



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Caracterização genética e eficácia antibacteriana de nanopartículas de polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em vacas e cabras no estado de Pernambuco, Brasil

ATZEL CANDIDO ACOSTA ABAD

RECIFE - PE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Caracterização genética e eficácia antibacteriana de nanopartículas de polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em vacas e cabras no estado de Pernambuco, Brasil

ATZEL CANDIDO ACOSTA ABAD

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

RECIFE - PE

2017

BANCA EXAMINADORA

Caracterização genética e eficácia antibacteriana de nanopartículas de polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em vacas e cabras no estado de Pernambuco, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Atzel Candido Acosta Abad

Data de Aprovação ____/____/____

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dra. Maria José de Sena
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dra. Manuela Figueiroa Lyra De Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Rita de Cassia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dra. Andrea Alice Fonseca Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À meu orientador Prof. Rinaldo Aparecido Mota e co-orientador Prof. José Wilton Pinheiro Junior minha gratidão pela oportunidade, orientação, confiança, disposição, atenção e ensinamentos recebidos. Também gostaria salientar minha gratidão ao Prof. Mateus Matiuzzi da Costa por sua contribuição e ensinamentos recebidos durante a execução deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Bacterioses da UFRPE e do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF que acolheram e ajudaram-me no desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical e seus professores, pela contribuição à minha formação.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos que auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa.

FONTES FINANCIADORAS

- Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – **FACEPE**: Bolsa de pós-graduação (IBPG-0439-5.05/12).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**: Aprovação do projeto de natureza científica (442746/2014-8).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES	11
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Patogênese da mastite	18
2.2. Mecanismo de defesa do hospedeiro	18
2.3. Etiologia	19
2.4. Aspectos epidemiológicos da mastite clínica e subclínica	24
2.5. Resistência aos antimicrobianos	25
2.6. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.7. Proteína fibronectina ligante Fnb (<i>Fibronectin-binding Protein</i>)	27
2.8. Fator de agrupamento Clf (<i>Clumping factor</i>)	28
2.9. Toxinas hemolíticas	29
2.9.1. Toxina α hemolítica ou α toxina (Hla).....	29
2.9.2. Toxina β hemolítica ou β toxina (Hlb).....	31
2.9.3. Toxina γ hemolítica ou gama toxina (Hlg)	32
2.9.4. Toxina δ hemolítica ou delta toxina (Hld)	33
2.10. Enterotoxinas estafilocócica (SEs)	33
2.10.1. Enterotoxina estafilocócica A (SEA).....	35
2.10.2. Enterotoxina estafilocócica B (SEB)	35
2.10.3. Enterotoxina estafilocócica C (SEC)	35
2.10.4. Enterotoxina estafilocócica D (SED).....	36
2.10.5. Enterotoxina estafilocócica E (SEE).....	36
2.10.6. Enterotoxina estafilocócica G (SEG).....	36
2.10.7. Enterotoxina estafilocócica H (SEH).....	36
2.10.8. Enterotoxina estafilocócica I (SEI)	37
2.10.9. Enterotoxina estafilocócica J (SEJ)	37
2.10.10. Comparação da estrutura primária protéica das enterotoxinas estafilocócicas	37
2.11. Toxina da síndrome do choque tóxico TSST-1 (<i>Toxic Shock Syndrome Toxin-1</i>)	39

2.12. Polissacarídeo capsular (CP)	39
2.13. Formação de biofilme.....	41
2.14. Atividade bactericida de nanopartículas de polipirrol	43
3. OBJETIVOS.....	45
3.1. Objetivo Geral	45
3.2. Objetivos específicos.....	45
4. Capítulo 1: Virulence genes of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from milk of cows and goats with clinical and subclinical mastitis	46
ABSTRACT	48
INTRODUCTION.....	49
MATERIAL AND METHODS	50
RESULTS AND DISCUSSION	53
CONCLUSION.....	60
ACKNOWLEDGEMENTS.....	60
REFERENCES.....	60
5. Capítulo 2: Eficácia antibacteriana do polipirrol frente a <i>Staphylococcus aureus</i> produtores ou não de biofilme isolados de amostras de leite mastítico de vacas e cabras	69
RESUMO	71
ABSTRACT.....	72
INTRODUÇÃO	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÃO	80
AGRADECIMENTOS.....	80
REFERÊNCIAS	81
6. CONCLUSÃO	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APÊNDICE A: Marcadores moleculares e suas aplicações nas pesquisas em bovinos.....	109
APÊNDICE B: Mastites em ruminantes no Brasil.	111
APÊNDICE C: Frequência dos genes que codifica para as enterotoxinas estafilocócicas no Brasil.	113
ANEXO I: Licença para uso de animais em experimentação e/ou ensino	114
ANEXO II: Comprovante de envio do manuscrito intitulado “Virulence genes of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from milk of cows and goats with clinical and subclinical mastitis”	116

ANEXO III: Comprovante de envio do manuscrito intitulado “Eficácia antibacteriana do polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* produtores ou não de biofilme isolados de amostras de leite mastítico de vacas e cabras”118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático das diferentes regiões do gene <i>fnbA</i> (Signäs et al., 1989).....	28
Figura 2. Estruturas bioquímicas dos polissacarídeos capsulares.....	40
Figura 3. Diagrama esquemático das diferentes regiões dos <i>loci cap5</i> e <i>cap8</i> (Cocchiaro et al., 2006).....	41
Figura 4. Polimerização do monômero pirrol.....	44

Capítulo 2

Eficácia antibacteriana do polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* produtores ou não de biofilme isolados de amostras de leite mastítico de vacas e cabras

Figura 1: Frequência absoluta das intensidades de produção de biofilme de <i>S. aureus</i> isolados de vacas e cabras com mastite.....	78
Figura 2: Concentração mínima bactericida do PPy em água. B (caldo Mueller Hinton), C ⁺ controle positivo de crescimento, concentrações de PPy testadas 500 - 15,63µg.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência relativa (%) dos microrganismos isolados de animais com mastite clínica e subclínica (A) espécie bovina, (B) espécies caprina e/ou ovina e (C) espécie bubalina.....	21
Tabela 2: Perfil de resistência a antimicrobianos de diferentes grupos de patógenos (A) espécie bovina, (B) espécies caprina e/ou ovina e (C) espécie bubalina.....	26
Tabela 3: Porcentagem de aminoácidos idênticos das proteínas precursoras das enterotoxinas estafilocócica.....	38
Tabela 4: Porcentagem de aminoácidos idênticos das enterotoxinas maduras.....	39

Capítulo 1

Virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows and goats with clinical and subclinical mastitis

Table 1. Nucleotide sequences and their characteristics for the <i>Staph. aureus</i> gene-specific oligonucleotide primers used in this study.....	65
Table 2. Absolute and relative frequency of virulence factors in relation with species and regions of origin.....	66
Table 3. Absolute and relative frequency of virulence factors in relation with <i>clfA</i> and <i>clfB</i> genotyping.....	67
Table 4. Absolute and relative frequency of virulence factors in relation with capsular genotyping.....	68

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ADAM10	<i>A Disintegrin And Metalloprotease 10</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>agr</i>	<i>Accessory Gene Regulator</i>
ARN	Ácido ribonucleico
Asp	Aspartato ou Ácido aspártico
ATCC	American Type Culture Collection
<i>bap</i>	<i>Biofilm-Associated Protein</i>
C.	<i>Candida</i>
C1	Complemento 1
C3b	Complemento 3b
CCS	Contagem de Células Somáticas
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Clf	Fator de agrupamento (<i>Clumping factor</i>)
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CP	Polissacarídeo capsular (<i>Capsular Polysaccharide</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	Densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>egc</i>	<i>Enterotoxin Gene Cluster</i>
Fig	Figura
Fnb	Proteína fibronectina ligante (<i>Fibronectin-binding Protein</i>)
h	Horas
Hla	Toxina α hemolítica ou α toxina
Hlb	Toxina β hemolítica ou β toxina

Hld	Toxina δ hemolítica ou delta toxina
Hlg	Toxina γ hemolítica ou gama toxina
iC3b	forma inativada complemento 3b
<i>ica</i>	<i>Intercellular Adhesion</i>
IL	Interleucinas
IMI	Infeções intramamárias (<i>Intramammary infections</i>)
INF	Interferon
kDa	Kilodalton
<i>lukF-PV</i>	<i>Panton-Valenine-Leukocidin F</i>
<i>lukS-PV</i>	<i>Panton-Valenine-Leukocidin S</i>
MBC	Concentração Mínima Bactericida (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)
mg	Miligrama
MHB	Caldo Mueller Hinton (<i>Mueller Hinton Broth</i>)
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIC	Concentração Mínima Inibitória (<i>Minimum Inhibition Concentration</i>)
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
ng	Nanograma
NH ₂	Grupo funcional amino
<i>nuc</i>	Gene nuclease
P.	<i>Prototheca</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PPy	Polipirrol
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>sar</i>	<i>Staphylococcal Accessory Regulator</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa

SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
SEA	Enterotoxina estafilocócica A
SEB	Enterotoxina estafilocócica B
SEC	Enterotoxina estafilocócica C
SED	Enterotoxina estafilocócica D
SEE	Enterotoxina estafilocócica E
SEG	Enterotoxina estafilocócica G
SEH	Enterotoxina estafilocócica H
SEI	Enterotoxina estafilocócica I
SEJ	Enterotoxina estafilocócica J
SEl	enterotoxinas-like (<i>Enterotoxin-lik</i>)
Ser	Serina
SEs	Enterotoxinas estafilocócica (<i>Staphylococcal Enterotoxins</i>)
sp	Espécie
spp	Espécies
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TCR	Receptor de membrana das células T (<i>T Cell Antigen Receptor</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral
TSB	Caldo Tryptone Soya (Tryptone Soya Broth)
TSST-1	Toxina da síndrome do choque tóxico (<i>Toxic Shock Syndrome Toxin-1</i>)
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

RESUMO

Objetivou-se neste estudo caracterizar geneticamente os isolados de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) obtidos de vacas e cabras com mastite no estado de Pernambuco, Brasil. Também, avaliou-se a eficácia antibacteriana de nanopartículas de polipirrol (PPy) em água frente a *S. aureus* produtores ou não de biofilme. Para isto 150 isolados (123 de vacas e 27 de cabras) foram analisadas. Os fatores de virulência envolvidos na adesão às células do hospedeiro (*fnbA/B* e *clfA/B*), toxinas (*sea - sei*, *tsst*, *hla* e *hly*) e os genes polissacarídeos capsulares (*cap5* e *cap8*) foram detectados pela PCR. 138 isolados de *S. aureus* foram avaliados quanto à formação de biofilme por espectrofotometria em microplacas e determinou-se a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e a Concentração Mínima Bactericida (MBC) frente a nanopartículas de PPy. O potencial tóxicogeno, indicado pelo número de genes de toxinas por isolado, revelou que os isolados de cabras apresentam um maior potencial. O genótipo *cap8* apresentou maior potencial de virulência, indicado pelo número de genes apresentado por isolado. O genótipo *cap5* foi mais frequente (70.67%), especialmente nos isolados de vacas. A MIC e a MBC do PPy frente a *S. aureus* foi de 125µg/mL para todos os isolados, independente da produção de biofilme. Novas medidas de controle deverão ser implementadas, em especial em rebanhos caprinos onde os isolados circulantes apresentaram maior potencial tóxico. Diante dos resultados preliminares promissores das nanopartículas de PPy frente a *S. aureus*, futuros estudos devem ser realizados para obtenção de um produto que contribua com o controle da mastite.

Palavras chaves: tipagem molecular, *Staphylococcus aureus*, enterotoxina estafilocócica, polissacarídeo capsular, biofilme, polipirrol

ABSTRACT

The aim of the present study was to characterize genetically isolates of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) obtained from cows and goats with mastitis in Pernambuco state, Brazil. Additionally was evaluated the antibacterial efficacy of nanoparticles of polypyrrole (PPy) in water against biofilm producer or not *S. aureus*. For this, 150 isolates (123 from bovines and 27 from goats) were analyzed. The virulence factors involved in adhesion to host cells (*fnbA/B* and *clfA/B*), toxins (*sea*, - *sei*, *tsst*, *hla* and *hlb*), and capsular polysaccharide genes (*cap5* and *cap8*) were amplified by PCR. A total of 138 isolates of *S. aureus* were evaluated for biofilm formation by spectrophotometry in microplates and Minimum Inhibition Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of nanoparticles of PPy were measured. The toxic potential, defined by the number of toxins genes per isolate, showed that goat's isolates had a higher potential. The *cap8* genotype had more virulence potential by the number of virulence genes per isolate. The *cap5* genotype was most frequent (70.67%), especially in bovine's strains. The MIC and MBC of *S. aureus* to PPy were found in 125µg/mL in all strains, independent of biofilm production or not. New control measures should be implement, especially in goats that the isolates circulating had a higher toxic potential. In view of the positive preliminary results of PPy nanoparticles, future studies should be performed to obtain a product that contributes to mastitis control.

Keywords: molecular typing, *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxin, capsular polysaccharide, biofilm, polypyrrole

1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

Em 2015, o efetivo bovino no Brasil aumentou 1,3% (215,20 milhões) em relação a 2014, porém o efetivo de vacas ordenhadas teve uma queda de 5,5% no mesmo período. No caso do caprino, o efetivo atingiu 9,61 milhões de cabeças em 2015, o que representa um crescimento de 8,6% em relação a 2014 e a Região do Nordeste manteve o maior número de efetivo com 92,7% do total de caprinos do país (IBGE, 2015).

A produção leiteira é um importante item na pecuária brasileira e nos últimos anos ocorreu um crescimento contínuo, o que permitiu ao Brasil ocupar a quinta posição no *ranking* mundial na produção de leite em 2014 (IBGE, 2014). Destaca-se, ainda, a importância social por ser um setor que gera emprego e fonte de renda para muitas famílias brasileiras (Müller, 2002).

A mastite é considerada uma importante enfermidade causadora de prejuízos à indústria leiteira, apesar dos inúmeros esforços direcionados ao controle (De Vliegher et al., 2012). Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da mastite bovina e caprina indicam que os microrganismos de origem contagiosa são os mais prevalentes e, entre esses, o gênero *Staphylococcus* destaca-se por estar relacionado com maior frequência aos casos clínicos e subclínicos da doença (Mota et al., 2012). Dentro deste gênero, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um dos patógenos mais frequentes na mastite e responsável por grandes perdas econômicas (Akineden et al., 2001; Cabral et al., 2004; Katsuda et al., 2005; Mørk et al., 2005). No Brasil, aproximadamente 10,5% dos isolados procedentes das vacas com mastites correspondem a *S. aureus* (Langoni et al., 2011), enquanto que em cabras este achado varia de 12,8 (Langoni et al., 2006) a 37,0% (Silva et al., 2004). No Estado de Pernambuco, esta bactéria geralmente é isolada em bovinos com mastite com índices que variam de 11,3 a 15,0% (Freitas et al., 2005; Ruiz et al., 2011; Mota et al., 2012).

Um considerável número de isolados de *S. aureus* possui a capacidade de produzir exotoxinas como, por exemplo, enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal Enterotoxins* SEs) (Hait et al., 2014; Silveira-Filho et al., 2014), toxina da síndrome do choque tóxico (Kulhankova et al., 2014; Tinelli et al., 2014) e alfa e beta hemólise (Berube e Wardenburg, 2013; Chua et al., 2014). Desta forma, o leite e produtos derivados são importantes veículos de *S. aureus* e comumente estão envolvidos em surtos de intoxicação alimentar (Straub et al., 1999). Sua alta patogenicidade é impulsionada por mecanismos multifatoriais e

complexos determinados pela capacidade da bactéria de expressar uma ampla variedade de fatores de virulência que facilitam a infecção (Foster, 2005; Zecconi e Scali, 2013).

Neste sentido, a realização de estudos epidemiológicos com a utilização de métodos de tipagem molecular apropriados e a compilação de informação sobre a diversidade genética de *S. aureus* em uma determinada região, podem contribuir para definir estratégias eficazes de controle da doença. Esta informação também permitiria ao pessoal técnico veterinário contar com um critério de avaliação dos produtos disponíveis no mercado (vacinas e probióticos) visando obter maior eficácia na aplicação destes no estado de Pernambuco.

Além do exposto, *S. aureus* merece destaque entre os patógenos causadores de mastite pelo aumento na prevalência de cepas resistentes aos antibióticos. A realização de pesquisas que desenvolvam novos produtos antimicrobianos com mecanismos de ação que dificultem a criação de resistência antibacteriana como é o caso do polipirrol, pode favorecer o controle deste agente causador de mastites.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Patogênese da mastite

A mastite é a doença mais amplamente difundida na pecuária, com prevalências na espécie bovina que variam entre 15,4 e 28,6% (Fontana et al., 2010; Langoni e Troncarelli, 2011; Krewer et al., 2013), em pequenos ruminantes de 36,3% (Domingues et al., 2006) e em búfalas de 24,2% (Medeiros et al., 2013). A doença resulta da introdução do microrganismo no canal do teto e o curso clínico dependerá da capacidade do microrganismo de colonizar e multiplicar-se no úbere, do grau de virulência da cepa e da capacidade de resposta do hospedeiro. A multiplicação dos microrganismos e a produção de toxinas danificam o tecido secretor glandular, causando irritação química (Kulkarni e Kaliwal, 2013).

De uma forma resumida, a patogênese dos agentes etiológicos da mastite pode ser dividida em cinco etapas: 1) o microrganismo penetra no canal do teto; 2) multiplica-se usando como substrato o leite; 3) o microrganismo alcança o seio lactífero dos ductos coletores e alvéolos; 4) a multiplicação do microrganismo estimula a atração de leucócitos, originando a formação de edema e abscesso em alguns casos; 5) e muitas vezes na cura, o tecido secretor glandular é substituído por tecido conectivo fibroso (Sordillo e Streicher, 2002).

2.2. Mecanismo de defesa do hospedeiro

A glândula mamária é protegida por diferentes mecanismos de defesa que podem ser divididos em dois grupos: a imunidade inata e a imunidade específica ou adquirida. A imunidade inata também conhecida por resposta não específica ou não imune ocorre predominante nas primeiras fases da doença. A resposta não específica é ativada rapidamente no sítio da infecção por numerosos estímulos, mas não é aumentada pela exposição repetida ao mesmo agressor. A imunidade inata é formada pela barreira física conferida pelo esfíncter do teto, a barreira química formada pela queratina e fatores solúveis como as citocinas, além de elementos celulares como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células *natural killer* (Oviedo-Boyso et al., 2007). Se a resposta imune inata não conseguir eliminar o patógeno em um curto espaço de tempo, a resposta imune específica é ativada (Sordillo e Streicher, 2002), sendo mediada por fatores solúveis específicos como as imunoglobulinas e pela defesa celular conferida por linfócitos T e B.

O termo Contagem de Células Somáticas (CCS) refere-se a todas as células presentes no leite, incluindo as células sanguíneas como os leucócitos e células do epitélio secretor glandular. A composição das células somáticas no leite varia em relação ao tipo de secreção, sendo no leite bovino de 3% para células polimorfonucleares, 80% macrófagos, 16% linfócitos e 2% de células do epitélio glandular (Sharma et al., 2011). Para cabras, essa composição é de 72,6% de células polimorfonucleares, 14,9% macrófagos, 12,4% linfócitos e 0,2% de células do epitélio glandular (Boulaaba et al., 2011). Em ovelhas, a concentração de células somáticas comporta-se da seguinte forma: 31% de células polimorfonucleares, 57% macrófagos, 8% linfócitos e 2% de células do epitélio glandular (Morgante et al., 1996) e nas búfalas, a concentração de células polimorfonucleares é de 22,48%, macrófagos de 25,82% e 30,8% de linfócitos (Hussain et al., 2012).

O aumento na contagem de células somáticas demonstra a instauração de um processo inflamatório na glândula mamária, sendo esta informação utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica (Deb et al., 2013). O aumento da CCS é influenciado por diferentes fatores como o patógeno envolvido na infecção (Djabri et al., 2002; Malek Dos Reis et al., 2011), período do ano, raça, estágio da lactação, volume de produção, número de lactações e problemas nutricionais (De et al., 2011; Sharma et al., 2011).

2.3. Etiologia

Pelas dimensões territoriais do Brasil observam-se diferentes condições climáticas, sistemas de produção e densidade animal por área de exploração, por isso é fácil entender a diversidade de agentes etiológicos causadores da mastite no país.

Os agentes etiológicos causadores de mastites são classificados em dois grupos: contagiosos e ambientais. Os agentes contagiosos vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto durante a ordenha. Os principais agentes contagiosos são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp. e *Corynebacterium bovis* (Smith, 1983; Bramley e Dodd, 1984). Os agentes ambientais vivem no meio onde os animais são criados e a infecção das glândulas ocorre no período entre as ordenhas (Oliver et al., 2004). Os agentes ambientais descritos com maior frequência são: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, além disso, também incluem bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (Kulkarni e Kaliwal, 2013), algas como a *Prototheca*

zopfii (Corbellini et al., 2001; Bueno et al., 2006), leveduras (Costa et al., 2012) e fungos (Chahota et al., 2001; Pachauri et al., 2013; Zhou et al., 2013). A mastite por agentes ambientais instala-se quando a imunidade do hospedeiro está comprometida ou quando as condições higiênicas sanitárias não são favoráveis (Kulkarni e Kaliwal, 2013).

Os principais grupos de agentes causadores de mastite nas diferentes regiões do Brasil estão dispostos na **tabela 1**, as associações entre grupos de microrganismos não são apresentadas. De forma geral em todas as regiões observa-se uma elevada ocorrência do gênero *Staphylococcus* nos casos de mastites nas espécies bovina, caprina, ovina e bubalina e na região Sudeste e Centro-Oeste, o gênero *Corynebacterium* também se destaca.

Tabela 1: Frequência relativa (%) dos microrganismos isolados de animais com mastite clínica e subclínica (A) espécie bovina, (B) espécies caprina e/ou ovina e (C) espécie bubalina

Grandes regiões e espécies em exploração	<i>Staphylococcus</i> spp.			<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Prototheca</i> spp.	Gram negativa
	Gênero	SCN	SCP							
Nordeste										
A (Ruiz et al., 2011)	32,8			13,9	8,3	37,4	3,4	0,2		4,4
A (Krewer et al., 2013)	49,1			2,1		35,3	1,7		4,6	3,6
B (Coutinho et al., 2006)		57,6	15,2	12	15,2					
B (Bianchini et al., 2010)	84,4			4,4	4,4		4,4			2,2
B (Neves et al., 2010)		83,3	16,7							
B (Peixoto et al., 2010)	29,5	27,1	25,7	2,9	7,1	2,9				4,8
B (Silva et al.)	90,3			4,9	1,7					1,7
B (Silva et al., 2013)		61,5	3,07		13,9	6,16				9,2
C (Medeiros et al., 2013)	49,4			3,7	1,8	23,2	0,5	0,8		16,5
Sudeste										
A (Ribeiro et al., 2009)	4,3		25,7	25,7		12,9				4,3
A (Souto et al., 2010)	29,7			17,2		36,3				
A (Langoni e Troncarelli, 2011)		21,3	16,6	21		31,6		0,9		2,8
A (Costa et al., 2012)	8,7					43,48		29,35	4,34	4,34
B (Domingues et al., 2006)		67,9	9,4	13,2		5,7				3,8
B (Langoni et al., 2006)		55	12,8	10,1		5,5	2,8	6,4		6,4
C (Pizauro et al., 2014)	20,2		0,8	42,8		23,5	7,6			1,7
Sul										
A (Pianta et al., 2007)			15,4	21,3		13,8				3,3
A (Jobim et al., 2010)	30,53			28,15						33,29
A (Mesquita et al., 2012)	14,5		11,1	36,7		7,4	18,5			11,1
A (Saab et al., 2014)		32,9	12,3	31,6		14,2				7,7
B (Pereira et al., 2014)		54,5	11,4	6,7	7		11,4			4,5
Centro-Oeste										
A (Fontana et al., 2010)	1,0	24,0	15,9	19,7		35,6				3,8

¹ SCN- *Staphylococcus* coagulase negativa.

² SCP- *Staphylococcus* coagulase positiva.

O gênero *Staphylococcus* divide-se em dois grandes grupos considerando a capacidade do microrganismo em produzir a enzima coagulase que transforma o fibrinogênio em fibrina (Pyörälä e Taponen, 2009). Nos últimos anos, os *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN) são isolados com maior frequência a partir de amostras de animais com mastite em diferentes países (Pyörälä e Taponen, 2009; Schukken et al., 2009; Feßler et al., 2010). O controle da mastite causada por SCN é complexo pela heterogeneidade deste grupo bacteriano, pois atualmente existem mais de 15 espécies de SCN associados a processos inflamatórios na glândula mamária (Zadoks e Watts, 2009). Neste aspecto, as pesquisas realizadas no Brasil têm como limitante que em poucos trabalhos (Langoni et al., 2006; Fontana et al., 2010; Peixoto et al., 2010) são identificadas as espécies de SCN causadoras de mastites. A identificação das espécies ocorre por meio de estudos fenotípicos ou genotípicos, sendo estes últimos superiores em relação ao grau de discriminação (Ruegg, 2009). Internacionalmente, no grupo de SCN, os microrganismos relatados com maior frequência são: *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus xylosus* (Honkanen-Buzalski et al., 1994; Thorberg et al., 2006; Thorberg et al., 2009; Waller et al., 2011; Fry et al., 2014). No Brasil, Machado et al. (2008) relataram *S. simulans* como a bactéria mais frequente.

O grupo de *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP) de maior importância na etiologia da mastite é formado por *Staphylococcus aureus*, a espécie coagulase-positiva *Staphylococcus intermedius* e variantes coagulase-positivas de *Staphylococcus hyicus* (Vasconcelos et al., 2002). *S. aureus* é o microrganismo coagulase-positivo isolado com maior frequência em amostras de leite de animais com mastite no Brasil, em bovinos (Saeki et al., 2012; Bandeira et al., 2013; Castelani et al., 2013), caprinos e ovinos (Peixoto et al., 2010) e internacionalmente também é reportado como o microrganismo coagulase-positivo mais frequentemente identificado (Jamali et al., 2014).

S. aureus é anaeróbio facultativo, Gram positivo, motilidade negativa, catalase e coagulase positivo; a parede celular é resistente à ação da enzima lisozima e sensível à ação da lisostafina (Le Loir et al., 2003). A infecção por esta bactéria provoca perdas significativas na produção de leite pela permanente destruição das células do epitélio glandular. O tecido funcional (epitélio glandular) é substituído por tecido fibroso que protege a bactéria do mecanismo normal de defesa do hospedeiro, pois provoca uma redução na fagocitose pelos neutrófilos (Barkema et al., 2006).

No gênero *Streptococcus* spp. um dos agentes mais frequentemente isolados em amostras de leite de bovinos com mastite é o *S. agalactiae* (Getaneh et al., 2014; Ramírez et al., 2014). São cocos Gram positivos e catalase negativos, não conseguem sobreviver por longos períodos de tempo fora da glândula mamária e por isso sua transmissão ocorre fundamentalmente nos períodos intra-ordenha (Keefe, 1997). É considerado um importante patógeno causador de mastite pelo forte efeito na qualidade do leite, os níveis de produção e a contagem de células somáticas (Keefe, 2012). Este microrganismo na maioria dos casos de infecção intramamária é sensível a diferentes antimicrobianos (Gao et al., 2012; Krishnaveni et al., 2014). No Brasil, os *Streptococcus* ambientais mais frequentemente isolados são *S. dysgalactiae* e *S. uberis* (Souto et al., 2010).

O gênero *Corynebacterium* spp. são bacilos Gram positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase positivo. São considerados patógenos contagiosos causadores de infecção intra-mamária, sendo responsáveis por um aumento considerável na contagem de células somáticas (National Mastitis Council, 2004). A espécie lipofílica isolada com maior frequência em animais com mastite clínica ou subclínica é *C. bovis* (Hegazi et al., 2014; Saab et al., 2014); também são relatados com uma considerável frequência, as espécies não lipofílicas *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* (Hommeiz et al., 1999; National Mastitis Council, 2004).

Em rebanhos bovinos no Estado de Minas Gerais, as espécies de *Candida* isoladas em casos de mastite foram: *C. albicans*, *C. catenulata* e *C. glabrata* (Costa et al., 2012); também foram isoladas as espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Costa et al., 2008). No Rio Grande do Sul foram identificadas as espécies de leveduras e fungos pertencentes os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Galactomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodosporidium* (Spanamberg et al., 2008). Em Pernambuco, as espécies de *Candida* isoladas de amostras de leite de vacas com mastites foram *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Coutinho et al., 2012); outra levedura também isolada foi *Trichosporum* sp. Em caprinos no estado de São Paulo foi relatada a ocorrência de *C. albicans* (Langoni et al., 2006). Além da redução da produção leiteira provocado pelas mastites micóticas, as perdas econômicas incrementam-se pela utilização na maioria dos casos de antimicrobianos que não surtem efeito sobre o agente causador da inflamação o que encarece o processo produtivo e aumenta o risco nos

consumidores de ingerir princípios ativos ou metabólitos que favorecem o processo de resistência aos antimicrobianos.

A *Prototheca* spp. é uma alga aclorofilada com afinidade filogenética à *Chlorella* spp. O gênero compreende quatro espécies: *P. zopfii*, *P. moriformes*, *P. wickerhamii* e *P. stagnor*; no Brasil as espécies geralmente associadas às infecções intramamárias são *P. zopfii* e *P. wickerhamii* (Bueno et al., 2006).

O termo coliformes é frequentemente utilizado de forma incorreta para identificar todas as bactérias Gram negativas causadoras da inflamação intramamária (National Mastitis Council, 2004). Geralmente são classificados como coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (Kulkarni e Kaliwal, 2013). No Brasil, já foi relatado um surto de mastite fatal aguda por *Klebsiella pneumoniae* em um rebanho bovino leiteiro no Estado do Rio de Janeiro (Silva e Costa, 2001). Outra bactéria Gram negativa também isolada em casos de mastites no Brasil foi *Arcobacter* spp. no Rio Grande do Sul (Pianta et al., 2007).

De acordo com os resultados apresentados no **tabela 1**, os gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium* constituem-se nos principais microrganismos causadores de mastites nas diferentes regiões do país.

2.4. Aspectos epidemiológicos da mastite clínica e subclínica

A prevalência da mastite clínica nas diferentes espécies é baixa em distintas regiões do Brasil, com frequências que variam para espécie bovina de 0,73% (Langoni et al., 2011) no Sudeste a 2,6% (Krewer et al., 2013) no Nordeste. Na espécie caprina a prevalência da mastite clínica reportada é de 0,15% (Bianchini et al., 2010) e na espécie bubalina 4,7% (Medeiros et al., 2013) ambos estudos realizados na região Nordeste.

Para a mastite subclínica, a prevalência varia de 10% (Costa et al., 2012) a 48,64% (Ribeiro et al., 2009) para espécie bovina, sendo os dois estudos realizados na região Sudeste. Na espécie caprina, a prevalência variou de 11,49% (Neves et al., 2010) a 30,7% (Bianchini et al., 2010), ambos estudos realizados na região Nordeste; na espécie ovina, a prevalência variou de 28,5% (Domingues et al., 2006) no Sudeste a 31,45% (Coutinho et al., 2006) no Nordeste. Na espécie bubalina, a prevalência variou de 8,35% (Pizauro et al., 2014) na região Sudeste a 42,2% (Medeiros et al., 2013) no Nordeste.

2.5. Resistência aos antimicrobianos

Um ponto crítico no controle da mastite refere-se à resistência dos patógenos aos antimicrobianos, não só pela dificuldade no êxito do tratamento da doença, como também pelo alto risco que representa para a saúde pública. Nas pesquisas compiladas nesta revisão (**Tabela 1**) observa-se que a penicilina, ampicilina, amoxicilina e neomicina são os antimicrobianos para aos quais os microrganismos causadores de mastites em ruminantes apresentam maior resistência nas diferentes regiões do Brasil (**Tabela 2**). Como exemplo são relatadas as seguintes porcentagens de resistência: região Nordeste: amoxicilina (67,4%), ampicilina (67%) e penicilina (66%) para microrganismos *Staphylococcus* spp. (Krewer et al., 2013) e penicilina (80%), ampicilina (80%) neomicina (80%) para *S. aureus* (Coutinho et al., 2006). Também existe relato de alta porcentagem de resistência ao ácido nalidíxico (78,26%) nesta região do país em todos os isolados obtidos de casos de mastites caprina e ovina (Peixoto et al., 2010). Na região Sudeste observa-se resistência nos *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. aureus* e *C. bovis* isolados de caprinos com mastite nas respectivas porcentagens para os seguinte antimicrobianos: penicilina (61,5; 79; 87,5; 83,4%), ampicilina (65,2; 36,9; 75; 25%) e neomicina (61,5; 47,4; 62,5; 41,7%) (Langoni et al., 2006) e em todos os isolados obtidos de bovinos, à penicilina (53,5%), ampicilina (41,6%) e neomicina (38,6%) (Ribeiro et al., 2009). Na região Centro-Oeste, 100% de *S. aureus* obtidos de vacas com mastites apresentaram resistência para penicilina, oxacilina e ampicilina (Fontana et al., 2010).

Tabela 2: Perfil de resistência a antimicrobianos de diferentes grupos de patógenos (A) espécie bovina, (B) espécies caprina e/ou ovina e (C) espécie bubalina.

Grandes regiões e espécies em exploração	% de resistência a diferentes antimicrobianos		
Nordeste			
A (Krewer et al., 2013)	amoxicilina (67,4%)	ampicilina (67%)	penicilina (66%)
B (Coutinho et al., 2006)	penicilina (80%)	ampicilina (80%)	neomicina (80%)
B (Neves et al., 2010)	penicilina (66,67%)	ampicilina (63,89%)	
B (Peixoto et al., 2010)	ácido nalidíxico (78,26%)	neomicina (43,26%)	amoxicilina (38,51%)
Sudeste			
A (Ribeiro et al., 2009)	penicilina (53,5%)	ampicilina (41,6%)	neomicina (38,6%)
B (Domingues et al., 2006)	amoxicilina (79,5)	penicilina (76,8%)	
B (Langoni et al., 2006)	penicilina (87,5%)	ampicilina (75%)	neomicina (62,5%)
C (Pizauro et al., 2014)	neomicina (32,5%)	enrofloxacina (28,9%)	penicilina (25,3%)
Centro-Oeste			
A (Fontana et al., 2010)	penicilina (100 %)	oxacilina (100 %)	ampicilina (100 %)

2.6. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*

S. aureus apresenta uma marcada capacidade para adaptar-se a diferentes condições ambientais e representa um importante agente causador de doenças infecciosas em humanos e animais (Hasman et al., 2010; Al-Dabbagh e Dobson, 2011; Fluit, 2012). Produz vários fatores de virulência que promovem adesão aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, danificam suas células e protegem a bactéria do sistema imunológico (Foster, 2005; Zecconi e Scali, 2013).

Os fatores de virulência, já descritos no mínimo 15 para *S. aureus* são componentes de superfície microbiana que reconhecem as moléculas da matriz extracelular do hospedeiro, 25 toxinas e 20 moléculas de evasão do sistema imune do hospedeiro (Fluit, 2012). A adesão de *S. aureus* às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, como fibrinogênio, fibronectina e colágeno é importante para iniciar a infecção. Esta adesão é mediada por proteínas associadas à parede da célula bacteriana chamadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) que estão ancoradas por uma

ligação covalente ao peptidoglicano através da ação de uma transpeptidase denominada sortase (Navarre e Schneewind, 1994; Mazmanian et al., 1999).

A maioria dos isolados de *S. aureus* secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem as toxinas hemolíticas, nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e collagenase. A principal função destas enzimas e citotoxinas seria a conversão dos tecidos do hospedeiros em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (Dinges et al., 2000). Um número significativo de isolados obtidos de animais são produtores de outras exotoxinas como a toxina do síndrome do choque tóxico e enterotoxinas (Sá et al., 2004; Lamaita et al., 2005; Carfora et al., 2015).

A capacidade de resistir a fagocitose é um importante fator que favorece o progressão da infecção por esta bactéria. Mediante a expressão de proteínas anti-opsônicas associadas à superfície e uma cápsula de polissacarídeo que interfere com a deposição de anticorpos e a formação de complemento por vias clássicas e alternativas que dificulta a sua fagocitose (Foster, 2005). A capacidade de formar biofilme em isolados de *S. aureus* aumenta a complexidade das infecções (Melchior et al., 2006). O biofilme é uma eficiente estratégia de evasão imunológica através do bloqueio físico (Thurlow et al., 2011). As bactérias em biofilmes também são menos sensíveis ao tratamento com agentes antimicrobianos (Costerton, 1995), o que ajuda a manter as infecções crônicas.

2.7. Proteína fibronectina ligante Fnb (*Fibronectin-binding Protein*)

A adesão é o pré-requisito para a colonização e o desenvolvimento de uma eventual infecção no hospedeiro. *S. aureus* sintetiza duas proteínas fibronectina ligantes homólogas: FnbA e FnbB (Shinji et al., 2011). Estas proteínas são codificadas por dois genes estreitamente ligados e após 682pb do códon de parada do *fnbA*, inicia o domínio S do gene *fnbB* (Jönsson et al., 1991). O gene *fnbA* é formado por 3057pb distribuídos em sete regiões (**Figura 1**), codifica 1018 aminoácidos e tem como códon de parada o TAA. Foram identificadas três regiões repetidas no gene *fnbA*: a região B com 30 aminoácidos repetidos (B₁, B₂), a região D com 38 aminoácidos repetidos três vezes e parcialmente repetido uma quarta vez (D₁-D₄) e a região Wr onde 14 aminoácidos são repetidas cinco vezes (Wr₁-Wr₅) (Signäs et al., 1989).

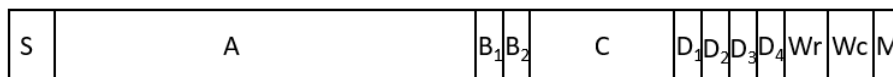


Figura 1. Diagrama esquemático das diferentes regiões do gene *fnbA* (Signäs et al., 1989). S sequência sinal, A e C regiões espaçadora, B e D regiões diferentes repetidas fora do domínio da parede celular, Wr região repetida do domínio da extensão da parede celular, Wc região não repetida do domínio da extensão da parede celular e M domínio da extensão da membrana.

O gene *fnbB* apresenta boa parte da sequência homóloga ao gene *fnbA*. Como exemplo tem-se que 94% dos aminoácidos da região sinal (S) são idênticos entre as duas adesinas. A partir da região espaçadora (C), 94% dos aminoácidos são idênticos entre ambas as proteínas. O gene *fnbB* não tem a região repetida B (Jönsson et al., 1991).

Estas adesinas (FnbA e FnbB) são as duas proteínas de grande importância na fase inicial de adesão nos processos infecciosos por *S. aureus* (Hu et al., 2010) e se ligam à fibronectina e a elastina, e a FnbA também pode se ligar ao fibrinogênio (Peacock et al., 2002; Clarke e Foster, 2006; Chavakis et al., 2007; Speziale et al., 2009). A fibronectina é uma glicoproteína de 440kDa presente no hospedeiro na forma solúvel no sangue e na forma fibrosa nas matrizes celulares. É muito importante, pois permite a adesão bacteriana a esta proteína em diferentes momentos do processo infeccioso (Patti et al., 1994). Por outro lado, dois grupos de pesquisadores independentes descreveram novos fenótipos de biofilmes de *S. aureus* mediados pelas proteínas FnbA e FnbB (O'Neill et al., 2008; Shanks et al., 2008).

2.8. Fator de agrupamento Clf (*Clumping factor*)

Os genes *clfA* e *clfB* não são variantes alélicas e sim genes diferentes (Foster e Höök, 1998). A ClfA está presente em todas as fases do crescimento de *S. aureus* e a ClfB está presente na fase exponencial de crescimento da bactéria em condições de anaerobiose (Ní Eidhin et al., 1998). A estrutura organizacional das adesinas ClfA e ClfB é similar e também semelhante às outras proteínas de superfície ancoradas na parede celular como a FnbA (**Figura 1**). Um aspecto distinto destas adesinas é a presença do domínio R que consiste em uma comprida região de dipéptido Asp-Ser repetida que conecta a região espaçadora A e o domínio da extensão da membrana M, estando este domínio em ambas as adesinas (Foster e Höök, 1998).

As ClfA e ClfB se ligam ao fibrinogênio e promovem a agregação das plaquetas (Peacock et al., 2002; Clarke e Foster, 2006; Speziale et al., 2009). No entanto, a fibrina solúvel parece ser a principal proteína responsável pela formação de agregados de plaquetas mediados pelas proteínas Clfs de *S. aureus* (Niemann et al., 2004). O ClfB também tem a capacidade de se ligar à citoqueratina 10 (O' Brien et al., 2002; Clarke e Foster, 2006; Speziale et al., 2009) e a citoqueratina 8 (Haim et al., 2010), favorecendo a colonização dos tecidos.

Muitas moléculas que participam na adesão também estão envolvidas em diferentes táticas de evasão imunológica. Por exemplo, a ativação do sistema complemento é prejudicada por algumas destas adesinas. O ClfA se liga ao fator regulador do complemento 1 (C1) e este processo aumenta a conversão de C3b para uma forma inativada (iC3b) e este mecanismo prejudica a fagocitose de *S. aureus* (Hair et al., 2010).

2.9. Toxinas hemolíticas

Inicialmente estas toxinas foram denominadas desta forma tendo como base a sua propriedade de causar a lise de eritrócitos. O ferro é um nutriente limitante para todos os organismos, sendo necessário em muitos processos biológicos. Um papel proposto para as hemolisinas bacterianas é a liberação do grupo heme presente na hemoglobina e mioglobina dos eritrócitos (Huseby et al., 2007). *S. aureus* tem um sistema múltiplo de componentes que permite importar o grupo heme e extrair o ferro (Torres et al., 2006). As toxinas alfa, beta, delta e gama são produzidas por diferentes isolados de *S. aureus* com efeito citotóxico frente a várias células do hospedeiro, incluindo as imunológicas (Dinges et al., 2000).

2.9.1. Toxina α hemolítica ou α toxina (Hla)

O gene que codifica para esta toxina (hla) foi descrito em 1980 por meio da metodologia de recombinação de fagos que transferiu a habilidade de lisar células vermelhas para *E. coli* (Kehoe et al., 1983). O locus *hla* está constituído por 1620 nucleotídeos (Fairweather et al., 1983) e codifica para 319 aminoácidos (Gray e Kehoe, 1984), sendo secretada como um monômero solúvel em água (Song et al., 1996). Após o processo de amadurecimento extracelular, a toxina perde 26 aminoácidos sendo esta sua forma ativa de aproximadamente 33 kDa (Tweten et al., 1983). A expressão da Hla é controlada por diferentes sistemas de regulação global (Recsei et al., 1986). Estes circuitos de regulação permitem o controle rigoroso da expressão da Hla *in vivo* e provavelmente facilitam uma

resposta rápida e específica às mudanças das condições do meio (Berube e Wardenburg, 2013).

Por muito tempo, a atividade da Hla concentrou os debates na alta suscetibilidade da lise de eritrócitos de coelho frente a relativa insensibilidade dos eritrócitos humanos (Cassidy e Harshman, 1973; Cassidy e Harshman, 1976; Hildebrand et al., 1991). Nos últimos anos, a ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloprotease 10*) foi apontada como um proteináceo receptor do Hla (Wilke e Wardenburg, 2010), sustentado pelos seguintes achados: (1) ADAM10 da membrana das células do hospedeiro é precipitada pela Hla, (2) ADAM10 é requerida para a construção da toxina e sua oligomerização e a exigência de ADAM10 na citotoxicidade mediada por Hla é maior em baixas concentrações de toxina onde se prevê a necessidade de um receptor celular de alta afinidade (Cassidy e Harshman, 1976), (3) a atividade hemolítica espécie específica exigida pela Hla está correlacionada à expressão da ADAM10 em eritrócitos de coelhos em contraste com a ausência na superfície dos eritrócitos de humanos (Wilke e Wardenburg, 2010).

A α toxina é considerada a mais importante citotoxina produzida por *S. aureus*, pois é capaz de atuar contra uma ampla gama de células do hospedeiro como por exemplo eritrócitos, células epiteliais, células endoteliais, linfócitos T, monócitos e macrófagos (Berube e Wardenburg, 2013). Considera-se que poderiam ter um papel importante na patogenia das infecções por este agente, sendo esta afirmação sustentada por duas linhas. Em primeiro lugar, os hospedeiros acometidos por doenças causadas por *S. aureus* desenvolvem uma resposta de anticorpos séricos à Hla relacionada ao grau de expressão da toxina (Kolata et al., 2011; Adhikari et al., 2012; Fritz et al., 2013). Indivíduos com risco de septicemia por *S. aureus* apresentaram uma diminuição desse risco em indivíduos com altos títulos de anticorpos séricos contra Hla e outras quatro toxinas de *S. aureus* (Adhikari et al., 2012). A segunda linha está sustentada em estudos de genética microbiana e da análise do perfil proteico. A linhagem *S. aureus* denominada “Phage-type 80/81” constituiu uma importante causa de epidemias nas décadas 1950-1960, sendo caracterizada como altamente virulenta. Quando foram estudados os *loci hla* e *agr* (*Accessory Gene Regulator*) constatou-se a capacidade de expressão da Hla e produção de infecções mediadas por esta toxina. Já no caso da linhagem EMRSA-16 e seus clones associados, observou-se mutações pontuais em ambos *loci* que impediu a produção da Hla e esteve associado a uma redução da virulência desta linhagem (Deleo et al., 2011).

2.9.2. Toxina β hemolítica ou β toxina (Hlb)

A toxina β hemolítica foi identificada em 1935 por Glenny e Stevens, (1935). É uma esfingomielinase C dependente de Mg^{2+} que degrada a esfingomielina presente na membrana celular de eritrócitos, leucócitos, neurônios e outros tipos de células, causando lise (Bernheimer et al., 1974; Dinges et al., 2000). O gene *hlb* foi identificado, clonado e sequenciado em 1989, sendo Hlb sintetizada como uma proteína de 39kDa de 330 aminoácidos (Projan et al., 1989); posteriormente clivada e excretada na forma ativa de 35kDa (Dinges et al., 2000). Quando foi identificada a sequência de nucleotídeo e consequentemente a sequência de aminoácidos observou-se que existia 55,7% de similaridade com a sequência de 200 aminoácidos da esfingomielinase de *Bacillus cereus* (Projan et al., 1989).

A β toxina também é conhecida como a toxina quente-frio porque a $37^{\circ}C$ interage com as células vermelhas do sangue de ovelha, mas não as lisam. Se os glóbulos vermelhos são colocados a $4^{\circ}C$, as células são lisadas. Isto é observado como uma falta de hemólise em placas em ágar sangue a $37^{\circ}C$ e depois uma hemólise completa a $4^{\circ}C$ (Huseby et al., 2007).

A β toxina é produzida pela maioria dos isolados de *S. aureus* associados às mastites bovinas (Aarestrup et al., 1999) e infecções crônicas da pele em humanos (Katayama et al., 2013). Estudos sobre mutações no sítio ativo da Hlb demonstraram que a atividade hemolítica e linfotoxicidade estão relacionadas à função esfingomielinase (Huseby et al., 2007). Os estudos da Hlb *in vitro* e *in vivo* demonstraram a importância desta toxina na patogenia dos processos infecciosos e como um problema potencial para a saúde pública.

Em um experimento *in vitro* observou-se que a Hlb lesionou as células do epitélio secretor bovino, incrementou o efeito nocivo da α toxina, aumentou a aderência de *S. aureus* às células do epitélio secretor, permitindo uma maior proliferação da bactéria (Cifrian et al., 1996). A lise dos monócitos humanos pela Hlb apresentou uma cinética rápida, com lise de 50% dos monócitos (10^6 células/mL) em 60 min. por apenas 0,001U/mL de Hlb com liberação no meio de interleucina-1 β , receptor solúvel de interleucina-6 e CD14 solúvel. A morte dos monócitos pela Hlb esteve associada a liberação de citocinas que são importantes no início e na progressão de doenças infecciosas (Walev et al., 1996). Por outro lado, Tajima et al. (2009) observaram o efeito anti-inflamatório *in vitro* da beta toxina, reduzindo a produção de interleucina 8 mediante a atividade citotóxica das células endoteliais. Huseby et al. (2010) relataram que a Hlb é uma esfingomielinase neutra que forma ligações

covalentes entre *S. aureus* na presença de ADN, sendo denominada atividade de ligação de biofilme, independente da atividade da esfingomielinase, sendo a β toxina uma potente estimuladora da formação de biofilme.

2.9.3. Toxina γ hemolítica ou gama toxina (Hlg)

O fragmento de ADN que contém a gama toxina foi clonado em 1988, e a partir das evidências genéticas constatou-se que para a atividade hemolítica acontecer é necessária a ação conjunta de dois polipeptídios codificados por dois genes independentes, sendo os polipeptídeos produzidos de 32kDa e 36kDa, respectivamente (Cooney et al., 1988). A partir de estudos realizados por Prevost et al. (1995) obteve-se um maior entendimento sobre as propriedades físico-químicas e biológicas desta toxina e das inter-relações entre os polipeptídeos que a compõe. Os polipeptídeos são denominados componentes S e F (*Slow- and Fast-eluting Proteins*). Em isolados que produzem ambos polipeptídeos podem estar presentes uma das três unidades S (HlgA, HlgC e LukS-PV) e uma das duas unidades F (HlgB e LukF-PV), existindo seis possíveis formas da toxina γ hemolítica. Também foi observado uma alta porcentagem de sequências idênticas entre as unidades dentro de cada grupo.

Os genes *lukS-PV* e *lukF-PV* (*Panton-Valenine-Leukocidin*) foram clonados e sequenciados por Prevost et al. (1995). O gene *lukS-PV* codifica um polipeptídeo de 312 aminoácidos que inclui os 28 aminoácidos residuais que são clivados para obter a forma ativa do polipeptídeo. Já o gene *lukF-PV* codifica para 325 aminoácidos, incluindo os 24 aminoácidos residuais que são clivados para obter a forma ativa do polipeptídeo.

Entre as seis possíveis formas da toxina γ hemolítica observou-se que as combinações HlgA-HlgB, HlgA-LukF-PV e HlgC-HlgB apresentam alta atividade hemolítica, sendo a HlgA-HlgB a que apresenta a maior atividade. As combinações restantes apresentam baixa atividade hemolítica, no entanto, as seis combinações foram eficientes na lise de leucócitos (König e Prevost, 1997). O efeito clínico e biológico das diferentes combinações da toxina γ hemolítica foi avaliado em um modelo *in vivo*, observando-se a seguinte ordem das diferentes combinações em relação à intensidade da inflamação e necrose: HlgA-LukF-PV > HlgA-HlgB \geq LukS-PV-HlgB \geq LukS-PV-LukF-PV > HlgC-HlgB \geq HlgC-LukF-PV (Siqueira et al., 1997).

2.9.4. Toxina δ hemolítica ou delta toxina (Hld)

A delta toxina é uma exotoxina de baixo peso molecular (26 aminoácidos) que forma estruturas poliméricas com capacidade de lisar uma ampla diversidade de células. Esta toxina é codificada pelo gene que sintetiza simultaneamente o ARN III que funciona como um regulador global da superfície celular e dos fatores de virulência secretados (Novick, 2003).

O gene *hld* é formado por 514 nucleotídeos onde os primeiros 160 formam 45 códons de leitura aberta. A delta toxina é produzida por 97% dos isolados de *S. aureus* e calcula-se que entre 50 a 70% dos *Staphylococcus* Coagulase Negativos também produzem esta toxina (Dinges et al., 2000).

O mecanismo de ação da delta toxina tem sido objeto de interesse de diferentes estudos. A partir da estrutura de α -hélice desta toxina, com presença de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos em posições opostas foi proposto que a delta toxina atua como agente surfactante, destruindo a membrana celular. A velocidade com que a célula alvo é lisada suporta esta hipótese, onde primeiro são liberadas partículas de baixo peso molecular com a subsequente exposição à toxina, sendo liberadas moléculas de maior tamanho (Freer e Birkbeck, 1982; Lee et al., 1987).

2.10. Enterotoxinas estafilocócica (SEs)

As SEs são proteínas pequenas, secretadas no meio, são solúveis em água e solução salina. Os aminoácidos lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tripsina são abundantes na estrutura primária destas enterotoxinas (Le Loir et al., 2003). Até o momento são conhecidos 21 sorotipos entre enterotoxinas e enterotoxinas-like (*Enterotoxin-like* SEI) (Rall et al., 2014).

As SEs constituem uma grande família de toxinas que apresentam uma estreita relação filogenética, estruturas comuns, funções e sequências homologas. Análises cristalográficas revelaram que estas moléculas possuem forma elipsoidal e que são pregueadas de modo a formar dois domínios contendo uma mistura de estruturas α -hélices e folhas- β pregueadas (Balaban e Rasooly, 2000). As SEs apresentam duas funções como toxina gastrointestinal e como superantígeno que estimula a proliferação de células T não específicas (Jarraud et al., 2001). Estas funções encontram-se localizadas em domínios separados das proteínas, mas correlacionadas, por isto a perda de uma das funções (que pode ser causada por mutações) também determina a perda da outra função (Harris et al., 1993).

A enterotoxigenicidade e o efeito emético estão relacionadas à estimulação do sistema nervoso central, após atuação da toxina nos receptores neurais dos intestinos (Monday e Bohach, 1999). As intoxicações alimentares por SEs são caracterizadas por apresentar um curto período de incubação (2 a 6 horas) após ingestão da toxina, seguido por náusea, vômito, dor abdominal e diarreia. Na maioria dos hospedeiros, a diarreia ocorre devido ao aumento do peristaltismo intestinal e perda de líquido pelo organismo (Balaban e Rasooly, 2000). Também foi sugerido por Hu et al. (2005) que o contato desta enterotoxina com o epitélio intestinal afeta a função epitelial pelo aumento da liberação de cálcio intracelular, e seu efeito sobre a sinalização celular deste tecido. As SEs são resistentes à atividade das proteases gastrointestinais como por exemplo a pepsina e tripsina (Cretenet et al., 2011) e mantém suas atividades biológicas mesmo após serem submetidas a altas temperaturas (Senger e Bizani, 2011).

A atividade como superantígeno implica na a proliferação de células T não específicas. Para desencadear a resposta imune celular mediada por células T, o primeiro evento é o reconhecimento do antígeno pelo receptor de membrana das células T (*T Cell Antigen Receptor* TCR) (Fields et al., 1996). O antígeno é apresentado pelo TCR na forma de peptídeo processado associado com moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* MHC) classe I e II, que são proteínas de membrana que exibidas na superfície de células apresentadoras de antígeno (Fink et al., 1986). Este tipo de reconhecimento é a base para a alta especificidade da resposta imune onde poucas células T podem reconhecer um antígeno específico.

Por outro lado, a atividade como superantígeno das SEs permite atuar com células T de forma inespecífica sendo um forte ativador de linfócitos T (Le Loir et al., 2003). Os receptores (TCR V β) para as SEs nas células apresentadoras de antígeno interage com a molécula MHC da classe II, causando a ativação de forma inespecífica das células T (Choi et al., 1989; Choi et al., 1990). Devido a essa interação, as SEs causam ativação de até 25% dos linfócitos T (Kappler et al., 1994), em contraste, os antígenos clássicos ativam 0,0001-0,01% das células T (Fink et al., 1986). A ativação de forma inespecífica das células T junto a segregação massiva de citocinas, como por exemplo fator de necrose tumoral (TNF) α e β , interleucinas (IL) 1 e 2 e interferon (INF) γ , são responsáveis por vários sinais clínicos observados na septicemia e na síndrome do choque tóxico, levando as células à apoptose e resultando em imunossupressão (Rellahan et al., 1990).

2.10.1. Enterotoxina estafilocócica A (SEA)

O gene que codifica para SEA (*sea*) é carregado por um fago (Φ Sa3) (Betley e Mekalanos, 1985). Estudos de hibridação do ADN sugerem que este fago se integra ao cromossomo bacteriano por circularização e cruzamento recíproco. O gene é composto por 771 nucleotídeos que codificam o precursor da enterotoxina A que apresenta 257 resíduos de aminoácidos (Huang et al., 1987). A forma ativa da SEA é obtida após a remoção de 24 aminoácidos na porção hidrofóbica final da sequência (Betley e Mekalanos, 1988). Existem três isoformas com diferentes pontos isoelétricos o que sugere variações no processamento ou modificações pós tradução. A expressão da SEA começa desde a segunda metade da fase de crescimento exponencial não sendo regulada pelo gene acessório regulador (*agr*) (Tremaine et al., 1993).

2.10.2. Enterotoxina estafilocócica B (SEB)

O gene *seb* pode ser encontrado no cromossomo bacteriano (Shafer e Iandolo, 1978), em um plasmídeo de $0,75 \times 10^6$ dalton (Shalita et al., 1977) e no plasmídeo pZA10 de 56,2 kilo-bases (Altboum et al., 1985). O gene contém aproximadamente 801 nucleotídeos (Johns e Khan, 1988) e a proteína precursora da enterotoxina B está formada por 267 aminoácidos, incluindo 27 resíduos de aminoácidos na porção final da sequência que é removido para a obtenção da SEB funcional.

2.10.3. Enterotoxina estafilocócica C (SEC)

As SECs são formadas por um grupo de enterotoxinas (SEC1, SEC2 e SEC3) muito conservadas com significativa relação imunológica cruzada (Bergdoll et al., 1965). Em isolados obtidos de bovinos observou-se que o gene *sec* é transportado pela ilha de patogenicidade (SaPIbov) (Fitzgerald et al., 2001). O gene *sec1* é transportado pelo plasmídeo pZA10 de 56,2 kilo-bases (Altboum et al., 1985). Os genes *sec1*, *sec2* e *sec3* apresentam 801 nucleotídeos e codificam proteínas precursoras das enterotoxinas de 266 aminoácidos contendo 27 resíduos de aminoácidos que são removidos para obter as enterotoxinas na sua forma ativa extracelular (Couch e Betley, 1989). A SEC3 difere da SEC2 em quatro aminoácidos e da SEC1 em nove aminoácidos, os 167 resíduos de aminoácidos terminais são idênticos nos três tipos de enterotoxina com exceção de um aminoácido conservado no SEC3 (Hovde et al., 1990). Analisando isolados de *S. aureus* obtidos de bovinos e ovinos Marr et al. (1993) observaram que cada estirpe produzia uma

variante específica para cada hospedeiro; este resultado sugere que a heterogeneidade da toxina se deve a um processo de modificação e seleção do gene *sec* que facilite a sobrevivência do *S. aureus* no respectivo hospedeiro.

2.10.4. Enterotoxina estafilocócica D (SED)

O gene *sed* está localizado no plasmídeo penicilinase de 27,6 kilo-bases denominado pIB485, estando este plasmídeo presente em todas os isolados de *S. aureus* produtoras de SED. O gene *sed* contém 777 nucleotídeos e codifica a proteína precursora de 258 aminoácidos que contém 30 resíduos de aminoácidos que serão removidos para obter a enterotoxina na sua forma ativa (Bayles e Iandolo, 1989). Esta enterotoxina é parte do grupo dos superantígenos (SEA, SED, SEE, SEH, SEI e SEJ) dependente de zinco para aumentar a afinidade na interação com a molécula do MHC classe II (Petersson et al., 2001). A síntese da SED é regulada mediante o gene acessório regulador (*agr*) de *S. aureus*. Como resultado dessa regulação, a expressão do *sed* acontece após a fase exponencial de crescimento (Bayles e Iandolo, 1989).

2.10.5. Enterotoxina estafilocócica E (SEE)

O gene *see* localiza-se em bacteriófago e apresenta 84% da sequência de nucleotídeos homóloga com a do gene *sea*. O gene *see* contém 774 nucleotídeos sendo a SEE sintetizada como uma proteína precursora de 257 aminoácidos, e a forma ativa da enterotoxina contém 230 resíduos de aminoácidos (Couch et al., 1988).

2.10.6. Enterotoxina estafilocócica G (SEG)

Os genes *seg* e *sei* foram descritos inicialmente em duas estirpes de *S. aureus* (Munson et al., 1998), mas ambos os genes coexistiram nos isolados clínicos de *S. aureus* avaliados por Jarraud et al. (1999). O gene *seg* encontra-se no agrupamento de genes de enterotoxinas no cromossomo bacteriano (*Enterotoxin Gene Cluster egc*) (Jarraud et al., 2001). Este gene contém 777 nucleotídeos e codifica uma proteína precursora de 258 aminoácidos que é clivada para obter a enterotoxina ativa com 233 aminoácidos (Munson et al., 1998).

2.10.7. Enterotoxina estafilocócica H (SEH)

O gene *seh* descrito por Ren et al. (1994), possui 654 nucleotídeos em sua sequência de ADN e codifica a proteína ativa de 218 aminoácidos. A sequência de aminoácidos

terminal NH₂ é única e nos testes imunológicos não foi identificada atividade cruzada entre a SEH e as enterotoxinas previamente descritas (Su e Wong, 1995).

2.10.8. Enterotoxina estafilocócica I (SEI)

O gene *sei* também é localizado no agrupamento de genes de enterotoxinas no cromossomo bacteriano (Jarraud et al., 2001). É formado por 729 nucleotídeos e sintetiza o precursor de 242 aminoácidos; a enterotoxina na sua forma ativa é composta por 218 aminoácidos (Munson et al., 1998).

2.10.9. Enterotoxina estafilocócica J (SEJ)

O plasmídeo penicilinase de 27,6 kilo-bases (pIB485) revelou um enquadramento de leitura aberta que codifica a SEJ. Os genes *sed* e *sej* transcrevem-se em direções opostas e estão separados por 895 nucleotídeos. Os estudos de amplificação por PCR do gene *sej* sugerem que os isolados de *S. aureus* portadoras do plasmídeo com o gene *sed* também apresentam o gene *sej* (Zhang et al., 1998).

No espaço entre os genes *seg* e *sei* e as regiões que limitam o agrupamento de genes de enterotoxinas observaram-se três regiões de leitura aberta referentes à enterotoxinas-like designadas *sek*, *sel* e *sem* e também dois pseudogenes ψ *ent1* e ψ *ent2* (Jarraud et al., 2001).

2.10.10. Comparação da estrutura primária protéica das enterotoxinas estafilocócicas

Sendo as SEs uma grande família de toxinas com estreita relação filogenética, resulta de interesse apresentar a comparação dos aminoácidos entre as diferentes enterotoxinas (**Tabela 3**). Os resultados da comparação de aminoácidos estão em concordância com os obtidos por sorologia, pois foi observada reação sorológica cruzada entre as enterotoxinas SEA e SEE (Lee et al., 1978). No caso da SEH é a enterotoxina mais distante das outras enterotoxinas (Jarraud et al., 2001).

Tabela 3: Porcentagem de aminoácidos idênticos das proteínas precursoras das enterotoxinas estafilocócicas¹.

	SEA	SEB	SEC1	SED	SEE	SEG	SEH	SEI	SEJ	SEM	SEM	SEO
SEA	100	33	30	50	83	27	37	39	64	35	39	37
SEB		100	68	35	32	43	33	31	33	29	32	36
SEC1			100	31	29	41	27	26	30	26	29	33
SED				100	52	27	35	33	51	41	38	39
SEE					100	27	35	35	63	37	39	37
SEG						100	34	28	29	28	31	30
SEH							100	33	35	38	34	31
SEI								100	34	31	31	57
SEJ									100	38	42	33
SEM										100	28	31
SEM											100	42
SEO												100

¹ A sequência de aminoácidos das proteínas precursoras de SEs foram comparadas usando o método Blast2 (Le Loir et al., 2003).

Observa-se uma elevada similaridade entre as enterotoxinas ativas SEC1, SEC2 e SEC3 (**Tabela 4**) e destas em relação à SEB. Forte reação cruzada foi observada nas provas sorológicas entre a SEB e SEC1 (Spero e Morlock, 1979). A comparação entre as sequências dos genes *sec3*, *sec1* e *seb* sugere que o ancestral *sec1-like* foi formado a partir da recombinação entre *sec3* e *seb* (Couch e Betley, 1989).

Tabela 4: Porcentagem de aminoácidos idênticos das enterotoxinas ativas¹.

	SEB	SEC1	SEC2	SEC3
SEB	100	64	62,8	62,8
SEC1		100	97,1	96,2
SEC2			100	98,3
SEC3				100

¹ As sequências de aminoácidos foram comparadas pelo método Clustal (Munson et al., 1998).

2.11. Toxina da síndrome do choque tóxico TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1*)

Inicialmente, a TSST-1 foi classificada como SEF, o que explica que na atualidade não exista esse sorotipo. O gene *tst* é transportado pela ilha de patogenicidade (SaPIbov) (Fitzgerald et al., 2001). Este gene é significativamente mais frequente em isolados de *S. aureus* associados às doenças em animais que em isolados associadas às doenças no homem (Van Leeuwen et al., 2005). As SEs e as TSST-1 apresentam estrutura e atividade biológica comuns (toxinas gastrointestinal e superantígeno), o que sugere que derivam de um ancestral comum. Apresentam significativas homologias na estrutura primária, secundária e terciária (Marrack e Kappler, 1990). O choque tóxico tem como manifestações clínicas febre acima de 39°C, exantema com descamação, hipotensão, podendo afetar os sistemas muscular (mialgia severa), mucoso (com enantema), renal (elevação de uréia e creatinina), hepático (elevação da transaminases e hiperbilirubinemia), hematológico (trombocitopenia e linfocitopenia) e do nervoso central (desorientação, sem sinais neurológicos focais) (Veronesi e Focaccia, 1997).

2.12. Polissacarídeo capsular (CP)

A maioria dos isolados de *S. aureus* envolvidas em infecções tanto nos humanos como em animais produzem polissacarídeo capsular (*Capsular Polysaccharide CP*), sendo os sorotipos 5 (CP5) e 8 (CP8), os mais frequentes (O'riordan e Lee, 2004). Outros dois sorotipos descritos foram os CP1 e CP2, baseados nas reações com antissoros de coelho (Karakawa e Vann, 1982). Os isolados com estes sorotipos produzem colônias mucóides em meio sólido e são raramente encontradas nos isolados clínicos (Arbeit et al., 1984; Sompolinsky et al., 1985). Os isolados que não reagem com os antissoros CP1, 2, 5 e 8 devem ser denominados como não tipificáveis (O'riordan e Lee, 2004).

A expressão dos sorotipos CP5 e CP8 são influenciados por condições ambientais e de crescimento da bactéria. Por exemplo, o crescimento de *S. aureus* em meio de cultura com limitações de ferro e sódio favorece a expressão CP8 (Lee et al., 1993). A expressão do CP5 pode ser afetada por altas concentrações de extrato de levedura, condições de crescimento alcalinas (Dassy et al., 1991), incremento nas concentrações de CO₂ (Stringfellow et al., 1991; Herbert et al., 1997) e anaerobiose (Dassy et al., 1991); porém a expressão do CP5 é favorecida quando o crescimento acontece no leite (Sutra et al., 1990).

Em relação à função do polissacarídeo capsular, a teoria melhor aceita é de que na patogênese das infecções estafilocócicas confere proteção anti-fagocitária o que permite a persistência do microrganismo no sangue ou em tecidos do hospedeiro (Sutra et al., 1990; Thakker et al., 1998). Outros grupos de pesquisadores acreditam que a não expressão do polissacarídeo capsular permite que esses isolados persistam por maior tempo no nicho intracelular da glândula mamária, enquanto que os isolados que expressam os polissacarídeos capsulares causam maior reação inflamatória e são eliminados mais rapidamente (Tuchscher et al., 2005). Estudos recentes sugerem que isolados com genótipos *cap5-agr* grupo I estão melhores adaptados às condições ambientais hostis que os genótipos *cap8-agr* grupo II, além de que este último genótipo (*cap8-agr* II) apresenta menor capacidade invasiva (Bardiau et al., 2016).

As estruturas bioquímicas dos polissacarídeos capsular CP1 (Murthy et al., 1983), CP2 (Hanessian e Haskell, 1964), CP5 (Moreau et al., 1990) e CP8 (Fournier et al., 1984) podem ser observadas na **Figura 2**. O CP5 e CP8 apresentam açúcares similares repetidos, mas os dois polissacarídeos são sorologicamente diferentes devido às diferenças entre as uniões entre os açúcares e ao sítio de O-acetilação do monossacarídeo residual (Jones, 2005).

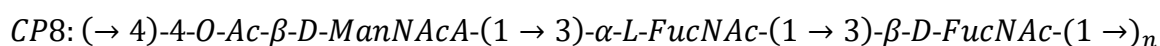
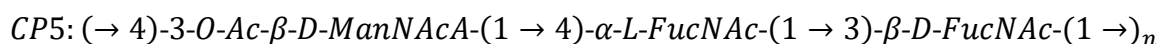
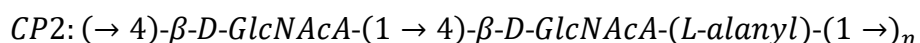
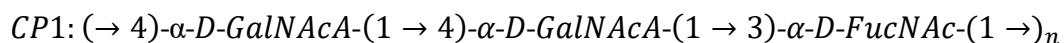


Figura 2. Estruturas bioquímicas dos polissacarídeos capsulares

Os genes que codificam para CP5 e CP8 são cromossômicos e de natureza alélica. Cada *locus* capsular está formado por 16 genes intimamente ligados, desde o *cap5(8) A* até *cap5(8) P* transcritos em um único sentido. As regiões centrais *cap5(8) HIJK* são homólogas entre si e específica para o alelo (**Figura 3**) (Cocchiario et al., 2006). Neste sentido, chama a atenção a confusão de alguns autores que descrevem isolados portadores de ambos genes, quando isso biologicamente não poderia ser possível, sendo mais provável o isolamento de duas estirpes diferentes cada uma portadora de um dos alelos. O trabalho publicado por Kumar et al. (2011), onde um dos isolados obtidos de casos de mastites clínica seria hipoteticamente portador dos dois alelos ou do trabalho publicado por Ote et al. (2011), em que 5/229 isolados de *S. aureus* causadores de mastite em bovinos apresentariam iguais características. O trabalho publicado por Salasia et al. (2011) chama atenção para o grande número de isolados que são descritos como portadores dos dois alelos *cap5(8)*, sendo 39,02% (16/41) do total dos isolados avaliados. Mais recentemente o trabalho publicado por Waryah et al. (2014) descreve um isolado como portador dos dois alelos.

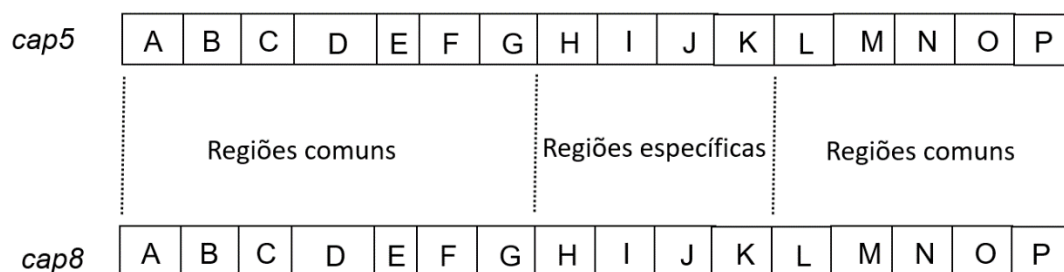


Figura 3. Diagrama esquemático das diferentes regiões dos *loci cap5* e *cap8* (Cocchiario et al., 2006). Cada quadrado representa os genes individuais formadores de cada *locus*.

2.13. Formação de biofilme

Os biofilmes são comunidades estruturadas de células bacterianas encapsuladas em uma matriz de polímeros autoproduzidos e aderidos a uma superfície viva ou inerte (Costerton et al., 1999). A variação entre as fases de crescimento planctônico e biofilme é causado por adaptação genética que faz com que a bactéria seja menos invasiva assim menos suscetível as defesas do hospedeiro e atividade dos agentes antimicrobianos.

Neste sentido, a formação de biofilme é um dos mais importantes mecanismos de sobrevivência da bactéria que vive no nicho extracelular. Confere proteção frente ao sistema imune do hospedeiro e atividade dos agentes antimicrobianos. Essa proteção frente ao

sistema imune do hospedeiro se deve a proteção conferida pelo polímero formador do biofilme frente à atividade fagocitária dos macrófagos, opsonização frente às espécies reativas de oxigênios dos polimorfonucleares. Diferentes mecanismos são conhecidos como responsáveis pela resistência de microrganismos com crescimento em biofilme frente a agentes antimicrobianos podendo ser mencionados: diminuição da penetração do agente antimicrobiano dentro do biofilme, alteração da taxa de crescimento dos microrganismos dentro do biofilme e modificações fisiológicas nas bactérias devido ao modo de crescimento no biofilme, incluindo as células persistentes (Melchior et al., 2006).

A fase planctônica de crescimento microbiano pode ser vista como a fase de dispersão do agente de uma superfície a outra. Na maioria dos ambientes naturais, os microrganismos tentam se aderir às superfícies disponíveis. Após a aderência inicial da bactéria na superfície, a motilidade superficial e a divisão binária são responsáveis pela incorporação de células aderidas (Stoodley et al., 2002). A fase inicial de formação de biofilme inclui duas sub-etapas: a primeira compreende a adesão das células à uma superfície, facilitada por adesinas associadas à parede celular que é resultado da interação de diferentes genes. A segunda sub etapa é caracterizada pela multiplicação celular e formação da estrutura madura de biofilme consistente em muitas camadas de células conectadas entre si por um polissacarídeo extracelular (Yarwood e Schlievert, 2003). Finalmente no processo de maturação, muitos *Staphylococcus* geram uma camada viscosa que dá uma maior proteção às bactérias no biofilme. A natureza química dessa camada viscosa ainda não foi bem definida, mas evidências sugerem que esta é formada predominantemente por polissacarídeos hidratados (Melchior et al., 2006).

O potencial de crescimento do biofilme bacteriano é limitado pela disponibilidade de nutrientes dentro do biofilme e os diferentes canais de fluxo através do biofilme visam manter a perfusão (Stoodley et al., 2002). Outros fatores que influenciam a maturação do biofilme são o pH interno, a perfusão de oxigênio, a fonte de carbono e a osmolaridade. Quando o biofilme atinge uma massa crítica, a camada de células externas começam a gerar células no estado planctônico, as quais ficam livres do biofilme e colonizam outras superfícies (Dunne, 2002).

A capacidade de formar biofilme pelos *Staphylococcus* pode ser estudada pela expressão fenotípica do biofilme ou pela triagem dos genes associados com esta formação. Estudo conduzido por Oliveira et al. (2006) indicou que isolados de *S. aureus* e *S.*

epidermidis são produtores de biofilme. No caso do *S. aureus*, a produção de biofilme diminui significativamente nos casos de mastites, mas aumenta a capacidade de colonização da glândula mamária (Cucarella et al., 2004).

A produção de biofilme está associada aos *loci ica* (*Intercellular Adhesion*), *bap* (*Biofilm-Associated Protein*), *agr* (*Accessory Gene Regulator*) e *sar* (*Staphylococcal Accessory Regulator*). Porém, os isolados com capacidade de produzir biofilme não necessariamente portam todos estes genes, o que demonstra que outros mecanismos também estão relacionados à formação de biofilme (Fox et al., 2005; Lasa e Penadés, 2006; Planchon et al., 2006).

No estudo de Tormo et al. (2005) foi identificado, clonado e sequenciado o gene *bap* em diferentes espécies de SCN (*S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hyicus*). Observaram uma alta similaridade deste gene quando comparado com o gene ortólogo de *S. aureus* o que sugere uma transferência genética horizontal da ilha de patogenicidade SaPIbov2; os isolados portadores do gene *bap* foram fortes produtores de biofilmes e não foram detectados os operons *icaABCD* em nenhum deles.

2.14. Atividade bactericida de nanopartículas de polipirrol

Existe uma procura por novos compostos que possam contribuir na profilaxia das mastites. Nos últimos anos os polímeros conjugados são utilizados por diferentes pesquisadores pela ampla possibilidade de aplicação deste material. Neste sentido, o polipirrol (PPy) é um dos polímeros mais estudados como foto-catalisador (De Oliveira e De Oliveira, 2013), biosensor (Xue et al., 2014), supercapacitores eletroquímicos (De Oliveira e De Oliveira, 2014) e como agente bactericida, sendo descrita sua atividade antibacteriana frente à *Escherichia coli* (ATCC 8739) (Varesano et al., 2013); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1388) e *S. aureus* (ATCC 25923) (Silva et al., 2016).

As condições de polimerização do pirrol (**Figura 4**) influenciam diretamente nas suas características físico-químicas. O comprimento da cadeia do polímero impede a difusão do mesmo, o que potencializa a sua atuação de forma localizada. A polimerização produz cargas positivas ao longo da cadeia de PPy, formando uma carga positiva a partir da união de três a cinco monômeros. Estas cargas positivas são responsáveis pela atividade bactericida, que se deve à ruptura da membrana lipídica que recobre a bactéria, com a consequente lise da célula pelas cadeias de polímeros (Varesano et al., 2013).

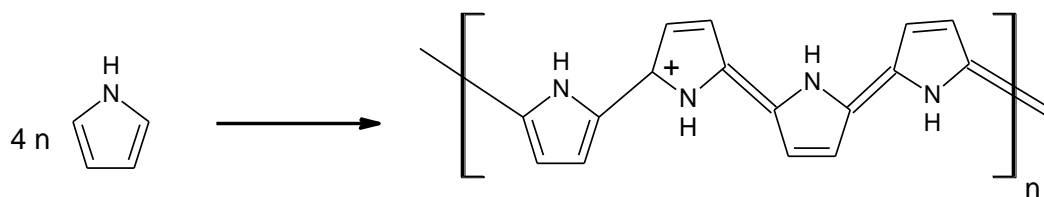


Figura 4. Polimerização do monômero pirrol

A biocompatibilidade do PPy apresenta-se como aspecto de interesse em diferentes estudos que abordam sistemas *in vitro* e *in vivo*. Os estudos não detectaram toxicidade aguda ou subaguda, efeito pirógeno, hemólise, alergia, efeito mutagênico e constatou-se um aumento da sobrevivência das células avaliadas (Wang et al., 2004), o que indica que o PPy apresenta uma boa biocompatibilidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente os isolados de *S. aureus* causadoras de mastite em rebanhos bovinos e caprinos leiteiros no estado de Pernambuco e verificar a eficácia de nanopartículas de polipirrol no controle deste agente.

3.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar genotipicamente os isolados de *S. aureus*, mediante a identificação genética de fatores determinantes da virulência.

- b) Avaliar a capacidade de formação de biofilme dos isolados de *S. aureus* por teste fenotípico.

- c) Avaliar a eficácia de nanopartículas de PPy em água frente a *S. aureus* produtores ou não de biofilme isolados de leite de vacas e cabras com mastites.

4. Capítulo 1: Virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from milk of cows and goats with clinical and subclinical mastitis

(Submetido ao periódico Journal of Dairy Science)

1 **Virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows and goats**
2 **with clinical and subclinical mastitis**

3 **Virulence genes of *Staph. aureus***

4
5 A.C. Acosta*¹, P.R.F. Oliveira*, L.A. Linden*, I.F. Silva†, E.S. Medeiros*, M.M.

6 Costa†, J.W. Pinheiro Junior*, R.A. Mota*

7
8 * Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina
9 Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco,
10 Brazil, 52171-900.

11 † Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Campus Ciências Agrárias,
12 Rodov. BR 407 Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho s/n, Petrolina,
13 PE, Brazil, 56300-990.

14
15 **¹Corresponding author:**

16 Atzel Candido Acosta Abad

17 Fax: + (55)81-33206425

18 Phone number: + (55)81-97792119

19 E-mail address: acabad80@gmail.com

20

21 **ABSTRACT**

22 The aim of the present study was to determine the distribution of virulence factors genes
23 among *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) strains isolated from cows and goats in
24 three different geographical areas of Pernambuco state, Brazil. Therefore, the possibility
25 that allelic variants at a given polymorphic locus of clumping factor (*clfA* and *clfB*) had
26 an impact on the distribution of virulence factors genes was investigated. One hundred
27 fifty strains (123 from bovines and 27 from goats) were included in the study. The
28 virulence factors involved in adhesion to host cells (*fnbA*, *fnbB*, *clfA* and *clfB*), toxins
29 (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *tsst*, *hla* and *hlb*), and capsular polysaccharide genes
30 (*cap5* and *cap8*) were analyzed by PCR. The virulence factors relative to the intensity of
31 mastitis (subclinical and clinical) showed no differences between groups. Three *clfA* and
32 five *clfB* genotypes were identified. None of the strains harbored *see* gene. The *sec* and
33 *tsst* genes were detected exclusively in strains from goat and the *seh* gene was detected
34 exclusively in bovine's strains. The toxic potential, as indicated by the number of toxins
35 genes per strain, showed significant differences between the bovine's and goat's strains.
36 Our data showed that *cap8* genotype had more virulence potential by the number of
37 virulence genes per strain. The *cap5* genotype was the predominant, especially in
38 bovine's strains in the semi-arid region. The results suggest that the distribution of
39 virulence factors genes changes in relation to allelic variants of *clfA* and *clfB*. The
40 inclusion of the potential virulence of the *Staphylococcus aureus* isolates from different
41 geographical origins and hosts may contribute to mastitis control programs and could be
42 used as an indicative of their potential risk to public health.

43 **Keywords:** molecular typing, *Staph. aureus*, genotyping, staphylococcal enterotoxin,
44 capsular polysaccharide.

45

INTRODUCTION

46

47 Intramammary infections (IMI) is the most significant cause of economic loss in the dairy
48 industry worldwide (Halasa et al., 2007). The average cost of clinical mastitis in high-
49 yielding cows was estimated in \$71 per cows and year (Bar et al. 2008). One of the most
50 important causes of IMI is the *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*), which is difficult
51 to eradicate in dairy cattle (Kerro et al., 2002) and dairy small ruminant (Bergonier et al.,
52 2003). Staphylococci are the main aetiological agents of ruminant IMI in Brazil (Mota et
53 al., 2012).

54 The pathogenesis and spread of *Staph. aureus* are multifactorial. The ability to cause such
55 a broad range of diseases is due to an abundance of virulence factors which facilitate
56 attachment, colonization, tissue invasion, toxinosis, and immune evasion (Zecconi et al.,
57 2006, Piccinini et al., 2010), but also the environment (Roberson et al., 1998). Besides
58 the host play an important role in the frequency and severity of these infections (Barkema
59 et al., 2006). This is a perfect time to introduce: the adhesion, the enterotoxin, and the
60 capsular polysaccharide, how they merge with the virulence factors and the establishment
61 of the infection in a briefly manner.

62 Adhesion is hypothesized to be a prerequisite and crucial early step for IMI (Kerro et al.,
63 2002). Two fibronectin binding protein (Fnb) homologues, FnbA and FnbB, have been
64 demonstrated to be involved in not only adhesion to cells but also internalization by cells
65 (Garzoni and Kelley, 2009). Other two homologues proteins important adhesion factors
66 involved in the pathogenesis of *Staph. aureus* are clumping factor (ClfA and ClfB, (Ní
67 Eidhin et al., 1998, Garzoni and Kelley, 2009).

68 One important group of virulence factors are staphylococcal enterotoxins (SEs). They
69 play a significant role in modulating the host immune response and may contribute to
70 maintain a suitable environment for colonization. Also, SEs and toxic shock syndrome

71 toxin 1 (TSST1) are superantigens, which have the ability to stimulate large populations
72 of T cells that have a particular V β element of the T-cell receptor (Omoe et al., 2003).
73 Other important toxins are hemolysins toxins, can act against a wide range of host cells
74 including erythrocytes, epithelial cells, endothelial cells, T cells, monocytes, and
75 macrophages (Berube and Wardenburg, 2013).
76 The capsular polysaccharide is a cell wall bacterial component that protects bacterium
77 from phagocytic uptake and enhances microbial virulence (Sutra et al., 1990). The *cap5*
78 and *cap8* genes are the predominant capsular types in *Staph. aureus* isolated from IMI in
79 ruminant in different countries (Gogoi-Tiwari et al., 2015).
80 The high pathogenicity of *Staph. aureus* strains is driving by multifactorial and complex
81 virulence factors. Appropriate molecular typing methods and information about the
82 genetic diversity of *Staph. aureus* strains in a particular region, may contribute to define
83 effective strategies for epidemiological control. The aim of the present study was to
84 determine the distribution of virulence factors genes among *Staph. aureus* strains isolated
85 from cows and goats in three different geographical areas of Pernambuco state, Brazil.
86 Therefore, the possibility that allelic variants at a given polymorphic locus (*clfA* and *clfB*)
87 impact the distribution of virulence factors genes was investigated.

88 MATERIAL AND METHODS

89 Ethical statement

90 The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the School
91 of Faculty of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (Portuguese
92 acronym UFRPE), under the protocol number 079/2014-CEUA.

93 Sample collection and presumptive identification of *Staph. aureus*

94 A total of 1,000 bovines milk samples and 1,253 goats milk samples were collected from
95 individual mammary glands after disinfection of the ostium with 70% ethanol following

96 the recommendations of the National Mastitis Council methods (National-Mastitis-
97 Council, 1999). The diagnosis of subclinical mastitis in cows were based on the California
98 Mastitis Test (CMT, Schalm and Noorlander, 1957). In goats, the IMI was defined as the
99 presence of 3 or more colonies of the same type after primary culture (Pantoja et al.,
100 2009). The samples were collected in 31 herds from three different geographical areas of
101 Pernambuco state, Brazil (7 herds from Atlantic Forest, 11 from Semi-Arid, and 13 from
102 Arid region). The climate of Atlantic Forest region is hot and humid, the Semi-Arid region
103 showed the semiarid climate, and the Arid region with arid climate.

104 The samples were transported to the laboratory under refrigeration in cool boxes (4–10°C)
105 with ice packs. Primary culture of milk samples was performed in 5% ovine blood agar
106 plates, which were incubated aerobically at 37 °C for 72 h. Milk samples were considered
107 contaminated when 3 or more dissimilar colony types were found (Pantoja et al., 2009,
108 Hiitiö et al., 2015). Presumptive identification as *Staph. aureus* was according to the
109 following scheme: Gram-positive cocci, haemolytic on blood agar, catalase positive, and
110 coagulase positive in 4–18 h (Zecconi et al., 2006). The *Staph. aureus* ATCC 29213 strain
111 was used as positive control.

112 **Confirmation of the presumptive identification of *Staph. aureus***

113 *Staph. aureus* species confirmation was performed by PCR amplification of the *nuc* gene,
114 as previously described by Brakstad et al. (1992) and Kim et al., (2001) with
115 modifications. The presumptively identified as *Staph. aureus* isolates were freshly
116 cultured in brain infusion broth (Merck) and incubated overnight at 37 °C. Then, the DNA
117 was extracted using a commercial kit (Promega) according to manufacturer's instructions
118 and stored at -20 °C. The *nuc_F* and *nuc_R* (**Table 1**) primers, which amplify a single
119 amplicon with an expected size of approximately 296 pb (nt 862768-863064,
120 HF937103.1), were specifically designed for the present study.

121 **PCR testing for virulence factors genes**

122 The primers used for amplification of the virulence factors genes fragments are shown in
123 **Table 1**. The PCR was performed in 0.2 mL tube with a total volume of 25 μ L containing:
124 PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 0.1 % Triton X- 100), 1.5 mM
125 MgCl₂, 250 μ M each dNTP, 0.5 μ M each gene specific primers, 1.5 U Taq DNA
126 polymerase (Promega), 20 ng DNAq, and distilled water.

127 PCR parameters for the amplification of the *nuc* gene and the virulence factors genes
128 fragments were as follows: 94 °C for 5 min (initial denaturation); 32 cycles of 94 °C for
129 1 min, annealing temperature °C (specific for each fragments, see **Table 1**) for 1 min and
130 72 °C for 1 min; and 72 °C for 5 min (final extension). The PCR products were visualized
131 by electrophoresis in 2 % agarose gel stained with Blue Green Loading Dye I (LGC
132 Biotecnologia) and photographed under UV illuminator (Molecular Imaging L.PIX
133 Loccus biotecnologia).

134 Three sample of each of virulence factors genes amplicons were purified using the
135 Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega) and bidirectionally sequenced by
136 standard protocols using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied
137 Biosystems, Foster City, CA, USA) in an automated sequencer ABI-PRISM 3130
138 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were aligned using the BioEdit
139 v.7.0.9 software (Hall, 1999) and compared with those available in the GenBank database
140 by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

141 **Data analysis**

142 Each *Staph. aureus* strains was considered the experimental unit in all analyses. Present
143 or absent genes frequencies were calculated as categorical (binary) variables generated
144 using Microsoft Excel. Significance between *Staph. aureus* strains groups was tested
145 using the chi-squared or Fisher's exact test (Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15,

146 Statpoint Technologies Inc, Warrenton, Virginia). Statistical significance was set at P-
147 value < 0.05 for the purpose of interpretation and discussion.

148 **RESULTS AND DISCUSSION**

149 One sample of *nuc* gene and each virulence factors amplicons (*fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *sea*,
150 *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *tsst*, *hla*, *hlb*, *cap5* and *cap8*) were sequenced and the partial
151 sequences were confirmed to correspond to GenBank. All *Staph. aureus* strains in the
152 present study were identified by genotypic method in which *nuc* gene was targeted using
153 specific primers. This method is well accepted and used for confirmation of *Staph. aureus*
154 from different sources worldwide (Brakstad et al., 1992, Graber et al., 2013, Rall et al.,
155 2014).

156 A total of 150 *Staph. aureus* strains were recovered from 1,000 bovine and 1,253 goats
157 milk samples, 123 (12.3%) isolated from bovine and 27 (2.15%) isolated from goat
158 specie. This microorganism was detected in 10.2% of cows tested with mastitis in the
159 state of São Paulo, Brazil (Silva et al., 2013) and were obtained the *Staph. aureus* in
160 17.5% of the 292 milk samples from cows with sub-clinical mastitis from 10 farms in
161 same state (Rall et al., 2014). *Staph. aureus* was also detected in 16.2% of sheep and goats
162 from Pernambuco and Bahia states (Peixoto et al., 2010) and in 2.72% of samples isolated
163 from lactating goats from the Paraíba state (Ferreira et al., 2014). The results corroborated
164 that *Staph. aureus* is important pathogen associated with mastitis in small and large
165 ruminants (Mota et al., 2012).

166 The frequency of virulence factors in relation with intensity of mastitis (subclinical and
167 clinical) showed no statistically significant differences between these two groups (data
168 not shown). Previous investigation showed no statistical significant results in the analysis
169 of the relationship between presence/absence of the different genes and the inflammatory
170 response (Middleton et al., 2002, Zecconi et al., 2006).

171 Others variables were study, the frequencies of virulence factors in relation with species
172 and regions of origin are presented in **Table 2**. Three *clfA* genotypes (*clfA*-, A1 1100bp
173 and A2 900bp) and five *clfB* genotypes (*clfB*-, B1 1000bp, B2 800bp, B3 600bp and B4
174 400bp) were identified. The frequencies of virulence factors in relation with *clfA* and *clfB*
175 genotyping are shown in **Table 3** and in relation with capsular genotyping are shown in
176 **Table 4**.

177 The fibronectin binding protein genes *fnbA* and *fnbB* were detected in 141 strains (94%)
178 and 122 strains (81.33%), respectively. The frequency of *fnbB* gene was higher (91.06%
179 P-value = 0.0000) in strains isolated bovine (**Table 2**), this frequency was higher in *clfA*
180 A2 genotype (98.28% P-value = 0.0001) and was smaller (22.22% P-value = 0.0000) in
181 *clfB* B3 genotype (**Table 3**). The strains that harbored *cap5* gene showed frequency higher
182 of *fnbB* gene (88.68% P-value = 0.0012) compared to *cap* (-) genotype strains (**Table 4**).
183 Based on PCR analysis, the clumping factor (*clfA* and *clfB*) were detected in 114 strains
184 (76%) and 115 strains (76.67%), respectively. In relation with regions of origin, both
185 genes (*clfA* 62.79% P-value = 0.0267 and *clfB* 65.12% P-value = 0.0323) showed smaller
186 frequencies in strains of Atlantic forest origin (**Table 2**), this could be related with the
187 cow and goat replacement rate. For the *clfA* gene the smaller frequencies (47.06% P-value
188 = 0.0000) was observe in *cap* (-) genotype (**Table 4**).

189 *Staph. aureus* adhesion cannot be explained by the action of a single virulence
190 determinant, and it is likely that a number of factors act in combination during the
191 infective process. The clumping factor A (ClfA) and clumping factor B (ClfB), are
192 members of a family of surface proteins which are characterized by the presence of an
193 repeat region (R) containing various numbers of the repeated serine-aspartate dipeptides
194 encoded by an 18-nucleotide DNA repeat at the 3' region of the *sdr* genes (Josefsson et

195 al., 1998). This information can be used for indexing genetic microvariation within
196 groups of closely related strains.

197 Seventy-eight strains (52%) tested were positive for the presence of one or more SEs
198 genes. It were found in 46.34% (n = 57) of the strains from bovine and 77.78% (n = 21)
199 of the strains from goat (P-value = 0.0000). The SEs genes most frequently detected were
200 *seg* (25.33%), followed by *seh* (18%), *sei* (13.33%), *sed* (10.67%), *sec* (7.33%), *sea*
201 (6.67%) and *seb* present in one strain (0.67%).

202 None of the strains harbored *see* gene. This gene is carried by a defective phage and the
203 DNA sequence cooperation between *sea* and *see* showed 84% of nucleotide sequence
204 homology (Couch et al., 1988). In an Italian study was observed very low frequency of
205 *see* gene in mastitis-related strains (Zecconi et al., 2006) or were not identified the *see*
206 gene in *Staph. aureus* isolated from milk or dairy products by Carfora et al., (2015) Italy
207 and Brazilian studies (Almeida et al., 2013, Ferreira et al., 2014, Silveira-Filho et al.,
208 2014).

209 The frequencies of *sea*, *seg* and *sei* genes were statistical significance higher in strains
210 isolates from goat (**Table 2**) and the *sec* gene was detect exclusively in strains from goat.
211 On the other hand, the *seh* gene was detected exclusively in strains from bovine. For *sec*
212 gene in relation with regions of origin was higher the frequency in goat's strains from
213 arid region (P-value = 0.0061) and for *seh* gene in bovine's strains was smaller the
214 frequency (P-value = 0.0206) in strains from Atlantic forest region (**Table 2**). The SEs
215 genes frequencies in relation with *clfA* and *clfB* genotyping are presented in **Table 3**. We
216 observe for the *sea* gene the smaller frequency (P-value = 0.0337) in strains with *clfA* A2
217 genotype. For the *sec* and *seh* genes were higher for strains with *clfA* A1 (P-value =
218 0.0129) and *clfA* A2 (P-value = 0.0227) genotype respectively. In relation with *clfB*

219 genotyping, higher frequencies were detected for *sec* (P-value = 0.0001), *seg* (P-value =
220 0.0214) and *sei* (P-value = 0.0000) genes in *clfB* B3 genotype.

221 The SEs genes in relation with specie was observed higher frequencies of this genes in
222 strains from goat (P-value = 0.0005). Also, statistical significance difference in *sea* (P-
223 value = 0.0011), *seb* (P-value = 0.0007), *sec* (P-value = 0.0040) and *seh* (P-value =
224 0.0000) genes, with higher frequencies for strains with *cap8* genotype (**Table 4**) was
225 observed. We would like to emphasize that in an important number of strains one or more
226 enterotoxin genes were identified and this suggests that *Staph. aureus* intramammary
227 infections could represent a risk for human health by the presence of enterotoxins in milk,
228 especially in goats milk. In Brazil, we found an important artisanal cheese production in
229 the northeastern region, in territories where the artisanal production of dairy products
230 predominates (Shinohara et al., 2015).

231 *Staph. aureus* enterotoxins are highly stable and resistant to heat and most proteolytic
232 enzymes such as pepsin or trypsin (Bhatia and Zahoor, 2007). The enterotoxin genes were
233 more prevalent among goat's strains than in bovine's strains. Important number of
234 artisanal product are made with goat's milk, such as artisanal cheese (Silva et al., 2012).
235 This can be hazardous to human health not only by the risk of pathogen transmission, but
236 also because of contamination with enterotoxins.

237 Genes encoding the SEs have different genetic structures, most of which are mobile
238 genetic elements. These genes can be located in chromosomes, plasmids, pathogenicity
239 islands and phages (Guimarães et al., 2013). The enterotoxins encoded by pathogenicity
240 islands support the hypothesis that they could play an important role in the evolution of
241 *Staph. aureus* as a pathogen (Omoe et al., 2003), but their role in mastitis pathogenesis is
242 still to be elucidated (Piccinini et al., 2010).

243 The frequency of *tsst* gene was 5.33% of the total of *Staph. aureus* strains studied; it was
244 detect exclusively in strains from goat (**Table 2**). No statistically significant difference
245 between groups was shown in relation with *clfA* and *clfB* genotyping (**Table 3**). In relation
246 with capsular genotyping was observed the smaller frequency (1.89% P-value = 0.0115)
247 for strains with *cap5* genotype (**Table 4**).

248 Generally, staphylococcal enterotoxins and TSST-1 may act as super antigens for cells of
249 the bovine immune system (Farahmand-Azar et al., 2016). This super antigenic toxins
250 play an important role in modulating the host immune response and may therefore
251 contribute to maintain a suitable environment for colonization (Omoe et al., 2003).

252 The *hla* gene was detected in 132 strains (88%) and *hlb* gene was detected in 128 strains
253 (85.33%). For both *hla* and *hlb* genes were observed higher frequencies for bovine's
254 strains (95.93% P-value = 0.0000 and 93.5% P-value = 0.0000 respectively) and the
255 smaller frequencies (78% P-value = 0.0233 and 72% P-value = 0.0042) for strains from
256 semi-arid region (**Table 2**). High frequencies were observed by Yadav et al., (2015) in
257 bovine's strains for the *hla* (93.75%) and *hlb* genes (81.25%).

258 In relation with *clfA* and *clfB* genotyping the *hla* gene showed the smaller frequency
259 (72.22%, P-value = 0.0004) for strains with *clfA* (-) genotype and *hlb* gene showed higher
260 frequency (96.55%, P-value = 0.0062) for strains with *clfA* A2 genotype. Both *hla* and
261 *hlb* genes showed smaller frequencies (P-value = 0.0004 and P-value = 0.0034
262 respectively) for strains with *clfB* B3 and *clfB* B4 genotypes (**Table 3**). The strains that
263 no harbored *cap5* or *cap8* genes showed the smaller frequencies (58.82% P-value =
264 0.0000 and 55.88% P-value = 0.0000) for both *hla* and *hlb* genes (**Table 4**).

265 The pathogenicity of *Staph. aureus* is related to the production of a wide variety of
266 exoproteins including alpha and beta hemolysins which contribute to its ability to causes
267 diseases in many mammalian species (Silva et al., 2005).

268 It is known that *Staph. aureus* intramammary infection pattern is often different from herd
269 to herd, and these patterns could be related to strain differences (van Leeuwen et al., 2005,
270 Zecconi et al., 2005). These differences have been also related to geographical and to
271 host- and tissue-related characteristics (Gilot and van Leeuwen, 2004, van Leeuwen et
272 al., 2005).

273 The capsular gene most frequently detected was the *cap5* gene (70.67%) and the *cap8*
274 gene was detected in only 10 strains (6.67%). The *cap5* gene showed higher frequencies
275 for bovine's strains (81.3% P-value = 0.0000) and strains from semi-arid region (87.72%
276 P-value = 0.0002, **Table 2**). In relation with *clfA* genotyping the *cap5* gene showed higher
277 frequencies (91.38%, P-value = 0.0000) for strains with *clfA* A2 genotype (**Table 3**).

278 Capsular polysaccharide is important virulence factors of *Staph. aureus* because it confers
279 resistance to phagocytosis (Sutra et al., 1990) and prolongs persistence of the pathogen
280 in the blood stream of the host (O'Riordan and Lee, 2004). However, hypothesized that
281 the lack of capsule expression may permit intracellular persistence of *Staph. aureus* and
282 promote subclinical mammary gland infection (Tuchscher et al., 2005). The *cap5* and
283 *cap8* loci are allelic and each contains sixteen closely linked genes, twelve of the sixteen
284 genes in the two gene clusters are nearly identical. The type-specific genes are located in
285 the central region of the loci comprising *cap5*HIIJK and the same genes for *cap8*HIIJK
286 (Sau et al., 1997).

287 The distribution of the different *cap* genotyping of *Staph. aureus* around the world may
288 differ (Ote et al., 2011, Gogoi-Tiwari et al., 2015), therefore, it is important to know their
289 prevalence in our geographic regions. Studies that characterized *cap* genotype of several
290 Brazilian *Staph. aureus* isolates in different regions (Cabral et al., 2004, Alves et al.,
291 2009) need to be consulted.

292 A characterization of 87 *Staph. aureus* strains from individual animal of 23 farms in six
293 different municipal district of tow geographical regions Bauru and Sorocaba of São Paulo
294 state found *cap5* gene in 11 (12.64%) strains and *cap8* gene in 76 (87.36%) strains (Cabral
295 et al., 2004). Similar results were found in a molecular characterization of *Staph. aureus*
296 isolated from small and large ruminants in 12 different regions of France as well as from
297 Brazil, the USA and Belgium (Alves et al., 2009). They showed that *cap8* gene was
298 predominant and accounted for 65.4 % of *Staph. aureus* strains, while *cap5* and the non-
299 typeable cap gene accounted for 30.7% and 3.9%, respectively. When considering the
300 host species, *cap8* was clearly predominant in small ruminants, with an overall prevalence
301 of 83.1% in ovine-caprine's strains. In contrast, *cap5* was slightly predominant in
302 bovine's strains (56.3 %).

303 In our study, 34 (22.67%) strains did not harbored *cap5* or *cap8* genes. The *Staph. aureus*
304 that do not express capsule induce chronic mastitis in mice, suggesting that the absence
305 of capsule synthesis may help the bacteria to persist in the mammary glands (Tuchscher
306 et al., 2005).

307 The existence of two groups of *Staph. aureus* strains isolated from bovine mastitis based
308 on capsular typing, intracellular survival and *agr*-typing were confirmed by Bardiau et
309 al., (2016). They hypothesised that the first group “cap5-agrI” may correspond to strains
310 adapted to the intracellular niche leading to chronic infection and that the second group
311 “cap8-agrII” may correspond to strains better adapted to the extracellular niche leading
312 to acute infection. The discovering of these two groups is highly important as they may
313 represent two clusters that are adapted differently to the host and/or the surrounding
314 environment.

315

CONCLUSION

316

317 The results did not support the hypothesis that the development of subclinical or clinical
318 mastitis by *Staph. aureus* could be related to the presence of specific combinations of the
319 virulence factors. Based on the molecular data, it is assumed that goat's strains are more
320 potential toxic than bovine's strains. Our data show that *cap8* genotype has more
321 virulence potential by the number of virulence genes per strain. The *cap5* genotype is the
322 predominant, especially in bovine's strains and the semi-arid region. Our findings also
323 suggested that changes in the distribution of virulence factors genes in relation to allelic
324 variants of *clfA* and *clfB* exist.

325

ACKNOWLEDGEMENTS

326

327 To the Pernambuco Research and Technology Foundation (Fundação de Amparo a
328 Ciência e Tecnologia de Pernambuco – **FACEPE**; grant number IBPG-0439-5.05/12)
329 and **CNPq** (National Council for Scientific and Technological Development; grant
330 number: (442746/2014-8) for financial support.

331

REFERENCES

332

- 333 Almeida, L. M. d., M. Z. P. de Almeida, C. L. d. Mendonça, and E. M. Mamizuka. 2013.
334 Comparative analysis of *agr* groups and virulence genes among subclinical and
335 clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast
336 of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 44(2):493-498. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1517-
337 83822013000200026.
- 338 Alves, P. D. D., J. A. McCulloch, S. Even, C. Le Maréchal, A. Thierry, N. Grosset, V.
339 Azevedo, C. A. Rosa, E. Vautor, and Y. Le Loir. 2009. Molecular characterisation
340 of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a
341 host rather than tissue specificity. *Vet. Microbiol.*137(1–2):190-195.
342 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.014.
- 343 Bar, D., L. W. Tauer, G. Bennett, R. N. González, J. A. Hertl, Y. H. Schukken, H. F.
344 Schulte, F. L. Welcome, and Y. T. Gröhn. 2008. The Cost of Generic Clinical
345 Mastitis in Dairy Cows as Estimated by Using Dynamic Programming. *J. Dairy Sci.*
346 91(6):2205-2214. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0573.

- 347 Bardiau, M., J. Caplin, J. Detilleux, H. Graber, P. Moroni, B. Taminiau, and J. G. Mainil.
 348 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine
 349 mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-
 350 typing. *Vet. Microbiol.* 185:1-6. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.003.
- 351 Barkema, H. W., Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks. 2006. Invited Review: The Role of
 352 Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine
 353 *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J. Dairy Sci.* 89(6):1877-1895.
 354 doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1.
- 355 Bergonier, D., R. de Crémoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, and X. Berthelot. 2003. Mastitis
 356 of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34(5):689-716.
 357 doi:http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003030
- 358 Berube, B. and J. Wardenburg. 2013. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a century
 359 of intrigue. *Toxins* 5(6):1140-1166. doi:http://dx.doi.org/10.3390/toxins5061140.
- 360 Bhatia, A. and S. Zahoor. 2007. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. *J. Clin.*
 361 *Diag. Res.* 3(1):188-197.
- 362 Brakstad, O., K. Aasbakk, and J. A. Maeland. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus*
 363 by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J. Clin. Microbiol.*
 364 30(7):1654-1660.
- 365 Cabral, K., C. Lämmle, M. Zschöck, H. Langoni, M. E. P. de Sá, C. Victória, and A. v
 366 Da Silva. 2004. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from
 367 bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50(11):901-909.
 368 doi:http://dx.doi.org/10.1139/w04-082.
- 369 Carfora, V., A. Caprioli, N. Marri, D. Sagrafoli, C. Boselli, G. Giacinti, G. Giangolini, L.
 370 Sorbara, S. Dottarelli, A. Battisti, and S. Amatiste. 2015. Enterotoxin genes,
 371 enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated
 372 from milk and dairy products in Central Italy. *Int. Dairy J.* 42:12-15.
 373 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.009.
- 374 Couch, J. L., M. T. Soltis, and M. J. Betley. 1988. Cloning and nucleotide sequence of
 375 the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170(7):2954-2960.
- 376 Farahmand-Azar, S., M. Ahmadi, H. Dastmalchi Saei, and E. Anassori. 2016.
 377 Identification of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) gene in *Staphylococcus*
 378 *aureus* isolated from bovine mastitis milk. *Arch. Razi Inst.* 68(1):17-22.
 379 doi:http://dx.doi.org/10.7508/ari.2013.01.003.
- 380 Ferreira, D. H., M. d. G. X. Carvalho, M. J. Nardelli, F. G. Sousa, and C. J. Oliveira.
 381 2014. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing
 382 mastitis in lactating goats. *Pesqui. Vet. Bras.* 34(7):633-636.
 383 doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000700004
- 384 Garzoni, C. and W. L. Kelley. 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for
 385 intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 17(2):59-65.
 386 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.005.
- 387 Gilot, P. and W. van Leeuwen. 2004. Comparative analysis of agr locus diversification
 388 and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus*
 389 isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42(3):1265-1269.
 390 doi:http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.3.1265-1269.2004.
- 391 Gogoi-Tiwari, J., C. Babra Waryah, R. Sunagar, H. B. Veeresh, V. Nuthanalakshmi, P.
 392 L. Preethirani, R. Sharada, S. Isloor, A. Bhat, H. Al-Salami, N. R. Hegde, and T. K.
 393 Mukkur. 2015. Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases
 394 in Australia and India. *Aust. Vet. J.* 93(8):278-282. doi:
 395 http://dx.doi.org/10.1111/avj.12349.

396 Graber, H., S. Pfister, P. Burgener, R. Boss, M. Meylan, and J. Hummerjohann. 2013.
397 Bovine *Staphylococcus aureus*: diagnostic properties of specific media. Res. Vet. Sci.
398 95(1):38-44. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.023.

399 Guimarães, F. d. F., D. B. Nóbrega, V. B. Richini-Pereira, P. M. Marson, J. C. de
400 Figueiredo Pantoja, and H. Langoni. 2013. Enterotoxin genes in coagulase-negative
401 and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. J. Dairy Sci.
402 96(5):2866-2872. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5864.

403 Halasa, T., K. Huijps, O. Østerås, and H. Hogeveen. 2007. Economic effects of bovine
404 mastitis and mastitis management: A review. Vet. Quart. 29(1):18-31.
405 doi:http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224.

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

408 Hiitiö, H., R. Riva, T. Autio, T. Pohjanvirta, J. Holopainen, S. Pyörälä, and S. Pelkonen.
409 2015. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics
410 compared with in-depth conventional culture. J. Dairy Res.82(02):200-208.
411 doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0022029915000084.

412 Josefsson, E., K. W. McCrea, D. N. Eidhin, D. O'Connell, J. Cox, M. Hook, and T. J.
413 Foster. 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene
414 family of *Staphylococcus aureus*. Microbiology 144(12):3387-3395.
415 doi:http://dx.doi.org/10.1099/00221287-144-12-3387.

416 Kerro, D. O., J. Van Dijk, and H. Nederbragt. 2002. Factors involved in the early
417 pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial
418 adhesion and invasion. A review. Vet. Quart. 24(4):181-198.
419 doi:http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2002.9695135.

420 Kim, C. H., M. Khan, D. E. Morin, W. L. Hurley, D. N. Tripathy, M. Kehrl Jr, A. O.
421 Oluoch, and I. Kakoma. 2001. Optimization of the PCR for detection of
422 *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. J. Dairy Sci. 84(1):74-83.
423 doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74454-2.

424 Mehrotra, M., G. Wang, and W. M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for detection of genes
425 for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome
426 toxin 1, and methicillin resistance. J. Clin. Microbiol. 38(3):1032-1035.

427 Middleton, J. R., L. K. Fox, J. M. Gay, J. W. Tyler, and T. E. Besser. 2002. Influence of
428 *Staphylococcus aureus* strain-type on mammary quarter milk somatic cell count and
429 N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in cattle from eight dairies. J. Dairy Sci.
430 85(5):1133-1140. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74175-1

431 Mota, R. A., E. S. de Medeiros, M. V. dos Santos, J. W. Pinheiro Júnior, A. P. B. Moura,
432 and L. C. A. Coutinho. 2012. Participação dos *Staphylococcus spp* na etiologia das
433 mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). Braz. An. Sci.
434 13(1):124-130. doi:http://dx.doi.org/10.5216/cab.v13i1.3790.

435 National Mastitis Council. 1999. Laboratory and field handbook on bovine mastitis.
436 National Mastitis Council Inc., Madison, WI.

437 Ní Eidhin, D., S. Perkins, P. Francois, P. Vaudaux, M. Höök, and T. J. Foster. 1998.
438 Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of
439 *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 30(2):245-257.
440 doi:http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01050.x.

441 O'Riordan, K. and J. C. Lee. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin.
442 Microbiol. Rev. 17(1):218-234. doi:http://dx.doi.org/10.1128/CMR.17.1.218-
443 234.2004.

- 444 Omoe, K., D.-L. Hu, H. Takahashi-Omoe, A. Nakane, and K. Shinagawa. 2003.
445 Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related
446 putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 71(10):6088-6094.
447 doi:http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.10.6088-6094.2003.
- 448 Ote, I., B. Taminiau, J.-N. Duprez, I. Dizier, and J. G. Mainil. 2011. Genotypic
449 characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates
450 associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153(3-4):285-292.
451 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.042.
- 452 Pantoja, J. C. F., C. Hulland, and P. Ruegg. 2009. Somatic cell count status across the dry
453 period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent
454 lactation. *J. Dairy Sci.* 92(1):139-148. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1477.
- 455 Peixoto, R. M., C. A. d. França, A. F. d. Souza Júnior, J. L. A. Veschi, and M. M. d.
456 Costa. 2010. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados
457 bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas
458 empregadas no diagnóstico. *Pesqui. Vet. Bras.* 30(9):735-740.
- 459 Piccinini, R., V. Borromeo, and A. Zecconi. 2010. Relationship between *S. aureus* gene
460 pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Vet. Microbiol.* 145(1-2):100-105.
461 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.005.
- 462 Rall, V. L. M., E. S. Miranda, I. G. Castilho, C. H. Camargo, H. Langoni, F. F. Guimarães,
463 J. P. Araújo Júnior, and A. Fernandes Júnior. 2014. Diversity of *Staphylococcus*
464 species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and
465 cows with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 97(2):829-837.
466 doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7226.
- 467 Roberson, J., L. Fox, D. Hancock, J. Gay, and T. Besser. 1998. Sources of intramammary
468 infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *J. Dairy*
469 *Sci.* 81(3):687-693. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75624-3.
- 470 Sabat, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz,
471 J. Travis, and J. Potempa. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus*
472 strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and
473 genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1801.
474 doi:http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.4.1801-1804.2003
- 475 Sau, S., N. Bhasin, E. R. Wann, J. C. Lee, T. J. Foster, and C. Y. Lee. 1997. The
476 *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression
477 contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiology*
478 143(7):2395-2405.
- 479 Schalm, O. and D. Noorlander. 1957. Experiments and observations leading to
480 development of the California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130(5):199.
- 481 Shinohara, N. K. S., M. C. G. d. Santos, S. T. C. Medeiros, M. d. R. D. F. Padilha, and
482 M. Matsumoto. 2015. Cultural Importance of Cheese Type for Kingdom
483 Pernambuco. *Holos* 1(0):62. doi:http://dx.doi.org/10.15628/holos.2015.2488.
- 484 Silva, E. R. d., J. U. D. Boechat, J. C. D. Martins, W. P. B. Ferreira, A. P. Siqueira, and
485 N. d. Silva. 2005. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated
486 from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. *Small Ruminant Res.* 56(1):271-
487 275. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.04.011.
- 488 Silva, N., F. Guimarães, M. Manzi, P. Budri, E. Gómez-Sanz, D. Benito, H. Langoni, V.
489 Rall, and C. Torres. 2013. Molecular characterization and clonal diversity of
490 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in
491 Brazil. *J. Dairy Sci.* 96(11):6856-6862. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6719

- 492 Silva, R., M. Lima, J. Viana, V. Bezerra, M. Pimentel, A. Porto, M. Cavalcanti, and J.
493 Lima Filho. 2012. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used
494 as a functional food? *Food Chem.* 135(3):1533-1538.
495 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058.
- 496 Silveira-Filho, V. M., I. S. Luz, A. P. F. Campos, W. M. Silva, M. P. S. Barros, E. S.
497 Medeiros, M. F. L. Freitas, R. A. Mota, M. J. Sena, and T. C. Leal-Balbino. 2014.
498 Antibiotic Resistance and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Isolated
499 from Cow's Milk and Dairy Products in Northeast Brazil. *J. Food Protect.* 77(4):583-
500 591. doi:http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-13-343.
- 501 Sutra, L., P. Rainard, and B. Poutrel. 1990. Phagocytosis of mastitis isolates of
502 *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are
503 influenced by growth in the presence of milk. *J. Clin. Microbiol.* 28(10):2253-2258.
- 504 Tuchscher, L. P. N., F. R. Buzzola, L. P. Alvarez, R. L. Caccuri, J. C. Lee, and D. O.
505 Sordelli. 2005. Capsule-Negative *Staphylococcus aureus* Induces Chronic
506 Experimental Mastitis in Mice. *Infect. Immun.* 73(12):7932-7937.
507 doi:http://dx.doi.org/10.1128/iai.73.12.7932-7937.2005.
- 508 van Leeuwen, W. B., D. C. Melles, A. Alaidan, M. Al-Ahdal, H. A. Boelens, S. V.
509 Snijders, H. Wertheim, E. van Duijkeren, J. K. Peeters, P. J. van der Spek, R.
510 Gorkink, G. Simons, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum. 2005. Host- and tissue-
511 specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187(13):4584-4591.
512 doi:http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.13.4584-4591.2005.
- 513 Yadav, J., T. Bhati, and A. K. Kataria. 2015. Phenotypic and Genotypic Haemolysin
514 Properties of *Staphylococcus aureus* obtained from milk of cattle and buffalo with
515 clinical mastitis. *J. Pure Appl. Microbiol.* 9(1):349-355.
- 516 Zeconi, A., E. Binda, V. Borromeo, and R. Piccinini. 2005. Relationship between some
517 *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts.
518 *J. Dairy Res.* 72(02):203-208. doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0022029905000841.
- 519 Zeconi, A., L. Cesaris, E. Liandris, V. Daprà, and R. Piccinini. 2006. Role of several
520 *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine
521 mammary gland. *Microb. Pathogenesis* 40(4):177-183.
522 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2006.01.001.

523

524 **Table 1.** Nucleotide sequences and their characteristics for the *Staph. aureus* gene-
 525 specific oligonucleotide primers used in this study.

Target gene	Name	Oligonucleotide sequence (5' - 3')	Expected size	At (°C) ¹
<i>nuc</i>	nuc_F	GGTTCTGAAGATCCAACAGTAT	296pb	61
	nuc_R	GCTAAGCCACGTCCATATTTA		
<i>fnbA</i>	fnbA_R	ACTTCACCTGTCCGCCATTAC	539pb	57
	fnbA_F	GCAGTACAAGCACCACAAAC		
<i>fnbB</i>	fnbB_F	AGGCGACGGCAAAGATAAA	317pb	60
	fnbB_R	TAGTAACCTGACCACCACCT		
<i>clfA</i> ²	clfA_F	GATTCTGACCCAGGTTTCAGA	945pb	55
	clfA_R	CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT		
<i>clfB</i> ²	clfB_F	ATGGTGATTCAGCAGTAAATCC	880pb	55
	clfB_R	CATTATTTGGTGGTGTAACTCTT		
<i>sea</i>	sea_F	CCGAAGGTTCTGTAGAAGTATG	269pb	55
	sea_R	GCTTGTATGTATGGTGGTGTA		
<i>seb</i>	seb_F	CCCGTTTCATAAGGCGAGTT	314pb	57
	seb_R	ACGTAGATGTGTTTGGAGCTAAT		
<i>sec</i> ³	sec_F	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	451pb	57
	sec_R	CACACTTTTAGAATCAACCG		
<i>sed</i>	sed_F	GTCACTCCACACGAAGGTAATAA	255pb	55
	sed_R	GAGACTTTAGACCCATCAGAAGAA		
<i>see</i> ³	see_F	GCTGGAGGCACACCAAATA	301pb	57
	see_R	CATAACTTACCGTGGACCCTTC		
<i>seg</i>	seg_F	GCCAGTGTCTTGCTTTGTAATC	491pb	56
	seg_R	GAATGCTCAACCCGATCCTAA		
<i>seh</i>	seh_F	CACATCATATGCGAAAGCAGAAG	365pb	60
	seh_R	CCCAAACATTAGCACCAATCAC		
<i>sei</i>	sei_F	AGGCAGTCCATCTCCTGTATAA	568pb	55
	sei_R	TGCTCAAGGTGATATTGGTGTAG		
<i>tsst</i> ³	tsst_F	ACCCCTGTTCCCTTATCATC	326pb	57
	tsst_R	TTTTCAGTATTTGTAACGCC		
<i>hla</i>	hla_F	CTGTAGCGAAGTCTGGTGAAA	293pb	62
	hla_R	CGGCCTTATTGGTGCAAATG		
<i>hlb</i>	hla_F	GCCAAAGCCGAATCTAAGAAAG	495pb	60
	hla_R	ATCATGTCCAGCACCACAA		
<i>cap5</i>	cap5_F	CGAACCGATGATTGATGCTATTG	555pb	61
	cap5_R	TGCTATGACTGCACCAGTATTT		
<i>cap8</i>	cap8_F	GGAGGAAATGACGATGAGGATAG	608pb	61
	cap8_R	TAGCTTCTGTAGCGGTGAATG		

526 ¹ Annealing temperature °C. ² PCR primers sequence were designed by Sabat et al.,
 527 (2003). ³ PCR primers sequence were designed by Mehrotra et al., (2000).

528 **Table 2.** Absolute and relative frequency of virulence factors in relation with species and regions of origin.

	Species					Regions						
	Bovine (n=123)		Goat (n=27)		P-value	Atlantic Forest (n=43)		Semi-Arid (n=57)		Arid (n=50)		P-value
	AF ¹	RF ²	AF	RF		AF	RF	AF	RF	AF	RF	
Virulence factors involved in adhesion to host cells												
<i>fnbA</i>	115	93.50	26	96.30	0.8400	38	88.37	54	94.74	49	98.00	0.1451
<i>fnbB</i>	112	91.06	10	37.04	0.0000	33	76.74	51	89.47	38	76.00	0.1357
<i>clfA</i>	96	78.05	18	66.67	0.3454	27	62.79 ^A	49	85.96 ^B	38	76.00 ^{AB}	0.0267
<i>clfB</i>	93	75.61	22	81.48	0.4316	28	65.12 ^A	43	75.44 ^{AB}	44	88.00 ^B	0.0323
Virulence factors: toxins.												
<i>sea</i>	5	4.07	5	18.52	0.0062	6	13.95	3	5.26	1	2.00	0.0610
<i>seb</i>	1	0.81	0	0.00	0.6624	0	0.00	1	1.75	0	0.00	0.4452
<i>sec</i>	0	0.00	11	40.74	0.0000	3	6.98 ^{AB}	0	0.00 ^A	8	16.00 ^B	0.0061
<i>sed</i>	14	11.38	2	7.41	0.2574	4	9.30	7	12.28	5	10.00	0.8789
<i>see</i>	0	0.00	0	0.00		0	0.00	0	0.00	0	0.00	
<i>seg</i>	23	18.70	15	55.56	0.0034	9	20.93	14	24.56	15	30.00	0.6013
<i>seh</i>	27	21.95	0	0.00	0.0240	2	4.65 ^A	12	21.05 ^B	13	26.00 ^B	0.0206
<i>sei</i>	10	8.13	10	37.04	0.0076	5	11.63	6	10.53	9	18.00	0.4923
<i>tsst</i>	0	0.00	8	29.63	0.0000	3	6.98	0	0.00	5	10.00	0.0611
<i>hla</i>	118	95.93	14	51.85	0.0000	39	90.70 ^{AB}	54	94.74 ^A	39	78.00 ^B	0.0233
<i>hlb</i>	115	93.50	13	48.15	0.0000	39	90.70 ^A	53	92.98 ^A	36	72.00 ^B	0.0042
Virulence factors to evade innate immune defenses												
<i>cap5</i>	100	81.30	6	22.22	0.0000	30	69.77 ^A	50	87.72 ^B	26	52.00 ^C	0.0002
<i>cap8</i>	8	6.50	2	7.41	0.7048	1	2.33	5	8.77	4	8.00	0.4014

529 ¹ Absolute frequency, ² Relative frequency, Statistical significance P-value < 0.05

530 **Table 3.** Absolute and relative frequency of virulence factors in relation with *clfA* and *clfB* genotyping

	<i>clfA</i> genotyping							<i>clfB</i> genotyping									P-value		
	<i>clfA</i> -		<i>clfA</i> A1		<i>clfA</i> A2		P-value	<i>clfB</i> -		<i>clfB</i> B1		<i>clfB</i> B2		<i>clfB</i> B3		<i>clfB</i> B4		P-value	
	(n=36)		(n=56)		(n=58)			(n=35)		(n=41)		(n=66)		(n=9)		(n=3)			
AF ¹	RF ²	AF	RF	AF	RF	AF	RF	AF	RF	AF	RF	AF	RF	AF	RF	AF	RF		
Virulence factors involved in adhesion to host cells																			
<i>fnbA</i>	31	86,11	55	98,21	55	94,83	0.0549	32	91,43	39	95,12	59	89,39	9	100,00	2	66,67	0.2723	
<i>fnbB</i>	25	69,44 ^A	40	71,43 ^A	57	98,28 ^B	0.0001	32	91,43 ^A	38	92,68 ^A	48	72,73 ^{AB}	2	22,22 ^B	2	66,67 ^A	0.0000	
Virulence factors: toxins.																			
<i>sea</i>	4	11,11 ^A	6	10,71 ^A	0	0,00 ^B	0.0337	3	8,57	2	4,88	5	7,58	0	0,00	0	0,00	0.8382	
<i>seb</i>	1	2,78	0	0,00	0	0,00	0.2062	0	0,00	0	0,00	1	1,52	0	0,00	0	0,00	0.8446	
<i>sec</i>	3	8,33 ^{AB}	8	14,29 ^B	0	0,00 ^A	0.0129	1	2,86	0	0,00 ^A	6	9,09 ^A	4	44,44 ^B	0	0,00 ^A	0.0001	
<i>sed</i>	3	8,33	5	8,93	8	13,79	0.6182	4	11,43	3	7,32	8	12,12	1	11,11	0	0,00	0.8842	
<i>see</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00		0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
<i>seg</i>	8	22,22	19	33,93	11	18,97	0.1665	9	25,71 ^A	12	29,27 ^{AB}	11	16,67 ^A	6	66,67 ^B	0	0,00 ^A	0.0214	
<i>seh</i>	2	5,56 ^A	9	16,07 ^{AB}	16	27,59 ^B	0.0227	7	20,00	11	26,83	9	13,64	0	0,00	0	0,00	0.2526	
<i>sei</i>	5	13,89	8	14,29	7	12,07	0.9365	7	20,00 ^A	2	4,88 ^A	5	7,58 ^A	6	66,67 ^B	0	0,00 ^A	0.0000	
<i>tsst</i>	3	8,33	5	8,93	0	0,00	0.0695	1	2,86	0	0,00	5	7,58	2	22,22	0	0,00	0.0628	
<i>hla</i>	26	72,22 ^A	48	85,71 ^B	58	100,00 ^C	0.0002	31	88,57 ^A	38	92,68 ^A	58	87,88 ^A	3	33,33 ^B	2	66,67 ^A	0.0000	
<i>hlb</i>	27	75,00 ^A	45	80,36 ^A	56	96,55 ^B	0.0062	32	91,43 ^A	37	90,24 ^A	54	81,82 ^A	4	44,44 ^B	1	33,33 ^B	0.0003	
Virulence factors to evade innate immune defenses																			
<i>cap5</i>	17	47,22 ^A	36	64,29 ^A	53	91,38 ^B	0.0000	25	71,43	34	82,93	41	62,12	4	44,44	2	66,67	0.1600	
<i>cap8</i>	1	2,78	6	10,71	3	5,17	0.2825	0	0,00	4	9,76	6	9,09	0	0,00	0	0,00	0.3043	

531 ¹ Absolute frequency, ² Relative frequency, Statistical significance P-value < 0.05

532 **Table 4.** Absolute and relative frequency of virulence factors in relation with capsular
 533 genotyping.

	Capsular genotyping						P-value
	<i>cap</i> - (n=34)		<i>cap5</i> (n=106)		<i>cap8</i> (n=10)		
	AF ¹	RF ²	AF	RF	AF	RF	
Virulence factors involved in adhesion to host cells							
<i>fnbA</i>	31	91.18	100	94.34	10	100.00	0.5706
<i>fnbB</i>	21	61.76 ^A	94	88.68 ^B	7	70.00 ^{AB}	0.0012
<i>clfA</i>	16	47.06 ^A	89	83.96 ^B	9	90.00 ^B	0.0000
<i>clfB</i>	24	70.59	81	76.42	10	100.00	0.1556
Virulence factors: toxins.							
<i>SEs</i>	19	55.88 ^A	49	46.23 ^A	10	100.00 ^B	0.0005
<i>sea</i>	6	17.65 ^A	2	1.89 ^B	2	20.00 ^A	0.0011
<i>seb</i>	0	0.00 ^A	0	0.00 ^A	1	10.00 ^B	0.0007
<i>sec</i>	6	17.65 ^{AB}	3	2.83 ^A	2	20.00 ^B	0.0040
<i>sed</i>	3	8.82	12	11.32	1	10.00	0.9185
<i>see</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
<i>seg</i>	10	29.41	24	22.64	4	40.00	0.4032
<i>seh</i>	0	0.00 ^A	21	19.81 ^A	6	60.00 ^B	0.0000
<i>sei</i>	7	20.59	11	10.38	2	20.00	0.2586
<i>tsst</i>	5	14.71 ^A	2	1.89 ^B	1	10.00 ^{AB}	0.0115
<i>hla</i>	20	58.82 ^A	102	96.23 ^B	10	100.00 ^B	0.0000
<i>hlb</i>	19	55.88 ^A	100	94.34 ^B	9	90.00 ^B	0.0000

534 ¹ Absolute frequency, ² Relative frequency, Statistical significance P-value < 0.05

535

5. Capítulo 2: Eficácia antibacteriana do polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* produtores ou não de biofilme isolados de amostras de leite mastítico de vacas e cabras

(Submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

1 **Eficácia antibacteriana do polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* produtores ou**
2 **não de biofilme isolados de amostras de leite mastítico de vacas e cabras**
3 **Antibacterial efficacy of polypyrrole against biofilm producer or not *Staphylococcus***
4 ***aureus* isolated from cows and goats with mastitis**

5
6 A.C. Acosta^{1*}, A.S. Santos¹, F.A.G. da Silva², E.S. Medeiros¹, H.P. de Oliveira², M.M.
7 Costa³, J.W. Pinheiro Junior¹, R.A. Mota¹

8 ¹ Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina
9 Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco,
10 Brasil, 52171-900.

11 ² Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Instituto de Pesquisa em Ciência
12 dos Materiais, Juazeiro, Bahia, Brasil, 48902-300.

13 ³ Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Rodov. BR
14 407 Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho s/n, Petrolina, PE, Brasil,
15 56300-990.

16
17 ***Autor para correspondência:**

18 Atzel Candido Acosta Abad

19 Fax: + (55)81-33206425

20 Telefone: + (55)81-997792119

21 E-mail: acabad80@gmail.com

22

23

RESUMO

24 Objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia de nanopartículas de polipirrol (PPy) em
25 água frente a *S. aureus* produtores ou não de biofilme isolados de leite mastítico de vacas e
26 cabras. Foram utilizados 138 isolados de *S. aureus* que foram inicialmente avaliados quanto
27 à formação de biofilme por espectrofotometria em microplacas. Posteriormente foi
28 determinada a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima bactericida
29 (MBC) de nanopartículas de PPy em água na forma planctônica de *S. aureus*. Das amostras
30 analisadas, 5 (3,62%) isolados de *S. aureus* de vacas com mastite mostraram uma forte
31 produção de biofilme, 17 (15,18%) moderada produção, 36 (32,14%) fraca produção e 54
32 (48,21%) não produziram biofilmes. Dos 26 isolados obtidos de cabras, 18 (69.23%) não
33 produziram biofilme e 8 (30.76%) apresentaram fraca produção. A MIC e a MBC do PPy
34 frente a *S. aureus* foi encontrada na mesma concentração (125µg/mL) para todos os isolados
35 avaliados, independente da produção de biofilme. Este resultado fornece uma nova visão da
36 interação entre nanopartículas de PPy e *S. aureus* e oferece um potencial benefício no
37 controle da mastite.

38

39 **Palavra-chave:** biofilme, polipirrol, mastites, *S. aureus*

40

41 **ABSTRACT**

42 The aim of the present study was to evaluate the antibacterial efficacy of nanoparticles of
43 polypyrrole (PPy) in water against biofilm producer or not *S. aureus* isolated from cows and
44 goats with mastitis. One hundred and thirty-eight isolates of *S. aureus* were initially
45 evaluated for biofilm formation by spectrophotometry in microplates. In addition, the
46 minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)
47 of nanoparticles of PPy in water for planktonic *S. aureus* were determined. From the bovine
48 analyzed samples, 5 (3.62%) *S. aureus* isolates showed a strong biofilm production, 17
49 (15.18%) moderate production, 36 (32.14%) with weak production and 54 (48.21%) did not
50 produce biofilms. Strains from goats (26) showed no biofilm producer in 18 (69.23%) strains
51 and weak biofilm producer in 8 (30.76%) strains. The MIC and MBC of *S. aureus* to PPy
52 were found in same concentration (125µg/mL) in all strains tested, independent of biofilm
53 production or not. This finding provide a new insight into the interaction between
54 nanoparticles of PPy and *S. aureus*, and offer potential benefits for the control of mastitis.

55

56 **Keywords:** biofilm, polypyrrole, mastitis, *S. aureus*

57

INTRODUÇÃO

58

59 Os avanços na genética animal, manejo, alimentação e o desenvolvimento de novos
60 desinfetantes e antimicrobianos permitiu um desenvolvimento constante da indústria leiteira,
61 não somente com o incremento da produção do leite, mas também uma melhora significativa
62 da qualidade higiênico sanitária deste alimento. Porém, as infecções intramárias (IMI) em
63 ruminantes é a principal causa de perdas na indústria leiteira no mundo (Halasa *et al.*, 2007).
64 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é reconhecido mundialmente como um importante
65 produtor de IMI (Coelho *et al.*, 2011).

66 *S. aureus* apresenta vários fatores de virulência que facilitam a colonização, adesão, invasão
67 dos tecidos, toxicidade e evasão do sistema imune do hospedeiro. Um destes fatores de
68 virulência é a capacidade de formar biofilmes, que são comunidades estruturadas de células
69 bacterianas encapsuladas em uma matriz de polímeros autoproduzidos e aderidos a uma
70 superfície viva ou inerte (Costerton *et al.*, 1999). Esta estrutura é um dos mais importantes
71 mecanismos de sobrevivência das bactérias no nicho extracelular, conferindo proteção frente
72 ao sistema imune do hospedeiro e ação de agentes antimicrobianos (Melchior *et al.*, 2006).

73 A busca por novos compostos que possam ser utilizados no controle de agentes causadores
74 de mastites constitui tema de interesse de diferentes grupos de pesquisas. Neste sentido, o
75 polipirrol (PPy) é um dos polímeros mais estudados como fotocatalisador (De Oliveira e De
76 Oliveira, 2013), biosensor (Xue *et al.*, 2014), supercapacitores electroquímicos (De Oliveira
77 e De Oliveira, 2014) e como agente bactericida, sendo descrita a atividade antibacteriana
78 frente a *Escherichia coli* (ATCC 8739) (Varesano *et al.*, 2013); *E. coli* (ATCC 25992),
79 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1388) e *S. aureus* (ATCC 25923) (Da Silva *et al.*, 2016). A
80 polimerização do pirrol produz cargas positivas ao longo da cadeia de PPy, sendo que uma
81 carga positiva é formada a partir da união de três a cinco monômeros. As cargas positivas

82 são responsáveis pela atividade bactericida e esse efeito se deve à ruptura da membrana
83 lipídica que recobre a bactéria com a consequente lise celular por estas cadeias de polímeros
84 (Varesano *et al.*, 2013). Até o presente momento não foi descrito nenhum mecanismo de
85 resistência microbiana frente esta interação eletrostática entre o PPy e a bactéria.

86 Objetivou-se neste estudo avaliar a eficácia de nanopartículas de PPy em água frente a *S.*
87 *aureus* produtores ou não de biofilme isolados de leite de vacas e cabras com mastites.

88 MATERIAL E MÉTODOS

89 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal
90 Rural de Pernambuco (UFRPE) com licença número 079/2014.

91 Para a coleta de amostras de leite seguiram-se as recomendações do Concelho Nacional da
92 Mastites (National Mastitis Council, 1999). As amostras foram coletadas das três regiões
93 geográficas do estado de Pernambuco (Zona da Mata, Agreste e Sertão) e por glândula
94 mamária de forma individual após a desinfecção do óstio do teto com etanol a 70%. Foram
95 coletadas 1000 amostras de leite de vacas e 1253 de cabras. O diagnóstico da mastite
96 subclínica nas vacas foi realizado usando o *California Mastitis Test* (CMT) (Schalm e
97 Noorlander, 1957); nas cabras, a mastite subclínica foi definida como a presença de três ou
98 mais colônias com características similares na lactocultura (Pantoja *et al.*, 2009).

99 As amostras foram transportadas ao Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos,
100 Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco
101 (UFRPE) em caixas isotérmicas (4–10°C). A lactocultura primária foi realizada em placas
102 de ágar sangue a 5% e incubadas a 37°C realizando leituras às 24, 48 e 72 horas. Quando
103 foram encontradas três ou mais colônias diferentes na lactocultura as amostras foram
104 consideradas contaminadas (Pantoja *et al.*, 2009; Hiitiö *et al.*, 2015).

105 Na identificação presuntiva do *S. aureus* usou-se a metodologia descrita por (Zecconi *et al.*,
106 2006) e o diagnóstico confirmatório foi realizado mediante a reação em cadeia da polimerase
107 (PCR) com a amplificação de um fragmento de 296 nucleotídeos (nt 862768-863064,
108 HF937103.1) do gene *nuc* (Brakstad *et al.*, 1992). Os isolados a serem confirmados na PCR
109 foram cultivados em caldo cérebro coração (Merck), incubadas por 12 horas a 37°C. A
110 extração do ADN foi realizada a partir das culturas bacterianas utilizando-se o kit comercial
111 *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.
112 Os oligonucleotídeos empregados (nuc_F GGTTCTGAAGATCCAACAGTAT e nuc_R
113 GCTAAGCCACGTCCATATTTA) foram desenhados para este estudo. A reação de PCR
114 foi realizada num volume total de 25µL em tubos de 0,2mL, contendo na mistura PCR buffer
115 (10mM Tris-HCl, pH 9.0; 50mM KCl e 0.1% Triton X-100), 3mM MgCl₂, 250µM de cada
116 nucleotídeo, 0,5µM de cada um dos oligonucleotídeos, 1,5U de Taq ADN Polimerase
117 (PROMEGA), 20ng de ADN e completou-se o volume final com água destilada. Usaram-se
118 as cepas *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228 como controles positivo e
119 negativo, respectivamente.

120 As condições de amplificação consistiram em: 5min a 94°C na etapa de desnaturação,
121 32 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 61°C, 1min a 72°C, e uma extensão final a 72°C durante
122 5min. Para a visualização, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel
123 de agarose a 2%, tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) (0,5X) com corante Blue Green
124 Loading Dye I (LGC Biotecnologia) e foto documentando-se sob iluminação ultravioleta
125 (Molecular Imaging L.PIX Loccus biotecnologia).

126 A caracterização fenotípica para formação de biofilme foi realizada por meio do teste de
127 aderência em microplacas de 96 poços, usando a metodologia descrita por Merino *et al.*
128 (2009) com algumas modificações. Os isolados de *S. aureus* assim como os controles

129 positivos e negativos (*S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228) foram
130 cultivados em 3mL de caldo Tryptone Soya (Tryptone Soya Broth (TSB) SIGMA-
131 ALDRICH) com glicose a 1%, incubadas a 37°C por 24 horas. Após isso, foram distribuídos
132 em cada poço da micropalca de 96 poços um volume de 200µL sendo incubadas por 24h a
133 37°C; todas as amostras foram processadas em triplicata. O meio de cultura foi descartado e
134 realizou-se três lavagens com 200µL de água destilada. Procedeu-se a coloração com 100µl
135 de cristal violeta a 0,25% por 2 a 3min. em temperatura ambiente; após esse tempo foi
136 descartada a solução colorante e três lavagens com água destilada foram realizadas e deixou-
137 se secar a temperatura ambiente. Subsequentemente foi adicionado em cada poço 200µl de
138 álcool-acetona (80:20) e realizaram-se leituras de densidade ópticas (DO) a 620nm no leitor
139 de micropalcas de Elisa (Multiskan Go Thermo Scientific). As amostras foram classificadas
140 em quatro categorias (Stepanović *et al.*, 2000), relacionando as médias de DO com a DO do
141 controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228), sendo utilizados os seguintes critérios: sem
142 produção de biofilme (DO amostra \leq DO controle negativo), fraca produção de biofilme
143 (DO controle negativo $<$ DO amostra \leq 2 DO controle negativo), moderada produção de
144 biofilme (2 DO controle negativo $<$ DO amostra \leq 4 DO controle negativo) e forte produção
145 de biofilme (DO amostra $>$ 4 DO controle negativo).

146 A concentração mínima inibitória (do inglês *minimum inhibition concentration*, MIC) e a
147 concentração mínima bactericida (do inglês *minimum bactericidal concentration*, MBC) de
148 nanopartículas de PPy em água foi determinada por meio da metodologia de microdiluição
149 em caldo seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI,
150 2015).

151 Para a preparação do inóculo, os isolados de *S. aureus* foram cultivados em placas em meio
152 sólido não seletivo (Mueller Hinton Agar SIGMA-ALDRICH) sendo incubados a 37°C por

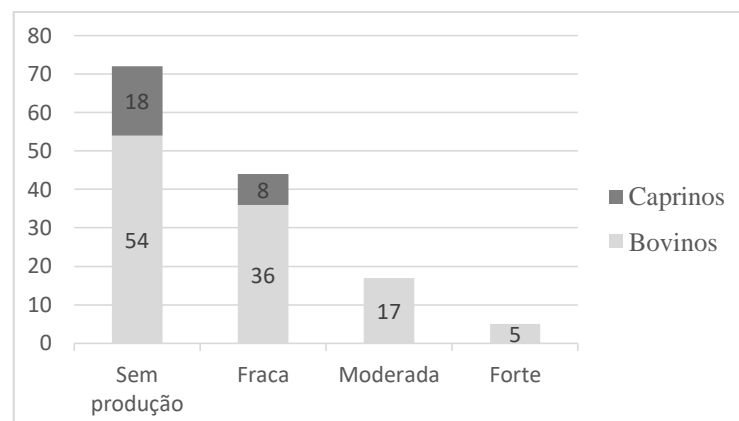
153 24h. As colônias isoladas foram suspensas em solução salina a 0,9% até alcançar uma
154 turbidez equivalente ao padrão 0,5 McFarland; esta suspensão contém aproximadamente 1
155 $\times 10^8$ UFC/mL (equivalente a uma densidade óptica de 0,8 – 0,13 a 625 nm). Posteriormente,
156 a suspensão bacteriana foi inoculada em caldo Mueller Hinton (Mueller Hinton Broth
157 (MGB) SIGMA-ALDRICH) sendo a concentração final das bactérias de aproximadamente
158 5×10^5 UFC/mL. As amostras foram processadas em triplicata, sendo distribuído em cada
159 poço da micropalaca de 96 poços um volume de 100 μ L. Foram usados como controles as
160 cepas *S. aureus* ATCC 25938 e *S. epidermidis* ATCC 12228.

161 As nanopartículas de PPy em água (Kang *et al.*, 2005), com uma concentração inicial de
162 2mg/mL foi diluído 1:2 com MGB já inoculado com o isolado a ser testado. As
163 concentrações de PPy testadas foram 500 μ g, 250 μ g, 125 μ g, 62,5 μ g, 31,25 μ g e 15,63 μ g. As
164 microdiluições em placas foram incubadas a 35°C por 20h, sendo realizadas leituras de DO
165 a 600nm no leitor de micropalacas de Elisa (Multiskan Go Thermo Scientific) em dois
166 momentos (0h e 20h). A MIC foi definida como a menor concentração da solução a base de
167 nanopartículas de PPy em água que inibiu mais do que 75% do crescimento bacteriano e a
168 MBC como a mínima concentração que resultou na morte de 99% das células bacterianas
169 determinada a partir do método de repique em placa.

170 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

171 Um total de 138 isolados de *S. aureus* foram identificados a partir da classificação fenotípica
172 e amplificação do fragmento de 296pb do gene *nuc*, sendo esta metodologia amplamente
173 utilizada e aceita para o diagnóstico de *S. aureus* (Brakstad *et al.*, 1992; Rall *et al.*, 2014).
174 Do total de isolados recuperados, 112 (81,16%) foram de amostras de leite de vacas e 26
175 (18,84%) de leite de cabras.

176 A produção de biofilme em isolados obtidos de cabras foi negativa em 18 (69,23%) isolados
177 e fraca em oito isolados (30,77%). Por outro lado, nos *S. aureus* obtidos de leite de vacas,
178 54 (48,21%) não produziram biofilme, 36 (32,14%) apresentaram fraca produção de
179 biofilme, 17 (15,18%) demonstraram moderada produção e 5 (4,46%) demonstraram forte
180 produção de biofilme (**Fig. 1**). As diferenças na intensidade de produção de biofilme entre
181 os isolados obtidos de ambas espécies pode estar associada a uma maior intensidade da
182 seleção bacteriana pela maior utilização de agentes antimicrobianos e desinfetantes nas
183 criações de bovinos na região estudada.



184

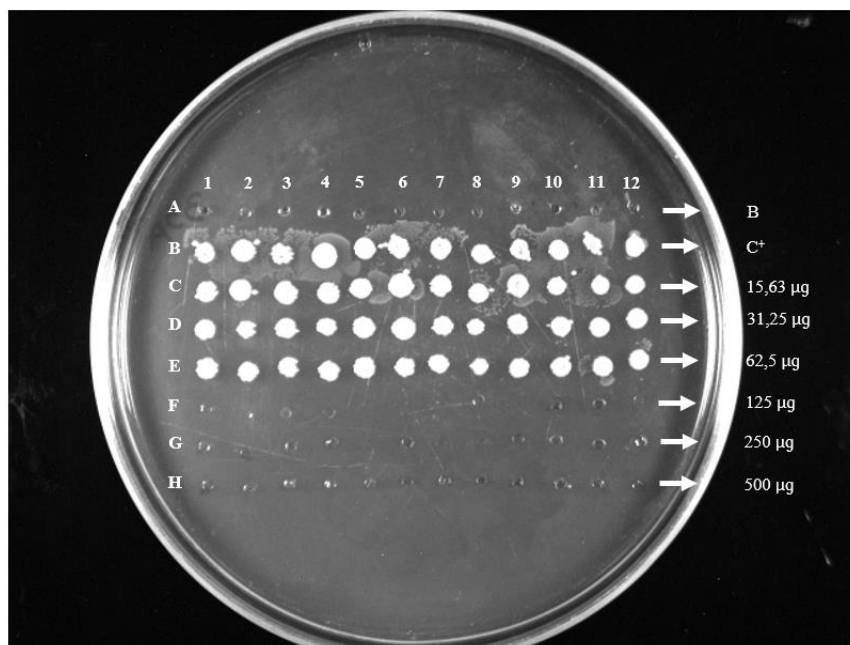
185 **Figura 1:** Frequência absoluta das intensidades de produção de biofilme de *S. aureus*
186 isolados de vacas e cabras com mastite.

187 Quando foi avaliada uma coleção internacional de isolados causadores de mastites não
188 relacionados entre si observou-se um pequeno número de isolados não produtores de
189 biofilmes (11%), estando os maiores números de isolados agrupados entre fraca (51%) e
190 moderada (29%) produção de biofilme (Bardiau *et al.*, 2016). Em nosso estudo o maior
191 número de isolados agruparam-se na categoria de não produtor de biofilme (52,17%). Este
192 achado sugere que a pressão de seleção microbiana exercida por antimicrobianos ainda é
193 inferior nos isolados incluídos neste estudo quando comparados com os isolados de *S. aureus*

194 causadores de mastites dos países incluídos na coleção internacional (Bélgica, Canada, Itália
195 e Suíça). Outro estudo realizado no Brasil também identificou um maior número de isolados
196 de *S. aureus* agrupados na categoria de não produtor de biofilme (Lee *et al.*, 2014).

197 A MIC do PPy foi de 125µg/mL para 100% dos isolados avaliados, sendo o resultado de um
198 efeito bactericida a partir desta concentração que foi constatado nos testes para determinar a
199 MBC (**Fig. 2**). A atividade bactericida do PPy foi descrita anteriormente para cepas de
200 referência de bactérias Gram negativas e Gram positivas (Da Silva *et al.*, 2016), não tendo
201 referência da utilização de nanopartículas de PPy em bactérias isoladas de mastite em
202 ruminantes. A contribuição do presente estudo está na determinação da menor concentração
203 na qual este polímero é eficaz como agente bactericida frente a isolados de *S. aureus* obtidos
204 de vacas e cabras com mastite com diferentes perfis de virulência quanto à produção de
205 biofilme. Este achado vislumbra um novo caminho na prevenção e terapêutica das mastites
206 causadas por *S. aureus* que é capaz de expressar uma ampla gama de fatores de virulência
207 que permitem a evasão do sistema imune do hospedeiro e ação de diferentes antibióticos.

208 Também já foram realizados estudos referentes à biocompatibilidade do PPy em sistemas *in*
209 *vitro* e *in vivo* e os resultados obtidos sugerem que compostos a base de PPy não oferecem
210 risco para os tecidos vivos (Wang *et al.*, 2004). Além disto, as interações eletrostáticas
211 estabelecidas entre o PPy e a bactéria desencadeiam a desestabilização da parede celular com
212 posterior lise bacteriana e até este momento não foram descritos mecanismos de resistência
213 pela bactéria, o que constitui um importante fator para incentivar futuras pesquisas com este
214 polímero.



215

216 **Figura 2:** Concentração mínima bactericida do PPy em água. B (caldo Mueller Hinton), C⁺
 217 controle positivo de crescimento, concentrações de PPy testadas 500 - 15,63µg.

218

CONCLUSÃO

219 As nanopartículas de PPy em água apresentaram efeito bactericida na concentração de
 220 125µg/mL em 100% dos isolados de *Staphylococcus aureus* avaliados. Estes resultados
 221 permitirão estudos futuros da atividade de nanopartículas de PPy *in vitro* e *in vivo* até
 222 alcançar um produto que contribua com o controle da mastite em ruminantes.

223

AGRADECIMENTOS

224 Gostaríamos de agradecer pelo suporte financeiro a Fundação de Amparo a Ciência e
 225 Tecnologia de Pernambuco (**FACEPE**) com o número de processo IBPG-0439-5.05/12 e ao
 226 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) com o número
 227 de processo 442746/2014-8 pelo financiamento deste projeto.

REFERÊNCIAS

228

229 BARDIAU, M.; CAPLIN, J.; DETILLEUX, J. *et al.* Existence of two groups of
230 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation,
231 intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Vet. Microbiol.*, v. 185, p. 1-6 2016.

232 BRAKSTAD, O.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus*
233 by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 7,
234 p. 1654-1660 1992.

235 CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow
236 aerobically; approved standard-tenth edition. . CLSI document M07-A10: U S A: Clinical
237 and Laboratory Standards Institute. 35 2015.

238 COELHO, S. M. O.; PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C. *et al.* Short communication: Profile
239 of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in
240 the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.*, v. 94, n. 7, p. 3305-3310 2011.

241 COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common
242 cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322 1999.

243 DA SILVA, F. A., JR.; QUEIROZ, J. C.; MACEDO, E. R. *et al.* Antibacterial behavior of
244 polypyrrole: The influence of morphology and additives incorporation. *Mater. Sci. Eng. C*
245 *Mater. Biol. Appl.*, v. 62, p. 317-22 2016.

246 DE OLIVEIRA, A. H.; DE OLIVEIRA, H. P. Optimization of photocatalytic activity of
247 PPy/TiO₂ nanocomposites. *Polym. Bull.*, v. 70, n. 2, p. 579-591 2013.

248 DE OLIVEIRA, A. H. P.; DE OLIVEIRA, H. P. Carbon nanotube/polypyrrole nanofibers
249 core-shell composites decorated with titanium dioxide nanoparticles for supercapacitor
250 electrodes. *J. Power Sources*, v. 268, p. 45-49 2014.

251 HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O. *et al.* Economic effects of bovine mastitis and
252 mastitis management: A review. *Vet. Quart.*, v. 29, n. 1, p. 18-31 2007.

253 HIITIÖ, H.; RIVA, R.; AUTIO, T. *et al.* Performance of a real-time PCR assay in routine
254 bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *J. Dairy Res.*, v.
255 82, n. 02, p. 200-208 2015.

256 KANG, T. S.; LEE, S. W.; JOO, J. *et al.* Electrically conducting polypyrrole fibers spun by
257 electrospinning. *Synthetic Met.*, v. 153, n. 1, p. 61-64 2005.

258 LEE, S. H. I.; MANGOLIN, B. L. C.; GONÇALVES, J. L. *et al.* Biofilm-producing ability
259 of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 3, p.
260 1812-1816 2014.

261 MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in
262 recurrent mastitis infections? *The Vet. J.*, v. 171, n. 3, p. 398-407 2006.

263 MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M. *et al.* Protein A-
264 mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v. 191, n. 3, p. 832-
265 843 2009.

266 NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Laboratory and field handbook on bovine mastitis.
267 National Mastitis Council Inc., Madison, WI. 1999.

268 PANTOJA, J. C. F.; HULLAND, C.; RUEGG, P. Somatic cell count status across the dry
269 period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J.*
270 *Dairy Sci.*, v. 92, n. 1, p. 139-148 2009.

271 RALL, V. L. M.; MIRANDA, E. S.; CASTILHO, I. G. *et al.* Diversity of *Staphylococcus*
272 species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows
273 with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 2, p. 829-837 2014.

274 SCHALM, O.; NOORLANDER, D. Experiments and observations leading to development
275 of the California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 130, n. 5, p. 199 1957.

276 STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I. *et al.* A modified microtiter-plate test for
277 quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.*, v. 40, n. 2, p. 175-
278 179 2000.

279 VARESANO, A.; VINEIS, C.; ALUIGI, A. *et al.* Antibacterial efficacy of polypyrrole in
280 textile applications. *Fibers and Polymers*, v. 14, n. 1, p. 36-42 2013.

281 WANG, X.; GU, X.; YUAN, C. *et al.* Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro
282 and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.-Part. A*, v. 68, n. 3, p. 411-422 2004.

283 XUE, K.; ZHOU, S.; SHI, H. *et al.* A novel amperometric glucose biosensor based on ternary
284 gold nanoparticles/polypyrrole/reduced graphene oxide nanocomposite. *Sensors Actuat. B-*
285 *Chem.*, v. 203, p. 412-416 2014.

286 ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E. *et al.* Role of several *Staphylococcus aureus*
287 virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb.*
288 *Pathogenesis*, v. 40, n. 4, p. 177-183 2006.

289

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo não encontraram relação entre a presença de fatores de virulência ou combinações destes com a manifestação clínica ou subclínica de mastites causada por *Staphylococcus aureus*. Com base nos resultados moleculares observa-se que os isolados de *S. aureus* obtidos de cabra são potencialmente mais enterotóxicos do que os isolados de vacas.

O genótipo *cap5* é predominante em isolados obtidos de ambas espécies, especialmente nos isolados de vacas na região semi-árida. O genótipo *cap8* apresenta um maior potencial de virulência quando comparado com o genótipo *cap5* levando em consideração o número de genes de fatores de virulência por estirpe.

Estes resultados indicam que existem mudanças na distribuição dos genes dos fatores de virulência em relação às variantes alélicas dos genes *clfA* e *clfB*. Também observa-se que as nanopartículas de PPy em água apresentam efeito bactericida para 100% dos isolados de *Staphylococcus aureus* independente da capacidade de formação de biofilme ou presença de combinações específicas de fatores de virulência.

Futuros estudos abordando a atividade de nanopartículas de PPy *in vitro* e *in vivo* são necessários para alcançar um produto que contribua para o controle da mastite em ruminantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.;LARSEN, H.;ERIKSEN, N.;ELSBURG, C.;JENSEN, N. (1999) Frequency of α -and β -haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. Acta Path Micro Im, 107(1-6):425-430.

ADHIKARI, R. P.;AJAO, A. O.;AMAN, M. J.;KARAUZUM, H.;SARWAR, J.;LYDECKER, A. D.;JOHNSON, J. K.;NGUYEN, C.;CHEN, W. H.;ROGHMANN, M.-C. (2012) Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *Staphylococcus aureus* infections. J Infect Dis, 206(6):915-923.

AKINEDEN, Ö.;ANNEMÜLLER, C.;HASSAN, A.;LÄMMLER, C.;WOLTER, W.;ZSCHÖCK, M. (2001) Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin Diagn Lab Immun., 8(5):959-964.

AL-DABBAGH, M.; DOBSON, S. (2011) Infectious Hazards from Pets and Domestic Animals. In: CURTIS, N.;FINN, A. ;POLLARD, A. J. (Ed.). Hot Topics in Infection and Immunity in Children VII. New York, NY: Springer New York, 261-272 p.

ALTBOUM, Z.; HERTMAN, I.; SARID, S. (1985) Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 47(2):514.

ARBEIT, R. D.; KARAKAWA, W. W.; VANN, W. F.; ROBBINS, J. B. (1984) Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Micr Infec Dis, 2(2):85-91.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. International Int J Food Microbiol, 61(1):1-10.

BANDEIRA, F. S.;PICOLI, T.;ZANI, J. L.;DA SILVA, W. P.;FISCHER, G. (2013) Frequency of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases, in southern Rio Grande do Sul, Brazil. Arq Inst Biol, 80(1):01-06.

BARDIAU, M.;CAPLIN, J.;DETILLEUX, J.;GRABER, H.;MORONI, P.;TAMINIAU, B.;MAINIL, J. G. (2016) Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and *agr*-typing. Vet Microbiol, 185:1-6.

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(6):1877-1895.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. (1989) Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*, 171(9):4799-4806.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, R. M. (1965) Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J Bacteriol*, 90(5):1481-1485.

BERNHEIMER, A. W.; AVIGAD, L. S.; KIM, K. S. (1974) Staphylococcal sphingomyelinase (β -hemolysin). *Ann NY Acad Sci*, 236(1):292-306.

BERUBE, B. J.; WARDENBURG, J. B. (2013) *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*, 5(6):1140-1166.

BETLEY, M.; MEKALANOS, J. (1988) Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*, 170(1):34-41.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. (1985) Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, 229(4709):185-187.

BIANCHINI, S.; DA SILVA, L. B. G.; SILVA, A. P.; LIMA, J. C. O.; FALCÃO, D. P. (2010) Frequency and etiology of goat mastitis on the region of Cariri paraibano. *Med Vet*, 4(1):1-5.

BOULAABA, A.; GRABOWSKI, N.; KLEIN, G. (2011) Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Ruminant Res*, 97(1):117-123.

BRAMLEY, A. J.; DODD, F. H. (1984) Reviews of the progress of dairy science: mastitis control—progress and prospects. *J Dairy Res*, 51(3):481-512.

BUENO, V. F. F.; DE MESQUITA, A. J.; DE CARVALHO DIAS FILHO, F. (2006) *Prototheca zopfii*: Importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. *Ciênc Anim Bras*, 7(3):273-283.

CABRAL, K.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M.; LANGONI, H.; DE SÁ, M. E. P.; VICTÓRIA, C.; V DA SILVA, A. (2004) Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can J Microbiol*, 50(11):901-909.

CARFORA, V.;CAPRIOLI, A.;MARRI, N.;SAGRAFOLI, D.;BOSELLI, C.;GIACINTI, G.;GIANGOLINI, G.;SORBARA, L.;DOTTARELLI, S.;BATTISTI, A.;AMATISTE, S. (2015) Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int Dairy J*, 42:12-15.

CASSIDY, P.; HARSHMAN, S. (1976) Studies on the binding of staphylococcal ¹²⁵I-labeled α -toxin to rabbit erythrocytes. *Biochemistry*, 15(11):2348-2355.

CASSIDY, P. S.; HARSHMAN, S. (1973) The binding of staphylococcal ¹²⁵I- α -toxin (b) to erythrocytes. *J Biol Chem*, 248(15):5545-5546.

CASTELANI, L.;SANTOS, A. F. S.;DOS SANTOS MIRANDA, M.;ZAFALON, L. F.;POZZI, C. R.;ARCARO, J. R. P. (2013) Molecular typing of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows. *Int J Mol sci*, 14(2):4326-4333.

CHAHOTA, R.; KATOCH, R.; MAHAJAN, A.; VERMA, S. (2001) Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. *Vet Arhiv*, 71(4):197-201.

CHAVAKIS, T.; PREISSNER, K. T.; HERRMANN, M. (2007) The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol*, 28(9):408-418.

CHOI, Y.-W.;KOTZIN, B.;HERRON, L.;CALLAHAN, J.;MARRACK, P.;KAPPLER, J. (1989) Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin" superantigens" with human T cells. *P Natl Acad Sci USA*, 86(22):8941-8945.

CHOI, Y.;HERMAN, A.;DIGIUSTO, D.;WADE, T.;MARRACK, P.;KAPPLER, J. (1990) Residues of the variable region of the T-cell-receptor β -chain that interact with *S. aureus* toxin superantigens. *Nature*, 346:471-473.

CHUA, K. Y. L.;MONK, I. R.;LIN, Y. H.;SEEMANN, T.;TUCK, K. L.;PORTER, J. L.;STEPNELL, J.;COOMBS, G. W.;DAVIES, J. K.;STINEAR, T. P. (2014) Hyperexpression of alpha-hemolysin explains enhanced virulence of sequence type 93 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*, 14(1):31-44.

CIFRIAN, E.;GUIDRY, A. J.;BRAMLEY, A. J.;NORCROSS, N. L.;BASTIDA-CORCUERA, F. D.;MARQUARDT, W. W. (1996) Effect of staphylococcal β toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol*, 48(3):187-198.

CLARKE, S. R.; FOSTER, S. J. (2006) Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. In: ROBERT, K. P. (Ed.). *Advances in Microbial Physiology*: Academic Press, v.51, 187-224 p.

COCCHIARO, J. L.; GOMEZ, M. I.; RISLEY, A.; SOLINGA, R.; SORDELLI, D. O.; LEE, J. C. (2006) Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 59(3):948-960.

COONEY, J.; MULVEY, M.; ARBUTHNOTT, J. P.; FOSTER, T. J. (1988) Molecular cloning and genetic analysis of the determinant for gamma-lysin, a two-component toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 134(8):2179-2188.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M. M.; FERREIRO, L. (2001) Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. *Trop Anim Health Pro*, 33(6):463-470.

COSTA, G. M.; DA SILVA, N.; ROSA, C. A.; DE FIGUEIREDO, H. C. P.; DE PÁDUA-PEREIRA, U. (2008) Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Ciênc Rural*, 38(7):1938-1942.

COSTA, G. M.; PEREIRA, U. P.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; DA SILVA, N. (2012) Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 49(3):239-243.

COSTERTON, J. (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol*, 15(3):137-140.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418):1318-1322.

COUCH, J. L.; BETLEY, M. J. (1989) Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. *J Bacteriol*, 171(8):4507-4510.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. (1988) Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*, 170(7):2954-2960.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N.; RIBEIRO, M. G.; TORRES, J. A. (2006) Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, 7(2):139-151.

COUTINHO, L. C. A.;MEDEIROS, E. S.;SILVEIRA, N. S. S.;SILVA, L. B. G.;MOTA, R. A. (2012) Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. *Pesqui Vet Bras*, 32(1):61-65.

CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. (2011) Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci Technol*, 91(2):127-150.

CUCARELLA, C.;TORMO, M. Á.;UBEDA, C.;TROTONDA, M. P.;MONZÓN, M.;PERIS, C.;AMORENA, B.;LASA, Í.;PENADÉS, J. R. (2004) Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 72(4):2177-2185.

DASSY, B.; STRINGFELLOW, W.; LIEB, M.; FOURNIER, J. (1991) Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. *J Gen Microbiol*, 137(5):1155-1162.

DE, K.; MUKHERJEE, J.; PRASAD, S.; DANG, A. (2011) Effect of different physiological stages and managemental practices on milk somatic cell counts of Murrah Buffaloes. *Buffalo Bull*, 30(1):72-99.

DE OLIVEIRA, A. H.; DE OLIVEIRA, H. P. (2013) Optimization of photocatalytic activity of PPy/TiO₂ nanocomposites. *Polym Bull*, 70(2):579-591.

DE OLIVEIRA, A. H. P.; DE OLIVEIRA, H. P. (2014) Carbon nanotube/polypyrrole nanofibers core-shell composites decorated with titanium dioxide nanoparticles for supercapacitor electrodes. *J Power Sources*, 268:45-49.

DE VliegHER, S.;FOX, L. K.;PIEPERS, S.;MCDougALL, S.;BARKEMA, H. W. (2012) Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci*, 95(3):1025-1040.

DEB, R.;KUMAR, A.;CHAKRABORTY, S.;VERMA, A. K.;TIWARI, R.;DHAMA, K.;SINGH, U.;KUMAR, S. (2013) Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pak J Biol Sci*, 16(23):1653-1661.

DELEO, F. R.;KENNEDY, A. D.;CHEN, L.;WARDENBURG, J. B.;KOBAYASHI, S. D.;MATHEMA, B.;BRAUGHTON, K. R.;WHITNEY, A. R.;VILLARUZ, A. E.;MARTENS, C. A. (2011) Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. *P Natl Acad Sci USA*, 108(44):18091-18096.

DIAS, N.;SILVA, D.;OLIVEIRA, D.;FONSECA JUNIOR, A.;SALES, M.;SILVA, N. (2011) Detection of genes of *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in milk. Arq Bra Med Vet Zootec, 63(6):1547-1552.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev, 13(1):16-34.

DJABRI, B.; BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H. (2002) Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. Vet Res, 33(4):335-357.

DOMINGUES, P. F.;LUCHEIS, S. B.;SERRÃO, L. S.;FERNANDES, S.;CONTENTE, A. P. A.;MARTINS, E. C. V.;LANGONI, H. (2006) Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. Ars Vet, 22(2):146-152.

DUNNE, W. M. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev, 15(2):155-166.

FAIRWEATHER, N.;KENNEDY, S.;FOSTER, T.;KEHOE, M.;DOUGAN, G. (1983) Expression of a cloned *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 41(3):1112-1117.

FEBLER, A. T.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. (2010) Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. J Antimicrob Chemoth, 65(8):1576-1582.

FIELDS, B. A.;MALCHIODI, E. L.;LI, H.;YSERN, X.;STAUFFACHER, C. V.;SCHLIEVERT, P. M.;KARJALAINEN, K.;MARIUZZA, R. A. (1996) Crystal structure of a T-cell receptor β -chain complexed with a superantigen. Nature, 384(14):118-192.

FINK, P. J.;MATIS, L. A.;MCELLIGOTT, D. L.;BOOKMAN, M.;HEDRICK, S. M. (1986) Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor. Nature, 321(6067):219-226.

FITZGERALD, J. R.;MONDAY, S. R.;FOSTER, T. J.;BOHACH, G. A.;HARTIGAN, P. J.;MEANEY, W. J.;SMYTH, C. J. (2001) Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J Bacteriol, 183(1):63-70.

FLUIT, A. (2012) Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infec, 18(8):735-744.

FONTANA, V. L. D. S.;GIANNINI, M. J. S. M.;LETFE, C. Q. F.;MIRANDA, E. T.;ALMEIDA, A. M. F.;FONTANA, C. A. P.;DE SOUZA, C. M.;STELLA, A. E. (2010) Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene β -lactamasis in *Staphylococcus aureus*. *Vet Zootec*, 17(4):552-559.

FOSTER, T. J. (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*, 3(12):948-958.

FOSTER, T. J.; HÖÖK, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 6(12):484-488.

FOURNIER, J.-M.; VANN, W. F.; KARAKAWA, W. W. (1984) Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* type 8 capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 45(1):87-93.

FOX, L. K.; ZADOKS, R. N.; GASKINS, C. T. (2005) Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol*, 107(3-4):295-299.

FREER, J.; BIRKBECK, T. (1982) Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*. *J Theor Biol*, 94(3):535-540.

FREITAS, M.;PINHEIRO JÚNIOR, J.;STAMFORD, T.;RABELO, S. S. A.;SILVA, D.;SILVEIRA FILHO, V.;SANTOS, F.;SENA, M.;MOTA, R. (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(2):171-177.

FRITZ, S. A.;TIEMANN, K. M.;HOGAN, P. G.;EPPLIN, E. K.;RODRIGUEZ, M.;AL-ZUBEIDI, D. N.;WARDENBURG, J. B.;HUNSTAD, D. A. (2013) A serologic correlate of protective immunity against community-onset *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*, 56(11):1554-1561.

FRY, P. R.;MIDDLETON, J. R.;DUFOUR, S.;PERRY, J.;SCHOLL, D.;DOHOO, I. (2014) Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 97(8):4876-4885.

GAO, J.;YU, F.-Q.;LUO, L.-P.;HE, J.-Z.;HOU, R.-G.;ZHANG, H.-Q.;LI, S.-M.;SU, J.-L.;HAN, B. (2012) Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *Vet J*, 194(3):423-424.

GETANEH, A.; GIZAT, A.; MESELE, A. (2014) Incidence rate of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in subclinical mastitis at smallholder dairy cattle farms in Hawassa, Ethiopia. Afr J Microbiol Res, 8(3):252-256.

GLENNY, A. T.; STEVENS, N. F. (1935) Staphylococcal toxins and antitoxins. J Pathol Bacteriol, 40:210.

GRAY, G. S.; KEHOE, M. (1984) Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. Infect Immun, 46(2):615-618.

GUIMARÃES, F. D. F.;NÓBREGA, D. B.;RICHINI-PEREIRA, V. B.;MARSON, P. M.;DE FIGUEIREDO PANTOJA, J. C.;LANGONI, H. (2013) Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. J Dairy Sci, 96(5):2866-2872.

HAIM, M.;TROST, A.;MAIER, C.;ACHATZ, G.;FEICHTNER, S.;HINTNER, H.;BAUER, J.;ÖNDER, K. (2010) Cytokeratin 8 interacts with clumping factor B: a new possible virulence factor target. Microbiology, 156(12):3710-3721.

HAIR, P. S.;ECHAGUE, C. G.;SHOLL, A. M.;WATKINS, J. A.;GEOGHEGAN, J. A.;FOSTER, T. J.;CUNNION, K. M. (2010) Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. Infect Immun, 78(4):1717-1727.

HAIT, J.;TALLENT, S.;MELKA, D.;KEYS, C.;BENNETT, R. (2014) Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *S. aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. J Appl Microbiol, 117(3):866–875.

HANESSIAN, S.; HASKELL, T. H. (1964) Structural studies on staphylococcal polysaccharide antigen. J Biol Chem, 239(9):2758-2764.

HARRIS, T.;GROSSMAN, D.;KAPPLER, J.;MARRACK, P.;RICH, R.;BETLEY, M. (1993) Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. Infect Immun, 61(8):3175-3183.

HASMAN, H.;MOODLEY, A.;GUARDABASSI, L.;STEGGER, M.;SKOV, R.;AARESTRUP, F. M. (2010) *spa* type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. Vet Microbiol, 141(3):326-331.

HEGAZI, A.; ABDOU, A. M.; ALLAH, F. A. (2014) Antimicrobial activity of propolis on the bacterial causes of mastitis. *Life Sci J*, 11(5):572-576.

HERBERT, S.; WORLITZSCH, D.; DASSY, B.; BOUTONNIER, A.; FOURNIER, J.-M.; BELLON, G.; DALHOFF, A.; DÖRING, G. (1997) Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO₂ inhibition *in vitro* and *in vivo*. *J Infect Dis*, 176(2):431-438.

HILDEBRAND, A.; POHL, M.; BHAKDI, S. (1991) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J Biol Chem*, 266(26):17195-17200.

HOMMEZ, J.; DEVRIESE, L. A.; VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BUTAYE, P.; HAESEBROUCK, F. (1999) Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol*, 37(4):954-957.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; MYLLYS, V.; PYÖRÄLÄ, S. (1994) Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative Staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. *J Vet Med B*, 41(1-10):344-350.

HOVDE, C.; HACKETT, S.; BOHACH, G. (1990) Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol Gen Genet*, 220(2):329.

HU, C.; GONG, R.; GUO, A.; CHEN, H. (2010) Protective effect of ligand-binding domain of fibronectin-binding protein on mastitis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. *Vaccine*, 28(24):4038-4044.

HU, D.-L.; SUGA, S.; OMOE, K.; ABE, Y.; SHINAGAWA, K.; WAKUI, M.; NAKANE, A. (2005) Staphylococcal enterotoxin A modulates intracellular Ca²⁺ signal pathway in human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*, 579(20):4407-4412.

HUANG, I.; HUGHES, J.; BERGDOLL, M.; SCHANTZ, E. (1987) Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. *J Biol Chem*, 262(15):7006.

HUSEBY, M.; SHI, K.; BROWN, C. K.; DIGRE, J.; MENGISTU, F.; SEO, K. S.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M.; OHLENDORF, D. H.; EARHART, C. A. (2007) Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 189(23):8719-8726.

HUSEBY, M. J.; KRUSE, A. C.; DIGRE, J.; KOHLER, P. L.; VOCKE, J. A.; MANN, E. E.; BAYLES, K. W.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M.; OHLENDORF, D. H. (2010)

Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *P Natl Acad Sci USA*, 107(32):14407-14412.

HUSSAIN, R.; JAVED, M. T.; KHAN, A. (2012) Changes in some biochemical parameters and somatic cell counts in the milk of buffalo and cattle suffering from mastitis. *Pak Vet J*, 32:418-421.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. (2014) Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, 42:1-39.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. (2015) Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, 43:1-47.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. (2014) Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 97(4):2226-2230.

JARRAUD, S.; COZON, G.; VANDENESCH, F.; BES, M.; ETIENNE, J.; LINA, G. (1999) Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol*, 37(8):2446-2449.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. (2001) *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 166(1):669-677.

JOBIM, M. B.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M.; DEMEUI, F. A. (2010) Pathogens associated with bovine mastitis in dairy herds in the south region of Brazil. *Bol Ind Anim*, 67(2):175-181.

JOHNS, M.; KHAN, S. A. (1988) Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J Bacteriol*, 170(9):4033-4039.

JONES, C. (2005) Revised structures for the capsular polysaccharides from *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines. *Carbohydr Res*, 340(6):1097-1106.

JÖNSSON, K.; SIGNÄS, C.; MÜLLER, H. P.; LINDBERG, M. (1991) Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem*, 202(3):1041-1048.

KAPPLER, J.;WHITE, J.;KOZONO, H.;CLEMENTS, J.;MARRACK, P. (1994) Binding of a soluble alpha beta T-cell receptor to superantigen/major histocompatibility complex ligands. P Natl Acad Sci USA, 91(18):8462-8466.

KARAKAWA, W.; VANN, W. F. (1982) Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. Semin Infect Dis, 4:285–293.

KATAYAMA, Y.;BABA, T.;SEKINE, M.;FUKUDA, M.;HIRAMATSU, K. (2013) Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 195(6):1194-1203.

KATSUDA, K.;HATA, E.;KOBAYASHI, H.;KOHMOTO, M.;KAWASHIMA, K.;TSUNEMITSU, H.;EGUCHI, M. (2005) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. Vet Microbiol, 105(3-4):301-305.

KEEFE, G. (2012) Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. Veterinary Clinics of North America: Food Anim Pract, 28(2):203-216.

KEEFE, G. P. (1997) *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Can Vet J, 38(7):429-437.

KEHOE, M.;DUNCAN, J.;FOSTER, T.;FAIRWEATHER, N.;DOUGAN, G. (1983) Cloning, expression, and mapping of the *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin determinant in *Escherichia coli* K-12. Infect Immun, 41(3):1105-1111.

KOLATA, J.;BODE, L. G.;HOLTFRETER, S.;STEIL, L.;KUSCH, H.;HOLTFRETER, B.;ALBRECHT, D.;HECKER, M.;ENGELMANN, S.;VAN BELKUM, A. (2011) Distinctive patterns in the human antibody response to *Staphylococcus aureus* bacteremia in carriers and non-carriers. Proteomics, 11(19):3914-3927.

KÖNIG, W.; PREVOST, G. (1997) Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions. J Med Microbiol, 46(6):479-485.

KREWER, C. C.;DE S. LACERDA, I. P.;AMANSO, E. S.;CAVALCANTE, N. B.;DE M. PEIXOTO, R.;PINHEIRO, J. W.;DA COSTA, M. M.;MOTA, R. A. (2013) Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and pernambuco. Pesqui Vet Bras, 33(5):601-606.

KRISHNAVENI, N.; ISLOOR, S.; SURYANARAYANA, V.; RATHNAMMA, D.; VEEREGOWDA, B.; NAGARAJA, C.; SUNDARESHAN, S. (2014) Antibiogram profile of Group B Streptococci isolated from bovine mastitis cases. *Vet Clin Sci*, 2(1):10-15.

KULHANKOVA, K.; KING, J.; SALGADO-PABÓN, W. (2014) Staphylococcal toxic shock syndrome: superantigen-mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. *Immunol Res*, 59(1):182–187.

KULKARNI, A. G.; KALI WAL, B. (2013) Bovine mastitis: A review. *International J Recent Sci Res*, 4(5):543-548.

KUMAR, R.; YADAV, B.; ANAND, S.; SINGH, R. (2011) Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus*; obtained from mastitic cattle. *World J Microbiol Biotechn*, 27(3):513-521.

LAMAITA, H.; CERQUEIRA, M.; CARMO, L.; SANTOS, D.; PENNA, C.; SOUZA, M. (2005) *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arq Bra Med Vet Zootec*, 57(5):702-709.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; BALDINI, S. (2006) Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Rev Bras Cienc Vet*, 13(1):51-54.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; DA SILVA, A. V. (2011) Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesqui Vet Bras*, 31(12):1059-1065.

LANGONI, H.; TRONCARELLI, M. (2011) The complex etiology on bovine mastitis and the importance of the microbiological diagnostic. *Animal hygiene and sustainable livestock production. Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, Volume 3., Tribuna EU. 1357-1358 p.*

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

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2(1):63-76.

LEE, A.; ROBBINS, R.; BERGDOLL, M. (1978) Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins A and E by affinity chromatography. *Infect Immun*, 21(2):387-391.

LEE, J. C.; TAKEDA, S.; LIVOLSI, P.; PAOLETTI, L. (1993) Effects of *in vitro* and *in vivo* growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 61(5):1853-1858.

LEE, K.; FITTON, J.; WÜTHRICH, K. (1987) Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of δ -haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles. *BBA-Protein Struct M*, 911(2):144-153.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M.; MARIN, J. (2008) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arq Bra Med Vet Zootec*, 60(1):278-282.

MALEK DOS REIS, C. B.; BARREIRO, J.; MORENO, J.; PORCIONATO, M.; SANTOS, M. (2011) Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *J Dairy Sci*, 94(9):4406-4412.

MARR, J.; LYON, J.; ROBERSON, J.; LUPHER, M.; DAVIS, W.; BOHACH, G. (1993) Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infect Immun*, 61(10):4254-4262.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. (1990) The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 248(4956):705-711.

MAZMANIAN, S.; LIU, G.; TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. (1999) *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 285(5428):760-763.

MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M.; PINHEIRO JÚNIOR, J.; SAUKAS, T.; KREWER, C.; SANTOS, A.; COSTA, M.; MOTA, R. (2013) Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. *Arq Bra Med Vet Zootec*, 65(6):1891-1894.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. (2006) Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet J*, 171(3):398-407.

MESQUITA, A. Q. D.; MESQUITA, A. J. D.; JARDIM, E. A. G. D. V.; KIPNIS, A. P. J. (2012) Association of TLR4 polymorphisms with subclinical mastitis in Brazilian holsteins. *Bra J Microbiol*, 43(2):692-697.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. (1999) Properties of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxic shock syndrome-toxin-1. In: ALOUF, J., FREER, JH (Ed.). The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins., 589-610 p.

MOREAU, M.;RICHARDS, J. C.;FOURNIER, J.-M.;BYRD, R. A.;KARAKAWA, W. W.;VANN, W. F. (1990) Structure of the type 5 capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. Carbohyd Res, 201(2):285-297.

MORGANTE, M.;RANUCCI, S.;PAUSELLI, M.;BEGHELLI, D.;MENCARONI, G. (1996) Total and differential cell count by direct microscopic method on ewe milk. Zentralbl Vet A, 43(8):451-458.

MØRK, T.;TOLLERSRUD, T.;KVITILE, B.;JØRGENSEN, H.;WAAGE, S. (2005) Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. J Clin Microbiol, 43(8):3979-3984.

MOTA, R. A.;DE MEDEIROS, E. S.;DOS SANTOS, M. V.;PINHEIRO JÚNIOR, J. W.;MOURA, A. P. B.;COUTINHO, L. C. A. (2012) Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). Cienc Anim Bras, 13(1):124-130.

MÜLLER, E. E. (2002) Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, UEM/CCA/DZO – NUPEL, 212P. Toledo – PR, 29 e 30/08/2002:206-217.

MUNSON, S. H.; TREMAINE, M. T.; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. (1998) Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 66(7):3337-3348.

MURTHY, S. V. K. N.;ANN MELLY, M.;HARRIS, T. M.;HELLERQVIST, C. G.;HASH, J. H. (1983) The repeating sequence of the capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* M Carbohyd Res, 117:113-123.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. (2004) Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. Verona: 47 p.

NAVARRE, W.; SCHNEEWIND, O. (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. Mol Microbiol, 14(1):115-121.

NEVES, P. B.;MEDEIROS, E. S.;SÁ, V. V.;CAMBOIM, E. K.;GARINO JR, F.;MOTA, R. A.;AZEVEDO, S. S. (2010) Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesqui Vet Bras*, 30(5):379-384.

NÍ EIDHIN, D.;PERKINS, S.;FRANCOIS, P.;VAUDAUX, P.;HÖÖK, M.;FOSTER, T. J. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 30(2):245-257.

NIEMANN, S.;SPEHR, N.;VAN AKEN, H.;MORGENSTERN, E.;PETERS, G.;HERRMANN, M.;KEHREL, B. E. (2004) Soluble fibrin is the main mediator of *Staphylococcus aureus* adhesion to platelets. *Circulation*, 110(2):193-200.

NOVICK, R. P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 48(6):1429-1449.

O' BRIEN, L. M.;WALSH, E. J.;MASSEY, R. C.;PEACOCK, S. J.;FOSTER, T. J. (2002) *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cyokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol*, 4(11):759-770.

O'NEILL, E.;POZZI, C.;HOUSTON, P.;HUMPHREYS, H.;ROBINSON, D. A.;LOUGHMAN, A.;FOSTER, T. J.;O'GARA, J. P. (2008) A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol*, 190(11):3835-3850.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*, 17(1):218-234.

OLIVEIRA, M.;BEXIGA, R.;NUNES, S. F.;CARNEIRO, C.;CAVACO, L. M.;BERNARDO, F.;VILELA, C. L. (2006) Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol*, 118(1-2):133-140.

OLIVER, S. P.;GILLESPIE, B.;HEADRICK, S.;MOOREHEAD, H.;LUNN, P.;DOWLEN, H.;JOHNSON, D.;LAMAR, K.;CHESTER, S.;MOSELEY, W. (2004) Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 87(8):2393-2400.

OTE, I.;TAMINIAU, B.;DUPREZ, J.-N.;DIZIER, I.;MAINIL, J. G. (2011) Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 153(3-4):285-292.

OVIEDO-BOYSO, J.;VALDEZ-ALARCÓN, J. J.;CAJERO-JUÁREZ, M.;OCHOA-ZARZOSA, A.;LÓPEZ-MEZA, J. E.;BRAVO-PATINO, A.;BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infection*, 54(4):399-409.

PACHAURI, S.; VARSHNEY, P.; DASH, S. K.; GUPTA, M. K. (2013) Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. *Vet World*, 6(7):393-395.

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J.; HOOK, M. (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*, 48(1):585-617.

PEACOCK, S. J.;MOORE, C. E.;JUSTICE, A.;KANTZANO, M.;STORY, L.;MACKIE, K.;O'NEILL, G.;DAY, N. P. (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 70(9):4987-4996.

PEIXOTO, R. M.;FRANÇA, C. A. D.;SOUZA JÚNIOR, A. F. D.;VESCHI, J. L. A.;COSTA, M. M. D. (2010) Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesqui Vet Bras*, 30(9):735-740.

PEREIRA, P. F. V.;STOTZER, E. S.;PRETTO-GIORDANO, L. G.;MÜLLER, E. E.;LISBÔA, J. A. (2014) Risk factors, etiology and clinical aspects of mastitis in meat ewes of Parana, Brazil. *Pesqui Vet Bras*, 34(1):1-10.

PETERSSON, K.;HÅKANSSON, M.;NILSSON, H.;FORSBERG, G.;SVENSSON, L. A.;LILJAS, A.;WALSE, B. (2001) Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. *EMBO J*, 20(13):3306-3312.

PIANTA, C.; PASSOS, D. T.; HEPP, D.; OLIVEIRA, S. J. D. (2007) Isolation of *Arcobacter* spp from the milk of dairy cows in Brazil. *Cienc Rural*, 37(1):171-174.

PIZAURO, L. J. L.;SILVA, D.;SANTANA, A.;CLEMENTE, V.;LARA, G.;LISTONI, F.;VAZ, A.;VIDAL-MARTINS, A.;RIBEIRO, M.;FAGLIARI, J. (2014) Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Analândia, São Paulo State, Brazil. *Arq Bra Med Vet Zootec*, 66(6):1703-1710.

PLANCHON, S.;GAILLARD-MARTINIE, B.;DORDET-FRISONI, E.;BELLON-FONTAINE, M.;LEROY, S.;LABADIE, J.;HÉBRAUD, M.;TALON, R. (2006) Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Int J Food Microbiol*, 109(1):88-96.

PREVOST, G.;CRIBIER, B.;COUPPIE, P.;PETIAU, P.;SUPERSAC, G.;FINCK-BARBANCON, V.;MONTEIL, H.;PIEMONT, Y. (1995) Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*, 63(10):4121-4129.

PROJAN, S. J.;KORNBLUM, J.;KREISWIRTH, B.;MOGHAZEH, S. L.;EISNER, W.;NOVICK, R. P. (1989) Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*, 17(8):3305.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. (2009) Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*, 134(1):3-8.

RALL, V. L. M.;MIRANDA, E. S.;CASTILHO, I. G.;CAMARGO, C. H.;LANGONI, H.;GUIMARÃES, F. F.;ARAÚJO JÚNIOR, J. P.;FERNANDES JÚNIOR, A. (2014) Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *J Dairy Sci*, 97(2):829-837.

RALL, V.;VIEIRA, F.;RALL, R.;VIEITIS, R.;FERNANDES, A.;CANDEIAS, J.;CARDOSO, K.;ARAÚJO, J. (2008) PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol*, 132(3):408-413.

RAMÍREZ, N. F.;KEEFE, G.;DOHOO, I.;SÁNCHEZ, J.;ARROYAVE, O.;CERÓN, J.;JARAMILLO, M.;PALACIO, L. (2014) Herd-and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J Dairy Sci*, 97:4141–4150.

RECSEI, P.;KREISWIRTH, B.;O'REILLY, M.;SCHLIEVERT, P.;GRUSS, A.;NOVICK, R. P. (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol Gen Genet*, 202(1):58-61.

RELLAHAN, B. L.;JONES, L. A.;KRUISBEEK, A. M.;FRY, A.;MATIS, L. (1990) In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med*, 172(4):1091-1100.

REN, K.;BANNAN, J. D.;PANCHOLI, V.;CHEUNG, A. L.;ROBBINS, J. C.;FISCHETTI, V. A.;ZABRISKIE, J. B. (1994) Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J Exp Med*, 180(5):1675-1683.

RIBEIRO, M. G.;GERALDO, J. S.;LANGONI, H.;LARA, G. H. B.;SIQUEIRA, A. K.;SALERNO, T.;FERNANDES, M. C. (2009) Microrganismos patogênicos, celularidade

e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesqui Vet Bras*, 29(1):52-58.

RUEGG, P. L. (2009) The quest for the perfect test: Phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 134(1-2):15-19.

RUIZ, A. K.;PONCE, P.;GOMES, G.;MOTA, R.;ELIZABETH, S.;LUCENA, E.;BENONE, S. (2011) Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Rev Salud Anim*, 33(1):57-64.

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

SAAB, A. B.;ZAMPROGNA, T. O.;LUCAS, T. M.;MARTINI, K. C.;MELLO, P. L.;DA SILVA, A. V.;MARTINS, L. A. (2014) Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana. *Semin Cienc Agrar*, 35(2):835-843.

SAEKI, E. K.;DE MELLO PEIXOTO, E. C. T.;MATSUMOTO, L. S.;MARCUSO, P. F.;MONTEIRO, R. M. (2012) Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. *Acta Vet Brasilica*, 5(3):284-290.

SALASIA, S. I. O.;TATO, S.;SUGIYONO, N.;ARIYANTI, D.;PRABAWATI, F. (2011) Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia. *J Vet Sci*, 12(4):353-361.

SCHUKKEN, Y. H.;GONZÁLEZ, R. N.;TIKOFISKY, L. L.;SCHULTE, H. F.;SANTISTEBAN, C. G.;WELCOME, F. L.;BENNETT, G. J.;ZURAKOWSKI, M. J.;ZADOKS, R. N. (2009) CNS mastitis: Nothing to worry about? *Vet Microbiol*, 134(1):9-14.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. (2011) Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. *Rev Cien Ambient*, 5(2):25-42.

SHAFFER, W. M.; IANDOLO, J. J. (1978) Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun*, 20(1):273-278.

SHALITA, Z.; HERTMAN, I.; SARID, S. (1977) Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 129(1):317-325.

SHANKS, R. M.; MEEHL, M. A.; BROTHERS, K. M.; MARTINEZ, R. M.; DONEGAN, N. P.; GRABER, M. L.; CHEUNG, A. L.; O'TOOLE, G. A. (2008) Genetic evidence for an alternative citrate-dependent biofilm formation pathway in *Staphylococcus aureus* that is dependent on fibronectin binding proteins and the GraRS two-component regulatory system. Infect Immun, 76(6):2469-2477.

SHARMA, N.; SINGH, N.; BHADWAL, M. (2011) Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. Asian-Aust. J. Anim. Sci, 24(3):429-438.

SHINJI, H.; YOSIZAWA, Y.; TAJIMA, A.; IWASE, T.; SUGIMOTO, S.; SEKI, K.; MIZUNOE, Y. (2011) Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 79(6):2215-2223.

SIGNÄS, C.; RAUCCI, G.; JÖNSSON, K.; LINDGREN, P.; ANANTHARAMAIAH, G.; 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. P Natl Acad Sci USA, 86(2):699-703.

SILVA, E. R.; SIQUEIRA, A. P.; MARTINS, J. C. D.; FERREIRA, W. P. B.; DA SILVA, N. (2004) Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. Small Ruminant Res, 55(1):45-49.

SILVA, F. A., JR.; QUEIROZ, J. C.; MACEDO, E. R.; FERNANDES, A. W.; FREIRE, N. B.; DA COSTA, M. M.; DE OLIVEIRA, H. P. (2016) Antibacterial behavior of polypyrrole: The influence of morphology and additives incorporation. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 62:317-322.

SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; KUNG, E. S.; NASCIMENTO, R. B.; FERNANDES, M. F. T. S.; BEZERRA, M. J. G.; SG, S.; RIBEIRO, M. N.; MOTA, R. A. (2013) Etiology of mastitis in native goats and sheeps born and raised in Brazilian semi-arid biom. Med Vet, 7(2):26-31.

SILVA, M. C. A.; CAVALCANTE, M.; ALMEIDA, M.; BARROS, C.; COSTA, W.; SILVA, N.; ALZAMORA FILHO, F.; KÖFER, J.; SCHOBESBERGER, H. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from mastitis milk samples from goats in Brazil. Animal hygiene and sustainable livestock production. Proceedings of the XVth International Congress of the

International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, Volume 3., Tribuna EU. 1419-1422 p.

SILVA, N.; COSTA, G. M. (2001) An outbreak of acute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in a dairy herd. *Arq Bra Med Vet Zootec*, 53(4):1-5.

SILVEIRA-FILHO, V. M.; LUZ, I. S.; CAMPOS, A. P. F.; SILVA, W. M.; BARROS, M. P. S.; MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M. F. L.; MOTA, R. A.; SENA, M. J.; LEAL-BALBINO, T. C. (2014) Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk and dairy products in northeast Brazil. *J Food Protect*, 77(4):583-591.

SIQUEIRA, J.; SPEEG-SCHATZ, C.; FREITAS, F.; SAHEL, J.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. (1997) Channel-forming leucotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. *J Med Microbiol*, 46(6):486-494.

SMITH, K. L. (1983) Mastitis control: A discussion. *J Dairy Sci*, 66(8):1790-1794.

SOMPOLINSKY, D.; SAMRA, Z.; KARAKAWA, W.; VANN, W.; SCHNEERSON, R.; MALIK, Z. (1985) Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol*, 22(5):828-834.

SONG, L.; HOBAUGH, M. R.; SHUSTAK, C.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; GOUAUX, J. E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294):1859-66.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol*, 7(2):135-146.

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; MELVILLE, P. A.; Occurrence of enterotoxin-encoding, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. (2010) Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. *J Dairy Res*, 77(01):63-70.

SPANAMBERG, A.; WUNDER JR, E.; BRAYER PEREIRA, D. I.; ARGENTA, J.; CAVALLINI SANCHES, E. M.; VALENTE, P.; FERREIRO, L. (2008) Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. *Rev Iberoam Micol*, 25(3):154-156.

SPERO, L.; MORLOCK, B. A. (1979) Cross-reactions between tryptic polypeptides of staphylococcal enterotoxins B and C. *J Immunol*, 122(4):1285-1289.

SPEZIALE, P.; PIETROCOLA, G.; RINDI, S.; PROVENZANO, M.; PROVENZA, G.; DI POTO, A.; VISAI, L.; ARCIOLA, C. R. (2009) Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol*, 4(10):1337-1352.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.; COSTERTON, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 56(1):187-209.

STRAUB, J. A.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. (1999) A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J Food Protect*, 62(10):1150-1156.

STRINGFELLOW, W.; DASSY, B.; LIEB, M.; FOURNIER, J. (1991) *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *App Environ Microb*, 57(2):618-621.

SU, Y.-C.; WONG, A. (1995) Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *App Environ Microb*, 61(4):1438-1443.

SUTRA, L.; RAINARD, P.; POUTREL, B. (1990) Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J Clin Microbiol*, 28(10):2253-2258.

TAJIMA, A.; IWASE, T.; SHINJI, H.; SEKI, K.; MIZUNOE, Y. (2009) Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect Immun*, 77(1):327-334.

THAKKER, M.; PARK, J.-S.; CAREY, V.; LEE, J. C. (1998) *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun*, 66(11):5183-5189.

THORBERG, B.-M.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; EMANUELSON, U.; PERSSON WALLER, K. (2009) Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci*, 92(10):4962-4970.

THORBERG, B.-M.; KÜHN, I.; AARESTRUP, F. M.; BRÄNDSTRÖM, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON-THAM, M.-L. (2006) Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol*, 115(1):163-172.

THURLOW, L. R.; HANKE, M. L.; FRITZ, T.; ANGLE, A.; ALDRICH, A.; WILLIAMS, S. H.; ENGBRETSSEN, I. L.; BAYLES, K. W.; HORSWILL, A. R.; KIELIAN, T. (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol*, 186(11):6585-6596.

TINELLI, M.; MONACO, M.; MAFFEZZINI, E.; CERRI, M. C.; PIAZZA, M.; MINOLI, L.; ANESI, A.; PANTOSTI, A. (2014) *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 endocarditis with muscular metastatic abscesses. *New Microbiol*, 37(1):113-118.

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

TORRES, V. J.; PISHCHANY, G.; HUMAYUN, M.; SCHNEEWIND, O.; SKAAR, E. P. (2006) *Staphylococcus aureus* IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization. *J Bacteriol*, 188(24):8421-8429.

TREMAINE, M.; BROCKMAN, D.; BETLEY, M. (1993) Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect Immun*, 61(1):356-359.

TUCHSCHERR, L. P. N.; BUZZOLA, F. R.; ALVAREZ, L. P.; CACCURI, R. L.; LEE, J. C.; SORDELLI, D. O. (2005) Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infect Immun*, 73(12):7932-7937.

TWETEN, R.; CHRISTIANSON, K.; IANDOLO, J. (1983) Transport and processing of staphylococcal alpha-toxin. *J Bacteriol*, 156(2):524-528.

VAN LEEUWEN, W. B.; MELLES, D. C.; ALAIDAN, A.; AL-AHDAL, M.; BOELENS, H. A.; SNIJDERS, S. V.; WERTHEIM, H.; VAN DUIJKEREN, E.; PEETERS, J. K.; VAN DER SPEK, P. J.; GORKINK, R.; SIMONS, G.; VERBRUGH, H. A.; VAN BELKUM, A. (2005) Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 187(13):4584-91.

VARESANO, A.; VINEIS, C.; ALUIGI, A.; ROMBALDONI, F.; TONETTI, C.; MAZZUCHETTI, G. (2013) Antibacterial efficacy of polypyrrole in textile applications. *Fiber Polym*, 14(1):36-42.

VASCONCELOS, M. A.; MAGALHÃES, G. M.; FEITOSA, J. R. (2002) Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Cienc Rural*, 32(1):79-82.

VERAS, J. F.;DO CARMO, L. S.;TONG, L. C.;SHUPP, J. W.;CUMMINGS, C.;DOS SANTOS, D. A.;CERQUEIRA, M. M. O. P.;CANTINI, A.;NICOLI, J. R.;JETT, M. (2008) A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect Dis*, 12(4):410-415.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (1997) Tratado de infectologia: v. 1. In: (Ed.). São Paulo; Atheneu; 2009. , cap. 52, 1351 p.

WALEV, I.;WELLER, U.;STRAUCH, S.;FOSTER, T.;BHAKDI, S. (1996) Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 64(8):2974-2979.

WALLER, K. P.;ASPÁN, A.;NYMAN, A.;PERSSON, Y.;GRÖNLUND ANDERSSON, U. (2011) CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 152(1–2):112-116.

WANG, X.;GU, X.;YUAN, C.;CHEN, S.;ZHANG, P.;ZHANG, T.;YAO, J.;CHEN, F.;CHEN, G. (2004) Evaluation of biocompatibility of polypyrrole *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res A*, 68(3):411-422.

WARYAH, C. B.;GOGOI-TIWARI, J.;WELLS, K.;COSTANTINO, P.;AL-SALAMI, H.;SUNAGAR, R.;ISLOOR, S.;HEGDE, N.;RICHMOND, P.;MUKKUR, T. (2014) Serological versus molecular typing of surface-associated immune evading polysaccharide antigens-based phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 63(11):1427-1431.

WILKE, G. A.; WARDENBURG, J. B. (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated cellular injury. *P Natl Acad Sci USA*, 107(30):13473-13478.

XUE, K.;ZHOU, S.;SHI, H.;FENG, X.;XIN, H.;SONG, W. (2014) A novel amperometric glucose biosensor based on ternary gold nanoparticles/polypyrrole/reduced graphene oxide nanocomposite. *Sensor Actuat B-Chem*, 203:412-416.

YARWOOD, J. M.; SCHLIEVERT, P. M. (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest*, 112(11):1620-1625.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. (2009) Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet Microbiol*, 134(1):20-28.

ZECCONI, A.; SCALI, F. (2013) *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett*, 150(1-2):12-22.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. (1998) The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol Lett*, 168(2):227-233.

ZHOU, Y.;REN, Y.;FAN, C.;SHAO, H.;ZHANG, Z.;MAO, W.;WEI, C.;NI, H.;ZHU, Z.;HOU, X.;PIAO, F.;CUI, Y. (2013) Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Trop Anim Health Pro*, 45(8):1709-1714.

APÊNDICE A: Marcadores moleculares e suas aplicações nas pesquisas em bovinos.

MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES NAS PESQUISAS EM BOVINOS

[Molecular markers and their applications in bovine research]

Atzel Candido Acosta Abad^{1*}, Fabiana de Araújo Lopes², José Wilton Pinheiro³, Rinaldo Aparecido Mota¹

¹ Laboratório de Bacterioses, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

² Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), Departamento de Zootecnia (UFRPE).

³ Laboratório de Bacterioses, Departamento de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE).

RESUMO - A produção bovina tem sido favorecida pelos avanços na biotecnologia, especialmente pelos progressos alcançados nos estudos da molécula DNA. Os marcadores moleculares vêm incrementar a eficiência e a rapidez com que se selecionam animais para reprodução, permitindo que o progresso genético das gerações futuras seja significativamente superior das que as originaram. Objetivou-se com esta revisão abordar as características dos principais marcadores moleculares e como são detectados em laboratório, bem como, exemplificar algumas das suas aplicações na espécie bovina e as tendências de uso dos mesmos pelos diferentes grupos de pesquisa.

Palavras-Chave: RFLP, RAPD, Minissatélite, Microssatélite, SNP, AFLP e SSCP.

ABSTRACT - The advances in biotechnology, in special way for progress in studies of the DNA molecule favored bovine production. Molecular markers have been increasing the efficiency and rapidity with which animals are selected for playback, allowing that genetic progress of future generations will be significantly higher. The aims of the present review were to summarize the main features of molecular markers and how they are detected in the laboratory, as well as illustrate some of its applications in bovine specie and trends the use by different research groups.

Keywords: RFLP, RAPD, minisatellite, microsatellite, SNP, AFLP and SSCP.

INTRODUÇÃO

Junto à descoberta da estrutura do DNA em 1953 (Watson e Crick, 1953), a tecnologia do DNA recombinante e ao advento dos marcadores moleculares, vislumbrou-se a possibilidade de utilizar a informação oriunda do fenótipo com aquela oriunda diretamente do DNA (genótipo), de forma que os processos de identificação e seleção dos micro-organismos, plantas e animais com genótipos superiores pudessem ser realizados de forma mais eficiente.

O principal objetivo da análise do DNA em espécies de animais domésticos tem sido a descrição da arquitetura genética das características de interesse econômico, determinando o número de genes e a contribuição de cada um na expressão do fenótipo. Essa finalidade, no entanto, não tem sido facilmente alcançada, especialmente, porque as características de interesse são de natureza quantitativa, ou seja, controlada por vários genes,

cada um contribuindo com uma parcela para o fenótipo (Coutinho *et al.*, 2010).

Toda característica herdável presente no DNA e que diferencia dois ou mais indivíduos é conhecida por marcadores moleculares. Estas marcas são alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA denominadas de polimorfismos. O genoma é composto por aproximadamente 90% de sequências não codificadoras, ou seja, que carregam uma sequência de nucleotídeos que não será transcrita em RNA mensageiro, nem traduzida em proteína, sendo a maioria dessas alterações estáveis e não acarretam em mudanças fenotípicas (Dias-Salman *et al.*, 2009).

As marcas na sequência de DNA próximas aos genes permitiram o acompanhamento da segregação de alelos por gerações, e por consequência, da característica de interesse a elas associada. Também se vislumbrou a possibilidade de determinar o mérito genético de um animal nos estádios embrionários ou jovens, sem a necessidade

*Autor para correspondência: E-mail: acabad80@gmail.com

APÊNDICE B: Mastites em ruminantes no Brasil.

Artigo de Revisão

Mastites em ruminantes no Brasil¹

Atzel Candido Acosta^{2*}, Leonildo Bento Galiza da Silva², Elizabeth Sampaio Medeiros², José Wilton Pinheiro-Júnior² e Rinaldo Aparecido Mota²

ABSTRACT. Acosta A.C., Silva L.B.G., Medeiros E.S., Pinheiro-Júnior J.W. & Mota R.A. 2016. [Mastitis in ruminants in Brazil.] Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(7):565-573. Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: acabad80@gmail.com

Mastitis is a complex disease and is considered one of the main causes of losses to the global dairy industry. The objective of this review was to compile information for the last ten years of mastitis in ruminants in Brazil. The prevalence of subclinical mastitis was 48.64% in cattle, 30.7% in goats, 31.45% in sheep and 42.2% in the buffalo species, with especial participation of *Staphylococcus* spp. in the etiology. Risk factors associated with the occurrence of mastitis were related to problems in environmental sanitation and handling of animals. The largest percentage of resistance of microorganisms to antimicrobials was for penicillin, ampicillin, amoxicillin and neomycin. The use of molecular tools for diagnosis of mastitis-causing agents in the country is still scarce, making it difficult to obtain a faster, sensitive and specific diagnosis.

INDEX TERMS: Mastitis, etiology, epidemiology, antimicrobial resistance, ruminants.

RESUMO. A mastite é uma doença complexa e considerada uma das principais causas de perdas à indústria leiteira mundial. Objetivou-se com esta revisão compilar informações dos últimos dez anos sobre a mastite em ruminantes no Brasil. A prevalência da mastite subclínica chega a 48,64% na espécie bovina, 30,7% na espécie caprina, 31,45% na espécie ovina e 42,2% na espécie bubalina, destacando-se a etiologia por *Staphylococcus* spp. Os fatores de risco associados à ocorrência de mastite estão relacionados a problemas no saneamento ambiental e ao manejo dos animais. As bactérias isoladas do leite mastítico apresentam maior percentual de resistência a penicilina, ampicilina, amoxicilina e neomicina e a utilização de técnicas moleculares no diagnóstico dos agentes causadores de mastites no país, ainda é escassa o que dificulta a obtenção de um diagnóstico mais rápido, sensível e específico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite, etiologia, epidemiologia, resistência a antimicrobianos, ruminantes.

INTRODUÇÃO

Na última década, a produção de leite no Brasil esteve em sintonia com o desenvolvimento econômico do país. Partindo das informações contidas na base de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2000-2014 <http://www.ibge.gov.br/home/>), a tendência desta produção é de se incrementar (Fig.1). Estes níveis de produção permitiram que o Brasil ocupasse no ano 2014 a quinta posição no ranking mundial na produção de leite, ficando atrás apenas da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (IBGE 2014).

A quantidade e a qualidade do leite produzido são influenciadas por fatores relacionados com a obtenção, armazenamento e transporte do leite, fatores zootécnicos (manejo, alimentação e potencial genético dos rebanhos), assim como fatores sanitários da glândula mamária e do animal em geral. A mastite é a inflamação mais frequente em animais destinados a produção de leite e a que mais onera a pecuária leiteira (Vlieghe et al. 2012, Paul & Gunguly 2014, Pereira et al. 2014, Saab et al. 2014).

Apresenta-se na forma clínica quando são evidentes os sinais da inflamação (rubor, aumento da sensibilidade ao tato e presença de grumos ou flocos no leite) e subclínica onde o processo inflamatório necessita de testes de campo como o *California Mastitis Test* (CMT) ou de laboratório como a contagem direta ou eletrônica de células somáticas

¹ Recebido em 2 de julho de 2015.

Aceito para publicação em 6 de abril de 2016.

² Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. *Autor para correspondência: acabad80@gmail.com

APÊNDICE C: Frequência dos genes que codifica para as enterotoxinas estafilocócicas no Brasil.

Estados	Referências		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>
São Paulo	(Rall et al., 2008)	<i>S. aureus</i>	41%	7,7%	20%	12,8%	5,1%	28,2%	7,7%	25,6%	7,7%
	(Guimarães et al., 2013)	SCP ¹	11,8%	5,5%	6,3%	2,4%					
		SCN ²	57,3%	12%	18,7%	12%					
	(Rall et al., 2014)	<i>S. aureus</i>	53,33%	0%	13,33%	0%	6,67%	46,67%	26,67%	46,67%	13,33
Minas Gerais	(Veras et al., 2008)	SCP	45,45%	50%	0%	0%					
		SCN	37,5%	0%	25%	12,5%					
	(Dias et al., 2011)	<i>S. aureus</i>	60%	37,9%	6,9%						
Pernambuco	(Silveira-Filho et al., 2014)	<i>S. aureus</i>	0%	0%	0%	0%	0%	72,30%	29,80%	29,80%	21,30%
	(Almeida et al., 2013)	<i>S. aureus</i>	0%	0%	44,10%	0%	0%				
Paraíba	(Ferreira et al., 2014)	<i>S. aureus</i>	0%	0%	16,67%	0%	0%	0%	0%	2,78%	

ANEXO I: Licença para uso de animais em experimentação e/ou ensino



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	079/2014
Número do processo	23082.009382/2013
Data de emissão da licença	07 de Julho de 2014
Título do Projeto	Caracterização genética dos isolados de Staphylococcus aureus causadores de mastite nos rebanhos caprinos e bovinos no estado de Pernambuco, Brasil.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota
Colaboradores	José Wilton Pinheiro Júnior; Atzel Candido Acosta Abad.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	

Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim



Prof. Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

ANEXO II: Comprovante de envio do manuscrito intitulado “Virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows and goats with clinical and subclinical mastitis”



[# Home](#)

[/ Author](#)

[Review](#)

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Dairy Science

Manuscript ID

JDS-16-12115

Title

Virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows and goats with clinical and subclinical mastitis

Authors

Acosta Abad, Atzel

Fernandes Oliveira, Pollyanne

Albuquerque Linden, Laís

Ferreira da Silva, Isamara

de Medeiros, Elizabeth

Costa, Mateus

Pinheiro Junior, José

Mota, Rinaldo

Date Submitted

06-Oct-2016

[Author Dashboard](#)

ANEXO III: Comprovante de envio do manuscrito intitulado “Eficácia antibacteriana do polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* produtores ou não de biofilme isolados de amostras de leite mastítico de vacas e cabras”

[# Home](#)[/ Author](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to	Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
Manuscript ID	ABMVZ-2016-9888
Title	Eficácia antibacteriana do polipirrol frente a <i>Staphylococcus aureus</i> produtores ou não de biofilme isolados de amostras de leite mastítico de vacas e cabras
Authors	Abad, Atzel Santos, André da Silva, Fernando Magalhães Medeiros, Elizabeth Sampaio Oliveira, Helinando Costa, Mateus MatiuZZi Pinheiro Junior, José Mota, Rinaldo
Date Submitted	21-Dec-2016

[Author Dashboard](#)