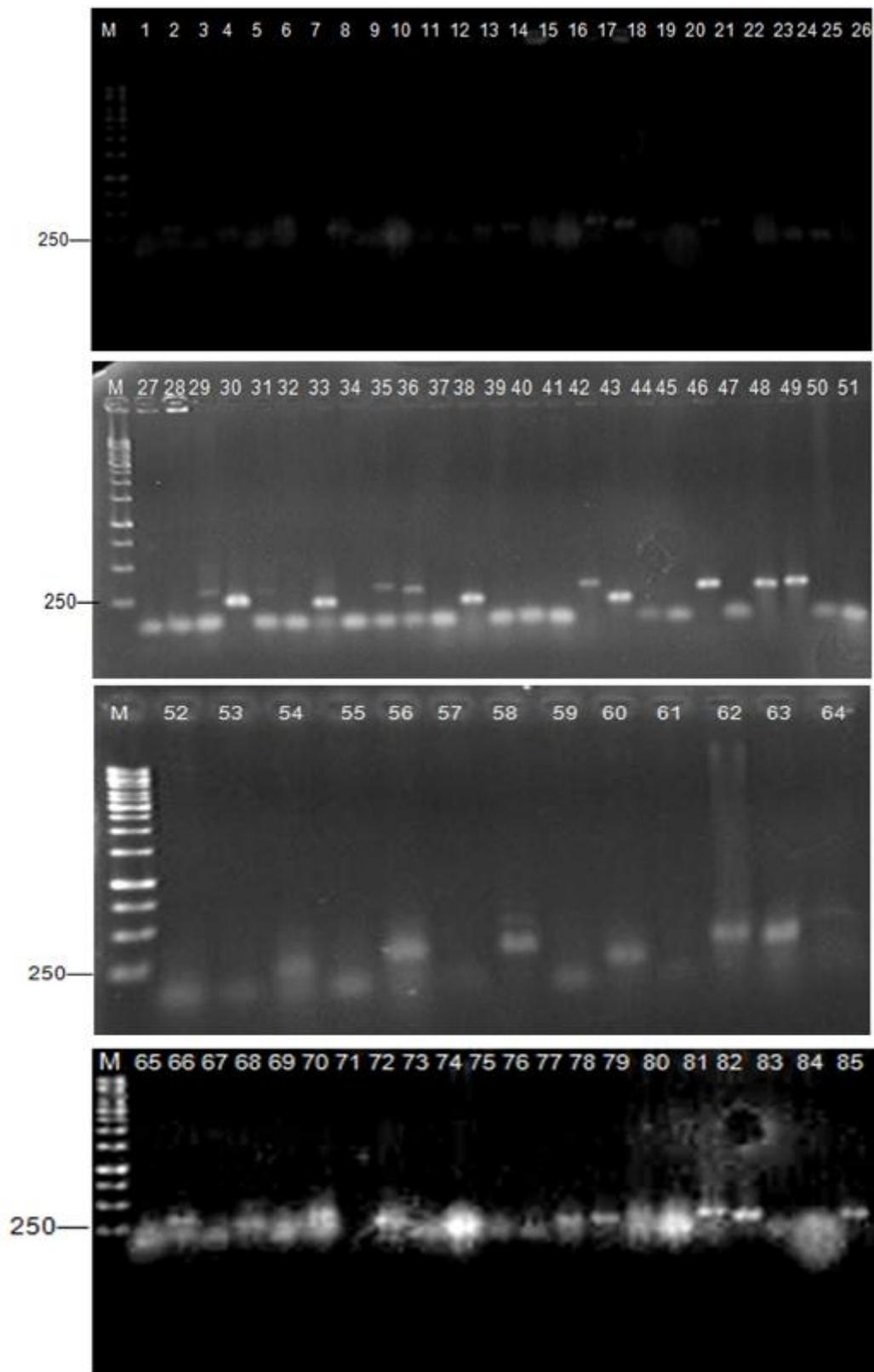
**Figura 2A.** Avaliação da presença do gene *cna* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1 Número da canaleta corresponde à identificação do isolado.



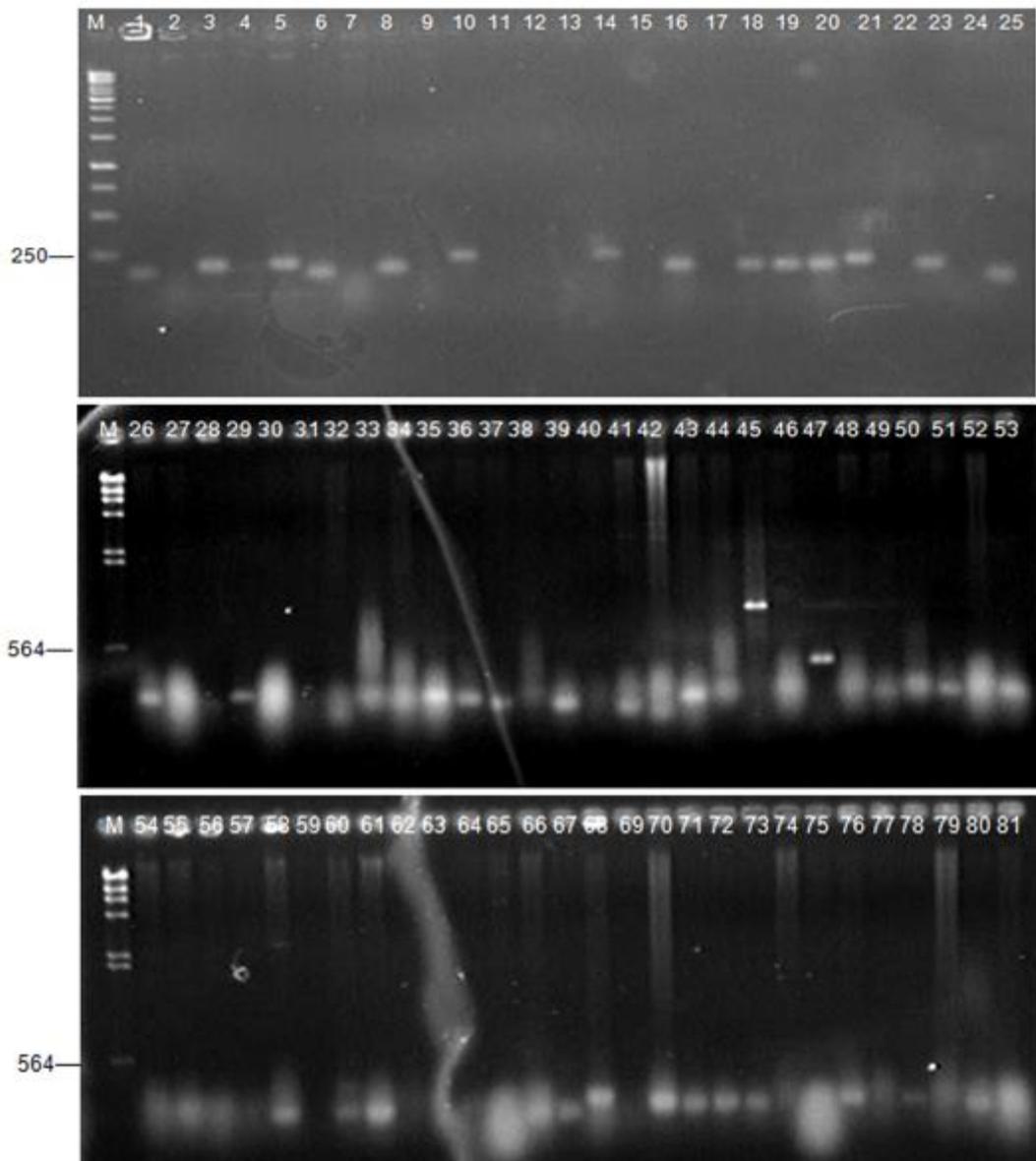
**Figura 3A.** Avaliação da presença do gene *clfB* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%. Número da canaleta corresponde à identificação do isolado.



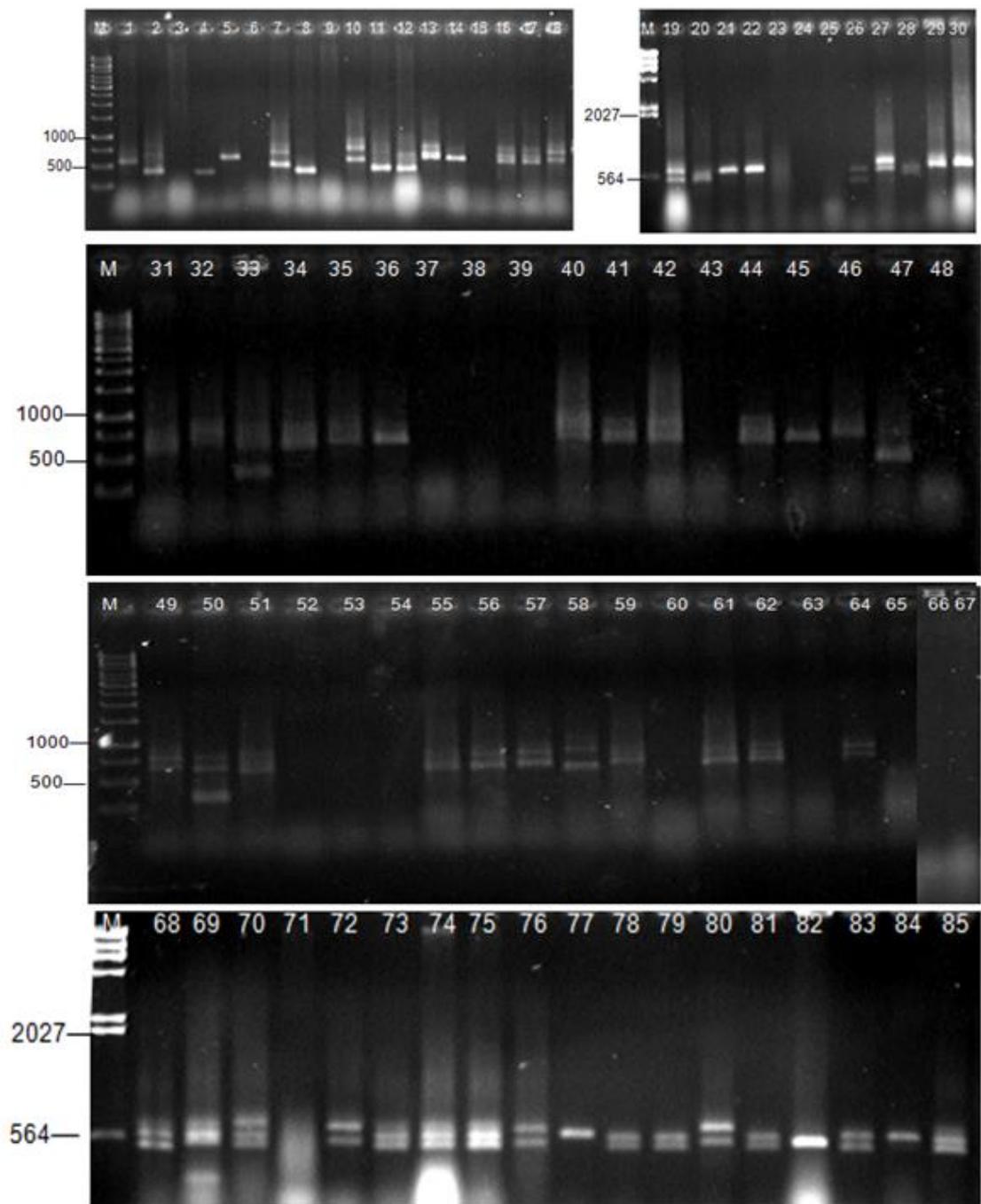
**Figura 4A.** Avaliação da presença do gene *fnBP* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%. Número da canaleta corresponde à identificação do isolado.



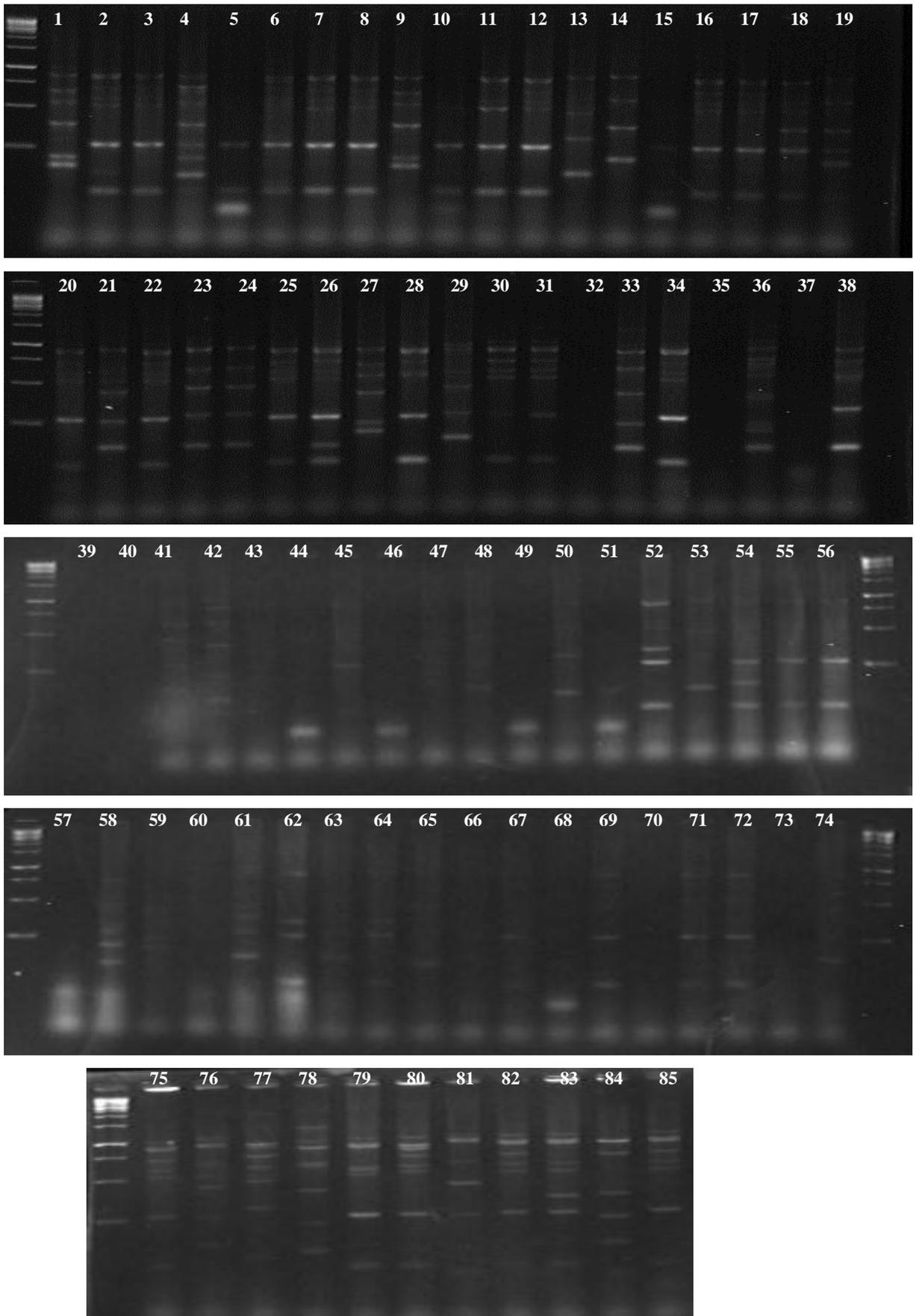
**Figura 5A.** Avaliação da presença do gene *spA* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%. Número da canleta corresponde à identificação do isolado.



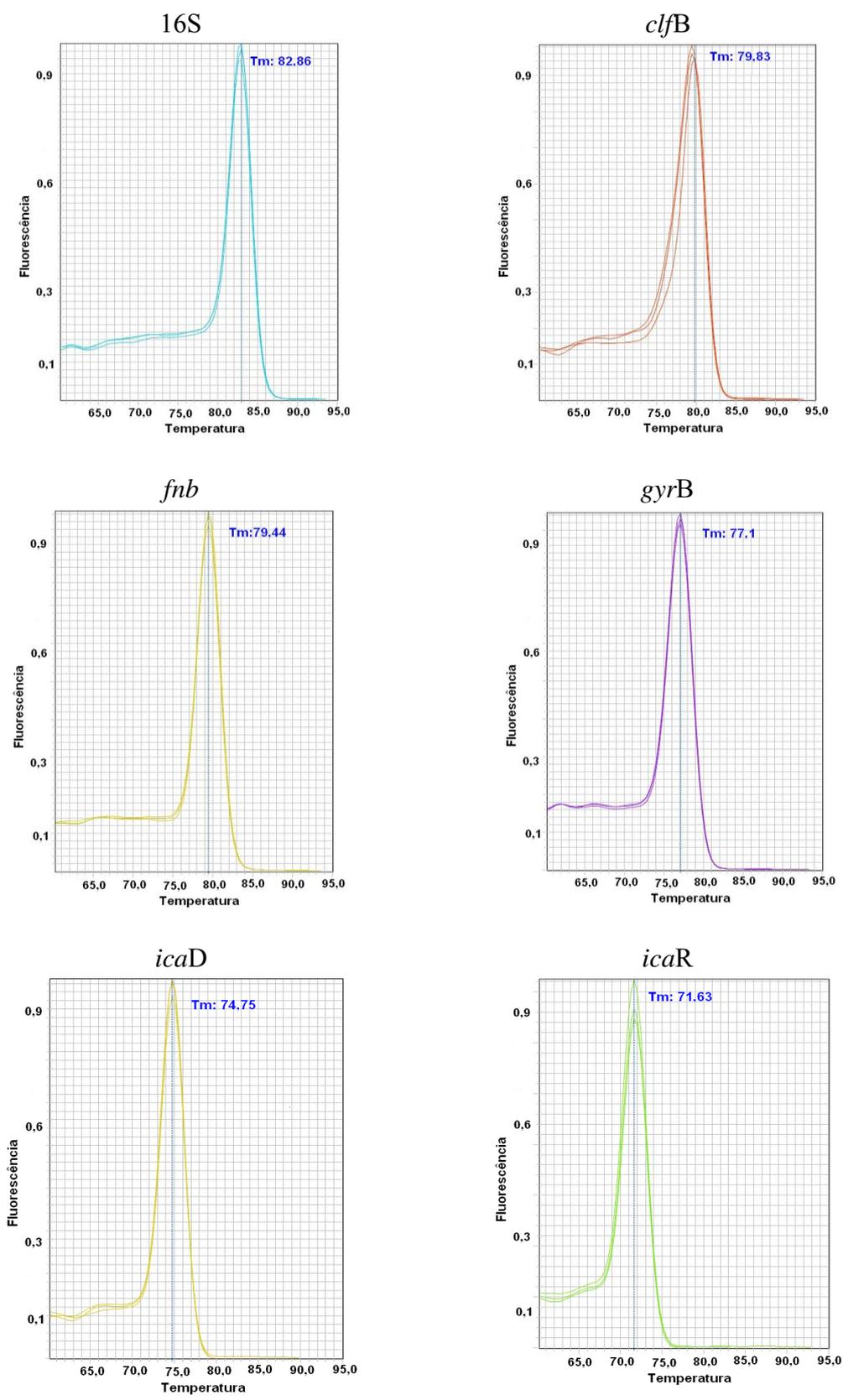
**Figura 6A.** Avaliação da presença do gene *sspA* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%. Número da canaleta corresponde à identificação do isolado.



**Figura 7A.** Avaliação da presença do gene *sdrCDE* em isolados de *Staphylococcus aureus*, por meio de análise eletroforética, em gel de agarose 1%. Número da canaleta corresponde à identificação do isolado.

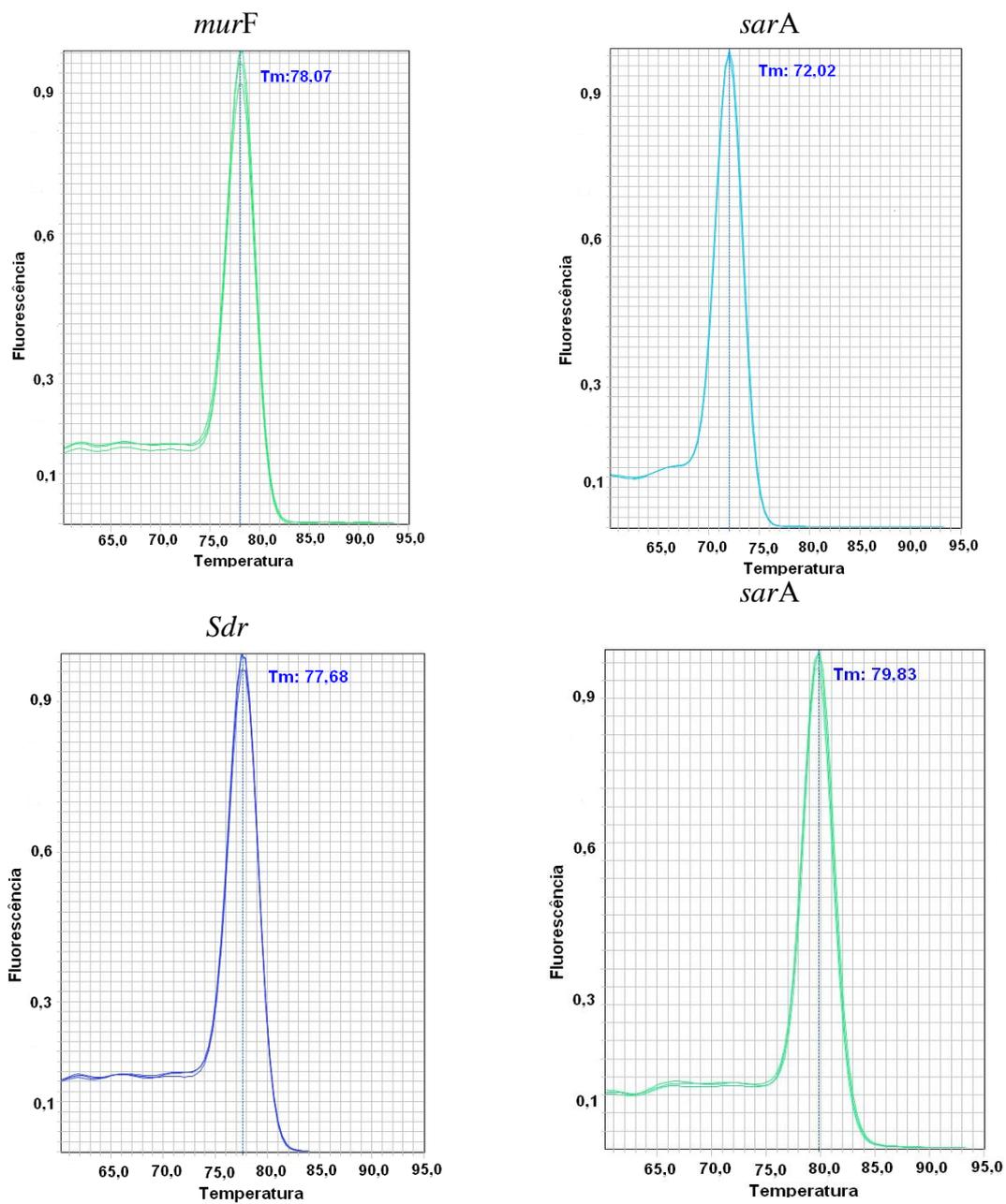


**Figura 8A.** Avaliação do padrão de bandas de isolados de *S. aureus* por meio da reação em cadeia da polimerase *multiplex* em gel de agarose 2 %. Número da canaleta corresponde à identificação do isolado.

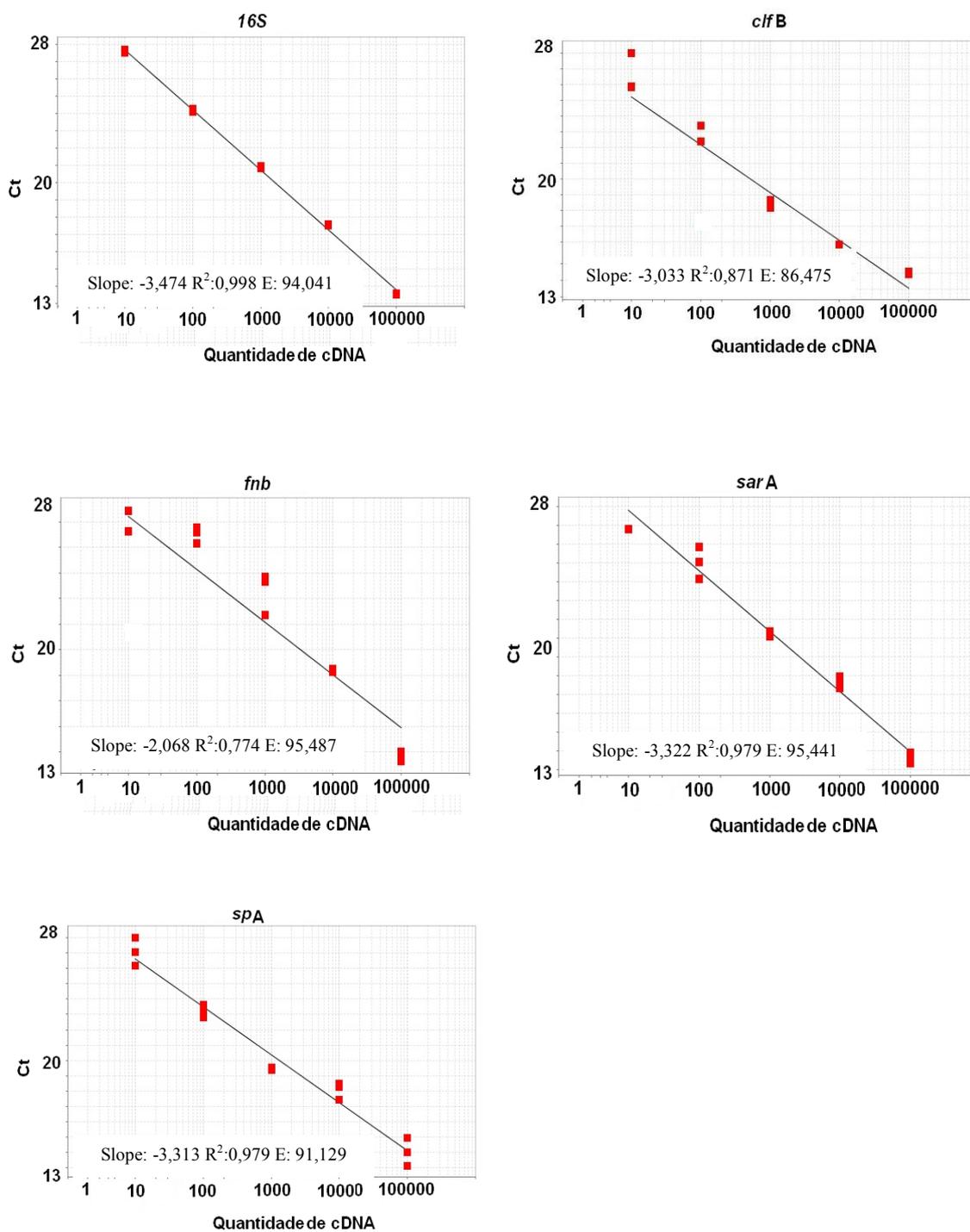


**Figura 9A:** Curvas de *melting* para os genes avaliados por RT-PCR em tempo real.

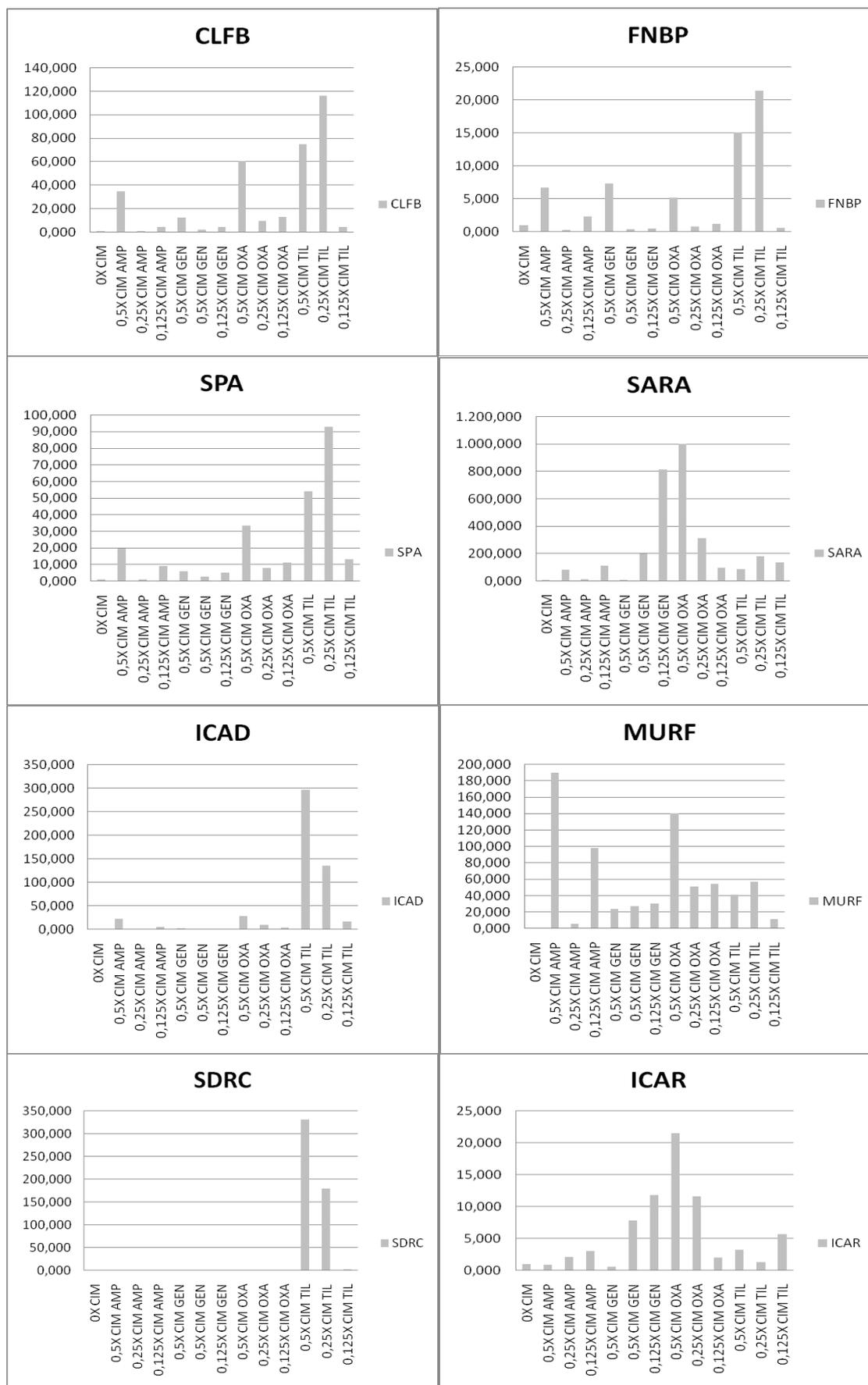
**Figura 9A. Continuação**



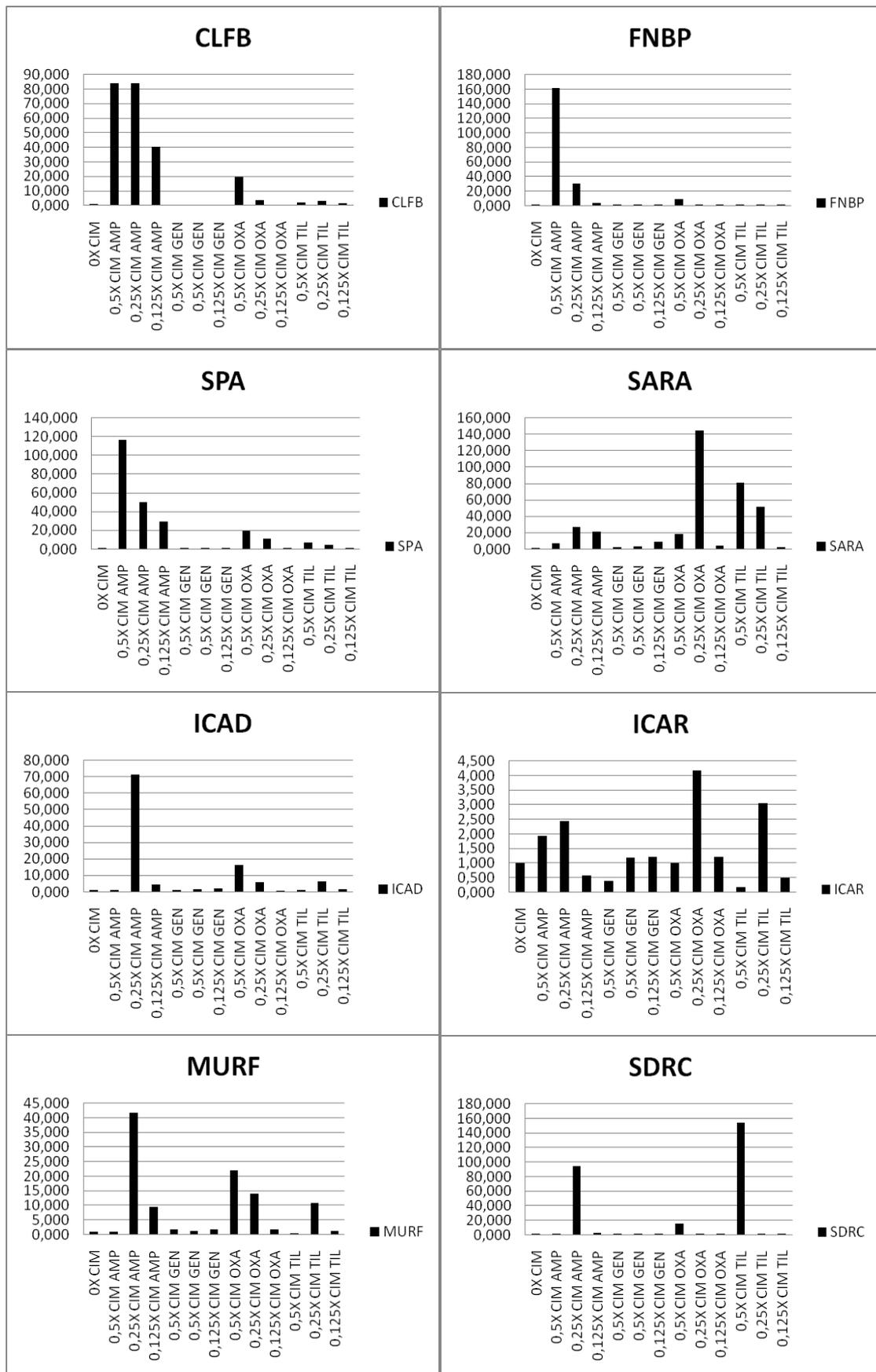
**Figura 9A:** Curvas de *melting* para os genes avaliados por RT-PCR em tempo real.



**Figura 10A.** Eficiência (E) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica por PCR em tempo real.



**Figura 11A.** Expressão relativa de genes de *Staphylococcus aureus* 4006 (repetição biológica B) quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.



**Figura 12A.** Expressão relativa de genes de *Staphylococcus aureus* 4125 (repetição biológica B) quando submetidos a diferentes concentrações de ampicilina, gentamicina, oxacilina e tilosina.