

ANANDA PEREIRA AGUILAR

**EXPRESSÃO DE GENES DE *Staphylococcus aureus* EM RESPOSTA A  
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS  
NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A283e  
2012

Aguilar, Ananda Pereira, 1987-

Expressão de genes de *Staphylococcus aureus* em resposta a concentrações subinibitórias de antibióticos utilizados no tratamento de mastite bovina / Ananda Pereira Aguilar. – Viçosa, MG, 2012.

xiv, 46f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-40

1. Mastite. 2. Bovino - Doenças. 3. Antibióticos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2089692

ANANDA PEREIRA AGUILAR

**EXPRESSÃO DE GENES DE *Staphylococcus aureus* EM RESPOSTA A  
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NO  
TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

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

APROVADA: 23 de julho de 2012.

---

Juliana Rocha Lopes Soares Ramos

---

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

---

Luciano Gomes Fietto  
(Presidente da banca)

A Deus

A minha família e amigos

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por ter me dado força nessa caminhada;

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela infra-estrutura que permitiu a realização deste trabalho;

o CNPq pela bolsa concedida;

a minha orientadora Andréa de Oliveira Barros Ribon pelos ensinamentos, paciência e disposição;

aos professores Luciano Gomes Fietto e Poliane Zerbini pelos aconselhamentos e co-orientação;

às professoras Juliana Rocha Lopes Soares Ramos e Maria Aparecida Scatamburlo Moreira pelas sugestões e participação na banca examinadora;

aos meus pais e irmãos, a quem amo incondicionalmente;

as minhas amigas que tanto adoro, e me proporciona os momentos mais felizes da minha vida;

aos amigos que conquistei durante a graduação e pós-graduação e que foram para mim, um grande apoio;

aos amigos do LBM pelo apoio e compreensão, e pelos momentos de distração, em especial, Raphael, Mary Hellen e Murilo pela ajuda e pelos ensinamentos;

ao Eduardo secretário do Programa de Pós-graduação em Bioquímica pelo carinho, amizade e competência;

ao amigos distante, que apesar do tempo, sempre estão na torcida e transmitem muito carinho e amizade.

## **BIOGRAFIA**

Ananda Pereira Aguilár, filha de João Messias Sousa Aguilár e Francisquita Pereira dos Anjos, nasceu na cidade de Teófilo Otoni, Minas Gerais, em 30 de março de 1987.

Em dezembro de 2004 completou o ensino médio no Colégio Comunitário Dr. Fernando Magalhães em Almenara-MG.

Em maio de 2006, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso de bacharelado em Bioquímica em julho de 2010.

Em agosto de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de julho de 2012.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Micro-organismos e condição de cultivo.....	16
4.2. Antibióticos .....	16
4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos.....	16
4.4. Curvas de crescimento .....	17
4.5. Extração de RNA total e Síntese de cDNA.....	17
4.6. Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
APÊNDICE .....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Sistema <i>agr</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
<b>Figura 2</b> - Mecanismo regulatório do RNAIII em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
<b>Figura 3</b> - Vias regulatórias do <i>locus sarA</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
<b>Figura 4</b> - Interações regulatórias envolvendo o sistema <i>agr</i> , <i>sarA</i> e os seus homólogos.....	11
<b>Figura 5</b> - Regulação dos fatores de virulência e proteínas regulatórias analisadas nesse estudo.....	11
<b>Figura 6</b> - Curva de crescimento para os isolados <i>Staphylococcus aureus</i> 3993 (A e B) e 3212 (C e D), quando crescidos na presença de diferentes concentrações dos antibióticos gentamicina (GEN) e penicilina (PEN). .....	22
<b>Figura 7</b> - Expressão relativa dos genes reguladores de <i>Staphylococcus aureus</i> 3993 quando a cultura foi exposta a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina.....	25
<b>Figura 8</b> - Expressão relativa dos genes reguladores de <i>Staphylococcus aureus</i> 3212 quando a cultura foi submetida a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina.....	26
<b>Figura 9</b> - Expressão relativa dos genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> 3993 quando a cultura foi submetida a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina.....	28
<b>Figura 10</b> - Expressão relativa de genes de virulência em <i>Staphylococcus aureus</i> 3212 em resposta a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina.....	29

## LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE

<b>Figura 1A.</b> A diversidade genética de 85 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> que foram obtidas de propriedades leiteiras localizadas no sudeste do Brasil.....	41
<b>Figura 2A.</b> Curvas de dissociação para os genes avaliados por PCR em tempo real.....	42
<b>Figura 3A.</b> Eficiência (E) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica por PCR em tempo real.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fatores de virulência em <i>Staphylococcus aureus</i> e seus reguladores.....	6
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.....	20
<b>Tabela 3.</b> Concentração inibitória mínima dos antibióticos.....	22
<b>Tabela 4.</b> Valores médios de Ct ( <i>Cycle threshold</i> ) para os genes endógenos avaliados.....	23
<b>Tabela 5.</b> Eficiências de amplificações dos genes obtidas para as reações de PCR realizadas nesse estudo.....	24
<b>Tabela 6.</b> Genes reguladores e de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> 3993 modulados por concentrações subinibitórias de gentamicina ou penicilina. ....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI - Infusão cérebro-coração

CIM - Concentração inibitória mínima

CfB- Fator de agregação plaquetária B

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMT – *California Mastitis Test*

Ct - *Cycle threshold*

D.O - Densidade ótica

E – Eficiência

exp- Fase exponencial

GEN – Gentamicina

HLA –  $\alpha$ -hemolisina

HLB –  $\beta$ -hemolisina

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MH – Mueller Hinton

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

PEN – Penicilina

PVL – *Panton–Valentine leukocidin*

pxp – Fase pós-exponencial

RT-PCR - *Reverse transcription-polymerase chain reaction*

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SCV - *Small Colony Variants*

SdrC – Proteína de adesão celular

SubCIM – Concentração subinibitória mínima

Tm – Temperatura de dissociação (*Melting Temperature*)

UFC - Unidades formadoras de colônia

## RESUMO

AGUILAR, Ananda Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Expressão de genes de *Staphylococcus aureus* em resposta a concentrações subinibitórias de antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzoli e Poliane Alfenas Zerbini.

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos associado à mastite bovina. Essa bactéria produz vários fatores de virulência que conferem a capacidade de adesão e disseminação pelo tecido mamário, sendo esses fatores regulados por um conjunto de diversas proteínas. Durante a antibioticoterapia essas bactérias podem ser expostas a concentrações subinibitórias de antibiótico (subCIM) que podem alterar a expressão de diversos genes. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito de concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina, comumente utilizados no tratamento da mastite contagiosa bovina, na expressão tanto dos genes reguladores como dos genes de virulência de dois isolados de *S. aureus* geneticamente distintos. Inicialmente determinou-se a concentração inibitória mínima dos antibióticos, que apresentou valores próximos para os dois isolados e, posteriormente foram realizadas curvas de crescimento para selecionar as concentrações que não eram capazes de afetar drasticamente a taxa de crescimento. Culturas bacterianas submetidas a 0,25x, 0,12x e 0,06xCIM dos antibióticos penicilina e gentamicina foram cultivadas até metade da fase exponencial e início da fase estacionária (pós-exponencial) e utilizadas para extração de RNA. Em seguida, analisou-se a expressão dos genes *sdrC*, *clfB*, *hla*, *hly*, *icaD*, *agrA*, *saeR*, *sarA* e *rot* pela técnica de PCR em tempo real. Os dados de expressão foram analisados pelo método de Livak (2001) e normalizadas pelo gene endógeno *gyrB*. Os isolados 3993 e 3212 responderam de maneira diferenciada à expressão dos genes quando submetidos a concentrações subinibitórias, o que dificulta a generalização do efeito dos antibióticos. SubCIM foram capazes de alterar a expressão de alguns genes regulatórios e genes de virulência. As concentrações de 0,25x e 0,12xCIM de gentamicina foram capazes de aumentar a expressão dos genes

reguladores *sarA* e *rot*, para as culturas da bactéria 3993 obtidas na fase pós-exponencial. As concentrações de 0,12x e 0,06xCIM de penicilina foram capazes de alterar a expressão de *hla* em ambas as fases de crescimento, enquanto 0,25xCIM de gentamicina aumentou a expressão de *hla* na fase exponencial e *hfb* na fase pós-exponencial. Entretanto, ambos os antibióticos não foram capazes de alterar a expressão dos genes *sdrC*, *clfB*, *icaD*, *agrA* e *saeR* para essa mesma bactéria. Para o isolado 3212, 0,25xCIM de penicilina modulou significativamente o gene *clfB* quando a cultura foi obtida na fase exponencial. Assim, os resultados demonstraram que os antibióticos estudados podem induzir o aumento da expressão dos fatores de virulência, podendo conduzir a um efeito não desejável: a progressão da infecção.

## ABSTRACT

AGUILAR, Ananda Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Gene expression of *Staphylococcus aureus* in response to subinhibitory concentrations of antibiotics used in the treatment of bovine mastitis.** Adviser: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Poliane Alfenas Zerbini.

*Staphylococcus aureus* is a major pathogen associated with bovine mastitis. This bacterium produces several virulence factors that confer the ability to adhere and spread in the udder tissue, these factors being regulated by a number of different proteins. During the therapy with antimicrobial agents the bacteria can be exposed to subinhibitory concentrations of antibiotics (subMIC) that can alter the expression of various genes. The objective of this study was to analyze the effect of subinhibitory concentrations of gentamicin and penicillin, commonly used in the treatment of contagious bovine mastitis in the expression of regulators and virulence genes of two genetically distinct *S. aureus* isolates. We initially determined the minimum inhibitory concentration of antibiotics, which showed similar values for both isolates and subsequently growth curves were built to select the concentrations that were not able to drastically affect the growth rate. Bacterial cultures subjected to 0.25x, 0.12x 0.06xCIM of penicillin and gentamicin were grown to mid-exponential phase and early stationary phase (post-exponential) and used for RNA extraction. Then, we analyzed the expression of the genes *sdrC*, *clfB*, *hla*, *hly*, *icaD*, *agrA*, *saeR*, *sarA* and *rot* by real time PCR. The expression data were analyzed by the method of Livak (2001) and normalized with the endogenous gene *gyrB*. The isolates 3993 and 3212 responded differently in their gene expressions when subjected to subinhibitory concentrations, which hinders the generalization of the antibiotics effects. SubCIM were able to alter the expression of some regulatory and virulence genes. Concentrations of 0.25x and 0.12xCIM of gentamicin were able to enhance the expression of the regulatory genes *sarA* and *rot*, for the bacterial cultures of isolate 3993 obtained in the post-exponential phase. Concentrations of 0.12x and 0.06xCIM of penicillin were able to alter the expression of *hla* in both growth phases, whereas 0.25xCIM of gentamicin

increased the expression of *hla* in the exponential phase and *hly* in the post-exponential phase. However, both antibiotics were not able to alter the expression of the genes *sdrC*, *clfB*, *icaD*, *agrA* and *saeR* for the same isolate. For isolate 3212, 0.25xCIM of penicillin modulated significantly *clfB* gene expression when the culture was obtained in the exponential phase. Thus, the results demonstrated that these antibiotics may induce increased expression of virulence factors and may then lead to an undesirable effect: the progression of the infection.

## 1. INTRODUÇÃO

---

A mastite bovina, definida como uma inflamação da glândula mamária causada principalmente pela invasão de micro-organismos, é uma importante doença da cadeia produtiva do leite associada a grandes perdas econômicas em rebanhos de diferentes países. Essa doença se apresenta sob as formas clínica, diagnosticada por mudanças visíveis na aparência do leite e na glândula mamária, e subclínica, onde a manifestação é assintomática.

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos associado à mastite contagiosa bovina (Oliveira *et al.*, 2011). Essa bactéria produz vários fatores de virulência que conferem a capacidade de colonização e infecção da glândula mamária (Haveri *et al.*, 2007), dentre eles as toxinas, que causam danos à membrana celular do hospedeiro, e as proteínas de superfície, que possibilitam a aderência da bactéria ao tecido (Novick, 2003). *S. aureus* também produz uma estrutura que torna a bactéria resistente aos agentes antimicrobianos comumente utilizados conhecida por biofilme, onde uma matriz polissacarídica envolve uma comunidade de células bacterianas (Melchior *et al.*, 2006).

Muitos dos fatores de virulência produzidos por *S. aureus* são regulados por sistemas de dois componentes sendo o *agr* e *saeRS* os mais estudados. Além deles existem fatores de transcrição como SarA e Rot que se ligam a regiões promotoras conservadas possibilitando a repressão ou ativação dos genes de virulência. Isso torna a rede regulatória em *S. aureus* muito complexa, já que um gene pode ser regulado por diferentes reguladores para garantir a sua devida expressão a medida que a infecção progride. A expressão de hemolisina  $\alpha$ , por exemplo, é regulada positivamente pelos sistemas *agr* e *saeRS*. O sistema *agr* pode atuar de forma direta ligando-se ao mRNA do gene *hla* ou de forma indireta, por meio do aumento da expressão de *saeRS*. Uma terceira forma de regulação da expressão de *hla* é via SarA, que controla a expressão do RNAlII do sistema *agr*.

A antibioticoterapia é comumente adotada para tratar as infecções intramamárias causadas por *S. aureus*. Porém, durante a terapia a bactéria pode ser exposta a concentrações subinibitórias do antibiótico (subCIM), ou seja, uma concentração abaixo daquela necessária para inibir seu crescimento, devido a sobrevivência da bactéria em compartimentos intracelulares e possíveis associações dos antibióticos com às proteínas do plasma e do leite (Apparao *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2010; Gruet *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que subCIM têm estimulado a expressão de genes de virulência em *S. aureus* (Joo *et al.*, 2010; Subrt *et al.*, 2011). Assim, o antibiótico ao invés da ação bactericida esperada para tal medicamento, pode resultar em um efeito não desejável, como a progressão da infecção.

Estudos que avaliam o efeito de subCIM de antibióticos sobre a expressão dos genes reguladores são escassos. Este trabalho representou um passo inicial para o entendimento de como os reguladores globais de virulência em *S. aureus* são afetados por concentrações subinibitórias de penicilina e gentamicina, dois antibióticos comumente utilizados no tratamento da mastite contagiosa bovina. Os resultados gerados podem ajudar a avaliar a terapia aplicada ou a repensar as estratégias terapêuticas usadas na prática veterinária.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

O Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial em relação à produção de leite. Segundo dados expostos pela Embrapa Gado de Leite (2010), o Brasil é responsável por 5% da produção mundial o que o coloca na quinta posição do ranking. Entre os Estados da Federação, Minas Gerais é o maior produtor responsável por 27,3% do leite consumido no Brasil, seguido por Rio Grande do Sul (11,8%) e Paraná (11,7%) (Embrapa Gado de Leite, 2010). Segundo estatística do IBGE, em 2010 Minas Gerais continha um rebanho de aproximadamente 23 mil cabeças, sendo que a produção atingiu a cifra de 8,4 bilhões de litros de leite.

Entretanto, a produtividade leiteira no Brasil é considerada baixa, ficando muito aquém de países como Arábia Saudita (14,964 ton/vaca/ano), Israel (10,336 ton/vaca/ano), e Estados Unidos (9,593 ton/vaca/ano) (Embrapa Gado de Leite, 2010). Entre as causas apontadas para a baixa produtividade estão a deficiente qualidade da alimentação animal, baixo potencial genético do rebanho e até pouca especialização de mão-de-obra (Gomes, 1990).

A produtividade leiteira também é afetada negativamente pela mastite bovina, uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por micro-organismos. Os prejuízos econômicos são significativos e estão associados à redução da qualidade do leite, diminuição da produtividade, descarte do leite e dos gastos com medicamentos e serviços veterinários (Viguiet *et al.*, 2009; Braem *et al.*, 2010; Aiemsaard *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos, estima-se que o custo devido à mastite seja de 1,8 bilhões de dólares por ano o que corresponde a aproximadamente 10% do total de leite vendido pelos produtores (Brito *et al.*, 2007).

Na mastite bovina ocorrem alterações na composição do leite, como a diminuição no nível de lactose e proteínas (como a caseína) e aumento nos teores de sódio e nos níveis de proteínas ligadas a resposta inflamatória e imune como soroalbumina e IgG, comprometendo assim o valor nutricional do leite (Le Maréchal *et al.*, 2011).

A mastite se manifesta nas formas clínica e subclínica. A forma clínica é diagnosticada por mudanças visíveis na aparência do leite (presença de grumos e coágulos) e na glândula mamária (inchaço e vermelhidão) (Wu *et al.*, 2007). O teste da caneca telada ou caneca de fundo escuro pode ser utilizado para diagnosticar a mastite clínica na fase inicial, sendo recomendado a cada ordenha. Os primeiros jatos de leite são recolhidos e observados para detectar possíveis alterações como a presença de grumos, pus ou sangue (Ribeiro e Furlong, 2007; Coser *et al.*, 2012).

Na forma subclínica os animais permanecem sem sintomas aparentes, o que potencializa a transmissão de micro-organismos oriundos de animais infectados para os sadios (Verschoor *et al.*, 2009). O diagnóstico é feito por testes indiretos que se baseiam na elevada contagem de células somáticas, como leucócitos e células epiteliais, no leite (Bradley, 2002). O *California Mastitis Test* (CMT) é um dos testes mais utilizados para detecção da mastite subclínica por ser rápido e de baixo custo, apesar de possuir baixa sensibilidade (Leach *et al.*, 2008; Viguier *et al.*, 2009). Nesse teste, amostras de leite são colocadas em contato com um detergente aniônico neutro que rompe a membrana das células somáticas para liberação e agregação dos ácidos nucléicos. Ocorre a formação de um gel de viscosidade variada dependendo da quantidade de células somáticas presentes (Viguier *et al.*, 2009). De acordo com a espessura do gel, o resultado é dado em escores, que variam de 0 a 3, sendo negativo (0), fracamente positivo (1), positivo (2) e fortemente positivo (3) (Leach *et al.*, 2008).

Epidemiologicamente, a mastite pode ser dividida em contagiosa ou ambiental. A mastite contagiosa é aquela onde o animal é o próprio reservatório da doença, o patógeno se encontra no úbere e a transmissão se faz de animal para animal. As bactérias mais comumente associadas a essa forma são *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus* seguidas por *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma* sp (Pedrini e Margatho, 2003).

Na mastite ambiental a transmissão ocorre a partir do próprio ambiente (alimento, água, terra, e cama) das vacas leiteiras. Bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp estão entre os agentes etiológicos mais comuns associados a esse tipo de manifestação (Pedrini e Margatho, 2003; Sudhan e Sharma, 2010).

*S. aureus* é um importante patógeno causador da mastite bovina e vem sendo isolado de animais de rebanhos nacionais desde o início da década de 50 (Lacerda Jr. *et al.*, 1953). Estudos mostram que esse patógeno está presente na maioria dos rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais (Brito *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2002). Arcuri *et al.* (2006) analisaram amostras de leite do tanque de refrigeração obtidas de 24 rebanhos situados na região Sudeste de Minas Gerais e Norte do estado do Rio de Janeiro. *S. aureus* foi a espécie mais predominante, sendo isolada de 22 dos 24 rebanhos, seguida por *S. agalactiae*, isolada em 12 rebanhos.

A bactéria para estabelecer a infecção precisa adentrar o úbere da vaca e vencer as barreiras químicas e físicas. Depois que a bactéria ultrapassa as defesas anatômicas, ela precisa escapar dos mecanismos de defesas humoral e celular. Se as defesas imunes do hospedeiro não forem capazes de eliminar o patógeno, os níveis bacterianos se elevam e passam a causar danos ao epitélio mamário (Zhao e Lacasse, 2008).

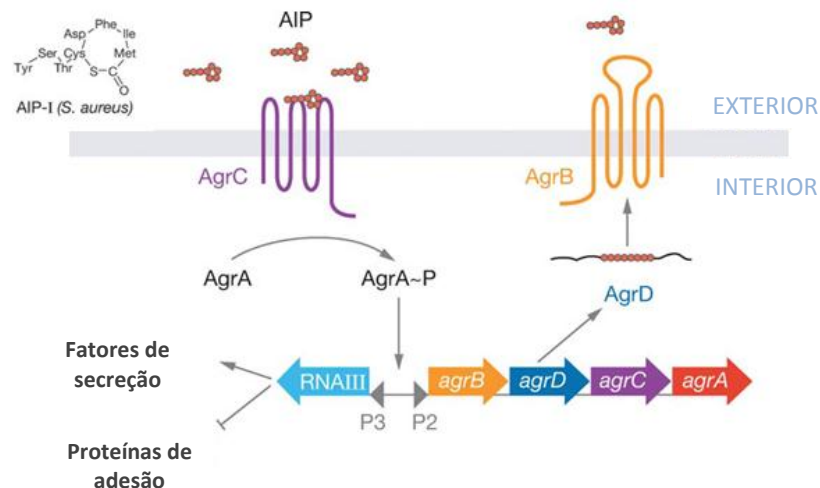
*S. aureus* é um patógeno versátil na produção de fatores de virulência (Tabela 1). Porém, não foi possível até o momento a definição de um conjunto de proteínas necessário para o estabelecimento da infecção mamária. Uma variedade de proteínas produzidas pela bactéria, entre elas adesinas e toxinas, contribui para a capacidade de colonização e infecção da glândula mamária. Esses fatores são na maioria das vezes, regulados por sistemas de dois componentes compostos por um sensor histidina cinase e uma proteína reguladora de resposta (Bronner *et al.*, 2004).

**Tabela 1.** Fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* e seus reguladores. Adaptado de Novick, 2003. (\*) Said-Salim *et al.*, 2003.

Gene	Produto	Atividade/função	Fase	Ação de genes reguladores			
				<i>agr</i>	<i>saeRS</i>	<i>rot</i>	<i>sarA</i>
<b>Superantígenos</b>							
<i>sea</i>	Enterotoxina A	Intoxicação alimentar	xp	0			
<i>seb</i>	Enterotoxina B	Intoxicação alimentar	pxp	+			b
<i>sec</i>	Enterotoxina C	Intoxicação alimentar	pxp	+			
<i>sed</i>	Enterotoxina D	Intoxicação alimentar	pxp	+			
<i>eta</i>	Exfoliatina A	Síndrome da pele escaldada	pxp	+			
<i>etb</i>	Exfoliatina B	Síndrome da pele escaldada	pxp	+			
<i>tst</i>	Toxina do choque tóxico-1	Síndrome do choque tóxico	pxp	+			b
<b>Citotoxinas</b>							
<i>hla</i>	α-hemolisina	Hemolisina/citotoxina	pxp	+	+	-	b
<i>hlb</i>	β-hemolisina	Hemolisina/citotoxina	pxp	+	+	-	b
<i>hld</i>	δ-hemolisina	Hemolisina/citotoxina	xp	+	0		+
<i>hlg</i>	γ-hemolisina	Hemolisina/citotoxina	pxp	+		-	b
<i>LukS/F</i>	P-V leucocidina	Leucolisina	pxp	+		-	
<b>Enzimas</b>							
<i>SpIA-F</i>	Serine protease-like	Protease putativa	pxp	+		-	
<i>ssp</i>	Protease V8	Fator de espalhamento	pxp	+	0		-
<i>nuc</i>	Nuclease	Nutrição	pxp	+	+		
<i>coa</i>	Coagulase	Coagulação/Digestão de coágulo	exp		+	+	+
<b>Proteínas de Superfície</b>							
<i>spa</i>	Proteína A	Anti-imune	exp		b	+	
<i>cna</i>	Colágeno BP	Ligar ao colágeno	pxp	0			
<i>fnbA</i>	Fibronectina BPA	Ligar a fibronectina	exp				+
<i>fnbB</i>	Fibronectina BPB	Ligar a fibronectina	exp				+
<i>clfA</i>	Fator de agregação A	Ligar a fibronogênio	exp	0			
<i>clfB</i>	Fator de agregação B	Ligar a fibronogênio	exp	0		+	0
<i>sdrC</i>	Proteína SdrC	Adesão a superfície celular	exp (*)	0		+	+
<b>Polissacarídeos capsular</b>							
<i>Cap5</i>	Polissacarídeos capsular Tipo 5	Antifagocitose?	pxp	+			+
<i>Cap8</i>	Polissacarídeos capsular Tipo 8	Antifagocitose?	pxp		+		

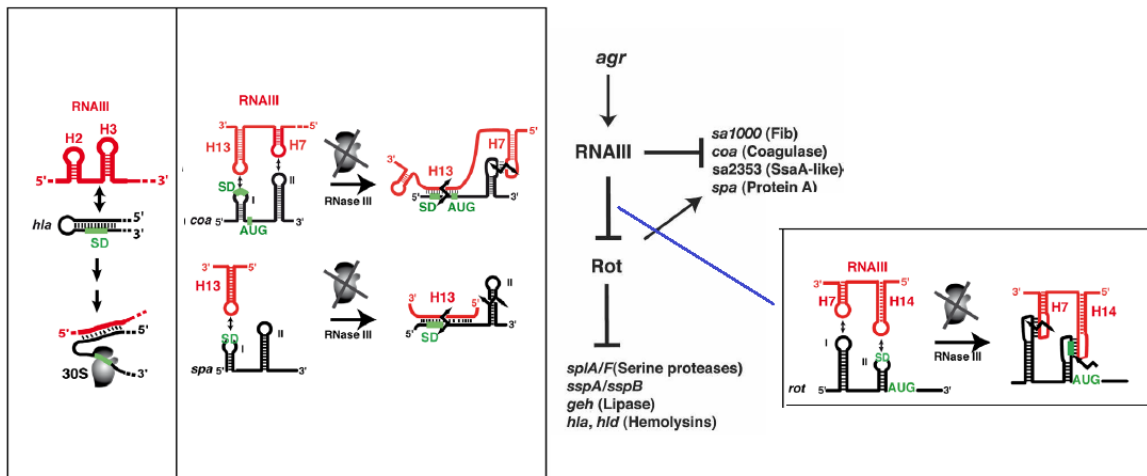
xp, do início até o fim da fase exponencial; exp, somente no começo da fase exponencial; ppx, fase pós-exponencial; 0, não tem efeito na expressão do gene; + *upregulated*; - *downregulated*; b. Controverso. Espaços em branco - a relação entre os genes de virulência e os genes reguladores não foram avaliados.

O *locus agr* é um sistema *quorum sensing* que regula a expressão dos genes de acordo com a densidade de células. Ele é composto por duas unidades transcricionais, RNAII e RNAIII, sendo que a transcrição é dirigida pelos promotores P2 e P3, respectivamente (Figura 1). O RNAII contém quatro genes (*agrA*, *agrC*, *agrD* e *agrB*). Os produtos dos genes *agrD*, *agrB* estão envolvidos na produção de AIPs (peptídeo autoindutor de *S. aureus* - *Autoinducing Peptide of Staphylococcus aureus*) constituído por oito resíduos de aminoácidos (Kong *et al.*, 2006). O *agrD* codifica o peptídeo AIP e a proteína AgrB exporta e adiciona modificações (anel de tiolactano) nesse peptídeo. Os AIPs ligam a uma proteína transmembrana AgrC que conduz a fosforilação de AgrA. AgrA fosforilada induz a expressão do operon *agrBDCA* e do RNA regulatório (RNAIII), o qual reprime a expressão de proteínas de adesão celular ao mesmo tempo que induz a expressão de fatores secretados como proteases e toxinas (Tabela 1) (Waters e Bassler, 2005). Desta forma, no começo da infecção, ou seja, quando a densidade de células é baixa, é necessária a produção de proteínas que propiciam a colonização do patógeno ao tecido hospedeiro. Quando a densidade é alta ocorre a produção de toxinas e fatores degradativos devido à ativação da resposta imune e a falta de nutrientes (Otto, 2004).



**Figura 1** – Sistema *agr* de *Staphylococcus aureus*. Adaptado de Waters e Bassler, 2005.

A regulação da expressão dos genes promovida pela molécula efetora (RNAIII) pode ocorrer de forma direta ou indireta. Por exemplo, a molécula de RNAIII liga-se ao mRNA ativando o início da tradução, e regulando positivamente a expressão da  $\alpha$ -hemolisina codificada pelo gene *hla*. O RNAIII pode se ligar a outros mRNA, impedindo a ligação do ribossomo e promovendo o acesso da RNase III, reprimindo assim a expressão desses genes que codificam a proteína A e a proteína coagulase. A regulação pode ser também de forma indireta, onde o RNAIII reprime a proteína reguladora Rot, que tem efeitos regulatórios contrários ao sistema *agr*. Nesse caso ocorre a repressão da transcrição da  $\alpha$ -toxina e a ativação de proteínas de adesão (Figura 2) (Boisset *et al.*, 2007; Felden *et al.*, 2011).



**Figura 2** – Mecanismo regulatório do RNAIII em *Staphylococcus aureus*. Adaptado de Boisset *et al.*, 2007; Felden *et al.*, 2011.

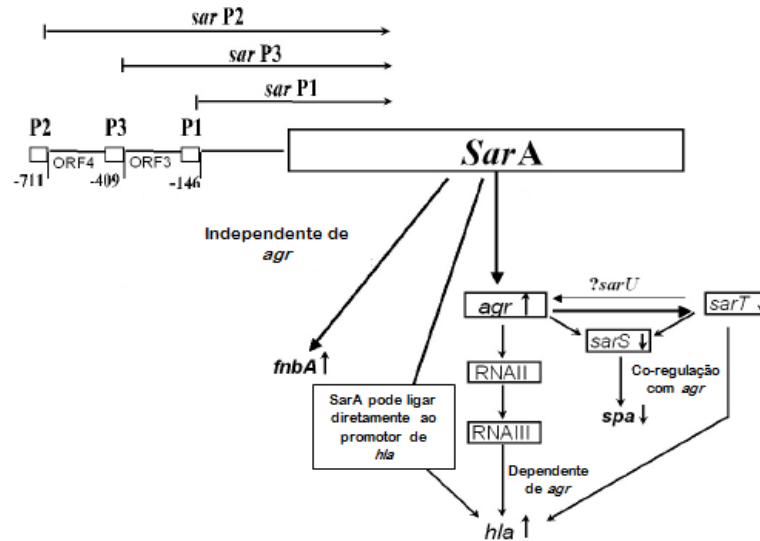
*Sae* é o segundo maior sistema de dois componentes envolvido na regulação global de fatores de virulência de *S. aureus* (Novick, 2003). O locus *sae* possui os genes *saeP*, *saeQ*, *saeR* e *saeS*, onde os dois últimos codificam o sensor tirosina-cinase e o regulador de resposta, respectivamente (Johnson *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). Os outros dois genes (*saeP* e *saeQ*) possuem função desconhecida (Adhikari e Novick, 2008). O sistema regulatório de *Sae* é importante na expressão de várias toxinas e proteínas de evasão do sistema

imune (Johnson *et al.*, 2010). Esse sistema regula positivamente a expressão de vários genes de virulência (Tabela 1), entre eles *hla* e *hlb* (hemolisinas), *coa* (coagulase), *nuc* (termonuclease), *eap* (proteína de aderência extracelular), *emp* (proteína ligadora da matriz extracelular), *spa* (proteína A) e *fnbA* (proteína ligadora de fibronectina) (Novick, 2003; Rogasch *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010), provavelmente através de uma interação direta com esses genes (Mainieiro *et al.*, 2010). Estudos já mostraram que o sistema *Sae* não afeta a expressão de *agr* (Bronner *et al.*, 2004).

Além dos sistemas de dois componentes, reguladores globais como SarA e Rot também estão envolvidos no controle da expressão dos fatores de virulência (Bronner *et al.*, 2004). SarA é uma proteína constituída por 124 resíduos de aminoácidos codificada pelo gene *sarA*, o qual consiste de três transcritos sobrepostos, dirigidos por três promotores distintos P1, P2 e P3. Já foi demonstrado que o *locus sarA* promove a síntese de proteínas que se ligam à fibronectina e ao fibrinogênio e também de toxinas enquanto reprime a expressão de proteases e a proteína A (Cheung *et al.*, 2008). SarA pode atuar alterando a síntese de fatores de virulência por uma via dependente ou independente do sistema *agr*. Pela primeira via, SarA liga a regiões dos promotores P2 e P3 do sistema *agr*, aumentando os níveis de RNAII e RNAlII e alterando a produção de fatores de virulência. Pela outra via, SarA se liga diretamente a regiões conservadas dentro dos promotores de vários genes que codificam proteínas associadas a parede celular e exoproteínas (Bronner *et al.*, 2004). A Figura 3 exemplifica esse sistema de regulação promovido pelo *locus sarA*.

Rot é uma proteína homóloga a SarA que reprime a síntese de toxinas e ativa a síntese de proteínas da parede celular. A produção da proteína Rot é regulada pelo sistema *agr* no qual a molécula efetora, RNAlII, inibe a tradução do mRNA (Xue *et al.*, 2011). Um estudo recente demonstrou que Rot ativa a capacidade da bactéria ligar ao fibrinogênio humano no início da fase exponencial e que o sistema *agr* pode reprimir a capacidade de ligação durante a fase exponencial (Xue *et al.*, 2011). Os autores concluíram que Rot atuaria

como um ativador de *clfB* (gene que codifica o fator de agregação ClfB) e *agr* regularia a expressão de *clfB* via Rot. Assim, Rot e o sistema *agr* modulariam a ligação ao fibrinogênio presente na superfície do hospedeiro pela regulação da expressão de *clfB*.

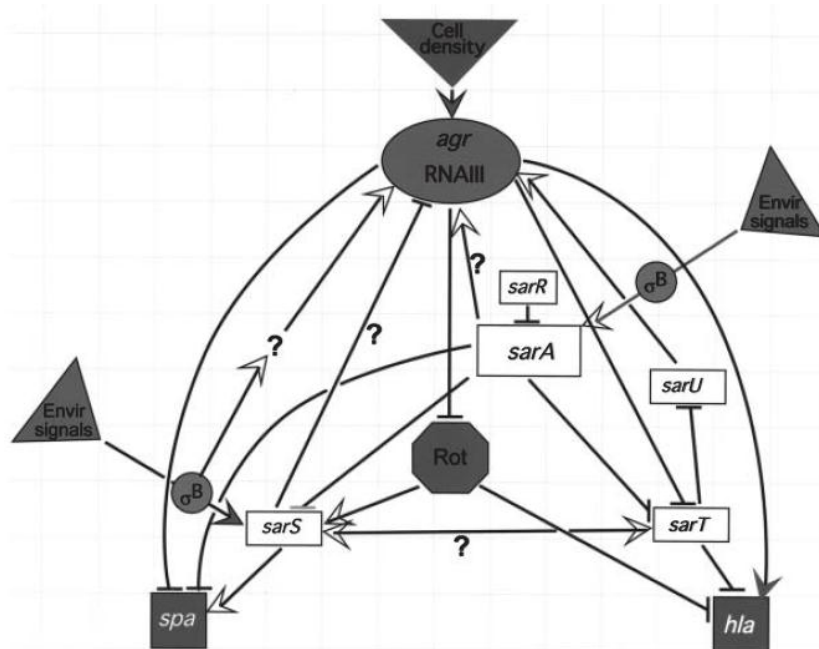


**Figura 3** - Vias regulatórias do locus *sarA* em *Staphylococcus aureus*. Adaptado de Cheung e Zhang, 2002.

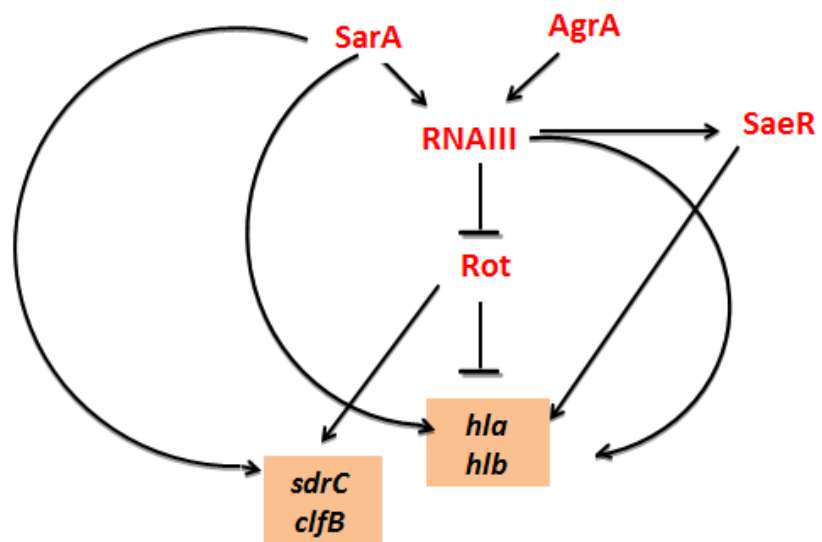
A rede regulatória dos genes de virulência é influenciada por sinais ambientais e nutricionais. Na transição da fase exponencial para a fase pós-exponencial, por exemplo, ocorre uma diminuição da disponibilidade de oxigênio, inerente do aumento da densidade populacional, desencadeando um aumento da expressão de proteínas de secreção e uma redução das proteínas de adesão, via o sistema *agr*. Porém, a expressão dessas proteínas podem ser moduladas por sinais ambientais (como ácido salicílico e etanol) que ativam o fator sigma B que atua sobre os promotores dos genes *sarS* e *sarA*, propiciando o aumento da expressão de *spa* e diminuição de *hla* (Figura 4).

A rede regulatória dos fatores de virulência é muito complexa, sendo que além de serem influenciadas por sinais ambientais e nutricionais, um gene é regulado por diversas proteínas regulatórias. A figura 5 apresenta as principais

vias de regulação dos fatores de virulência e proteínas regulatórias pesquisadas nesse estudo.



**Figura 4** - Interações regulatórias envolvendo o sistema *agr*, *sarA* e os seus homólogos. Setas representa *upregulation*, barras representam *downregulation*. Adaptado de Novick, 2003.



**Figura 5** – Regulação dos fatores de virulência e proteínas regulatórias analisadas nesse estudo.

A forma mais usual de tratamento da mastite é via administração intramamária de antibióticos. Espera-se que o antimicrobiano atinja uma concentração no úbere maior ou semelhante a concentração inibitória mínima (CIM) para o patógeno. Porém, a CIM é definida com base em testes de suscetibilidade realizados *in vitro* e não mimetiza as condições encontradas *in vivo* pelo patógeno, o que contribui para a baixa taxa eficácia do tratamento (Apparao *et al.*, 2009).

Estudos, como os exemplificado abaixo, têm demonstrado que concentrações subinibitórias (sub-CIM) estimulam a expressão de genes de virulência em *S. aureus*, assim como em outras bactérias. Desta forma, o antibiótico pode resultar em um efeito não desejável, como a progressão da infecção, ao invés da ação bactericida esperada para tal medicamento.

Subrt *et al.* (2011) avaliaram a influência da subCIM de antibiótico na modulação da transcrição de alguns genes de virulência como *spa* (proteína A) e *Luke* (leucotoxina E) e também do *locus* regulador *agr*. Os autores demonstraram que subCIM de penicilina e cefalotina estimularam a expressão de *spa* e *LukE*, enquanto a expressão de *agr* não foi afetada, o que sugere que esses antibióticos podem aumentar a patogenicidade bacteriana. Os autores também avaliaram o efeito de combinações de antibióticos e, observaram uma diminuição da indução de genes de virulência quando a penicilina estava na presença de gentamicina. Os autores sugeriram que esses antibióticos poderiam ser utilizados em combinação para o tratamento das infecções bacterianas.

Um estudou realizado por Joo *et al.* (2010) demonstrou que subCIM de tetraciclina, clindamicina e outros antibióticos inibidores de síntese protéica aumentou a produção de modulinas solúveis em fenol (PSMs - fatores de virulência que lisam neutrófilos e outros tipos celulares e provocam uma série de resposta proinflatórias) e a expressão do *locus agr* em isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Esses resultados sugerem que subCIM

dos antibióticos estudados podem agravar a progressão da doença, fazendo com que o antibiótico não tenha a ação bactericida esperada.

Rasigade *et al.* (2011) demonstraram que subCIM de oxacilina, moxifloxacina e linezolidina conduziram a um fenótipo de maior adesão em células de *S. aureus*, consistente com o aumento da expressão dos genes que codifica as proteínas adesão fnbA/B. Porém *in vivo*, apenas a cultura de *S. aureus* tratada com oxacilina apresentou um significativo aumento na adesão às culturas de osteoblastos, sugerindo que mais estudos são requeridos para explicar o efeito contrário observado.

Dumitrescu *et al.* (2011) avaliaram os efeitos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos sobre a expressão da citotoxina Leucocidina Pantón-Valentine (PVL) *in vitro* e *in vivo*, e investigaram as vias regulatórias que poderiam contribuir para a modulação da PVL pelos antibióticos. Foi observado que culturas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) quando tratadas com oxacilina e imipenemo apresentaram um aumento na produção de PVL consistente com o aumento nos níveis de mRNA dessa proteína. Esses efeitos foram também observados *in vivo*, com aumento nos níveis do mRNA em tecidos do pulmão a partir de ratos infectados com MRSA e tratados com imipenemo. Os autores demonstraram ainda que depois de diferentes tempos de incubação com imipenemo houve um aumento do nível de mRNA de *sarA* e uma diminuição de *rot*, sem efeito em *agr* e *saeRS*.

Estudo desenvolvido por Mitchell *et al.*, (2010), demonstrou que o fator sigma B propiciava a formação de SCV (*Small Colony Variants*) sob exposição a concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina). E, demonstram que concentrações subinibitórias de gentamicina podem provocar a emergência de SCVs *in vivo*. Além disso, SCVs e *S. aureus* tratados com esse antibiótico teve um aumento na habilidade de formação de biofilme, através de um mecanismo dependente de SigB. Um trabalho, desenvolvido por Hess *et al.*, (2011), também demonstrou que o antibiótico

gentamicina era capaz de aumentar a biomassa de biofilme em *S. aureus* associados a matérias cirúrgicos.

Existem poucos estudos que avaliam o efeito das concentrações subinibitórias de antibióticos sobre a expressão dos genes de virulência e genes regulatórios de *S. aureus* de origem bovina. Esse trabalho representa um passo inicial para avaliar o efeito de dois antibióticos, comumente utilizadas no tratamento da mastite bovina, sobre a expressão de genes reguladores. Sendo que os resultados desse estudo podem gerar informações importantes sobre os mecanismos básicos de regulação dos fatores de virulência, podendo ajudar também na melhoria da terapia aplicada ao animal.

### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1. Objetivo geral**

Analisar a expressão de genes de virulência e genes reguladores de *Staphylococcus aureus* em resposta a concentrações subinibitórias de dois antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar a concentração inibitória mínima dos antibióticos gentamicina e penicilina para dois isolados geneticamente distintos de *S. aureus*;
2. Estabelecer a curva de crescimento dos isolados geneticamente distintos em diferentes concentrações subinibitórias;
3. Avaliar o efeito das concentrações subinibitórias dos antibióticos na expressão de genes de virulência e genes reguladores por meio PCR em tempo real.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. Micro-organismos e condição de cultivo

Com base no trabalho de Klein *et al.*, (2012) os isolados *Staphylococcus aureus* 3993 e 3212 que possuem uma distância genética de 80% foram escolhidos para esse estudo. O primeiro apresentou todos os sete fatores de virulência investigados pelos autores enquanto que o segundo, apenas três (Figura 1A - Apêndice). Os isolados de campo foram cedidos pela Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora, e as culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar infusão-cérebro-coração (BHI; Himedia ®) mantidas por 24 horas a 37 °C. Para preparo dos estoques, cada isolado foi inoculado em 5 mL de meio BHI, e mantido em estufa a 37 °C por 16 h. Esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol esterilizado. Os microtubos foram mantidos a -20 °C.

### 4.2. Antibióticos

Estoques de soluções dos antibióticos gentamicina (Sigma®, G3632) e penicilina (Sigma®, 13752) foram preparados a uma concentração de 50 mg/mL, esterilizados por filtração e armazenados a -20 °C.

### 4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para cada isolado selecionado nesse estudo pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Inicialmente cada isolado foi crescido em meio BHI por 18 h, a 37 °C sob agitação. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados meio Muller-Hinton (MH) e diferentes volumes do antibiótico para concentrações que variaram de 0,01 µg/mL a 5,0 µg/mL. Em seguida, uma suspensão bacteriana ajustada para uma concentração final de 10<sup>5</sup> UFC/mL, foi adicionada em cada

poço contendo diferentes concentrações do antibiótico. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CIM foi definida pela menor concentração do antibiótico no qual visualmente não se observou turbidez do meio. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por duas vezes. A CIM foi confirmada por meio do teste de macrodiluição. Nesse teste, a um tubo de ensaio contendo 12 mL de meio de MH foi adicionado uma quantidade de antibiótico equivalente ao valor de 4x CIM. Uma alíquota de 6 mL foi transferida para outro tubo contendo 6 mL de caldo Mueller-Hinton, de tal modo a obter 2x CIM. Esse procedimento foi repetido até que se obtiveram valores correspondentes a 1x, 0,50x, 0,25x da CIM. A cada tubo de ensaio foi adicionado um volume de bactéria para obtenção de uma  $DO_{600nm} = 0,05$  e, os tubos foram incubados a 37 °C, 180 rpm, por 24 h. Novamente, a CIM foi definida pela menor concentração do antibiótico no qual visualmente não houve crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### **4.4. Curvas de crescimento**

A curva de crescimento para cada isolado foi realizada nos valores correspondentes a 0,50x, 0,25x, 0,125x, 0,0625x e 0x da CIM para cada antibiótico, em tubos de ensaio conforme descrito acima. A cada tubo de ensaio foi adicionado um volume de bactéria para obtenção de uma  $DO_{600nm} = 0,05$  e, os tubos foram incubados a 37 °C, 180 rpm, por 24 h. A cada hora foram retiradas alíquotas de 200 µL para leitura de absorvância em leitor de microplaca Versamax (Molecular Devices) até que alcançasse a fase estacionária. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.5. Extração de RNA total e Síntese de cDNA**

As células bacterianas foram crescidas em meio Mueller-Hinton contendo concentrações subinibitórias (0,25x, 0,125x e 0,0625x) de cada antibiótico. As células foram coletadas por centrifugação no meio da fase exponencial (0,3-0,4) e no início da fase estacionária (pós-exponencial) (0,6-0,8). Ao sedimento foram acrescentados tampão TE, lisozima - 50 mg/mL (Sigma, L7651) e Lisostafina - 0,5 U/µL (Sigma, L7386). As amostras foram incubadas a 37 °C por 40 min,

com inversão a cada 5 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de Trizol (Invitrogen) às amostras que foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Sigma, C2432), etapa a partir da qual se adotou o protocolo sugerido pelo fabricante. Todas as etapas de extração foram realizadas a 4°C e em condições livres de ribonucleases.

A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001). A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pelas leituras de absorvância a 260 nm e 280nm em aparelho *Evolution 60* (Thermo Scientific). Ao RNA total foi adicionado com 1 U/µL de DNase-RNase Free (Promega), para eliminação de DNA contaminante, seguindo especificações do fabricante. As amostras foram amplificadas por PCR convencional utilizando *primers* para o gene *16S rRNA* para confirmar a ausência de contaminação por DNA total bacteriano. Como controle positivo foi utilizado uma amostra contendo DNA de *S. aureus*. A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pela leitura no aparelho *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e as amostras de RNA total foram armazenadas a -80 °C. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit *ImPromII Reverse Transcriptase System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de amostras contendo 1µg de RNA total.

#### **4.6. Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real**

Para avaliar as alterações na expressão dos genes de virulência e genes reguladores escolheu-se a técnica de PCR em tempo real que possui a vantagem de ser altamente sensível e permitir a quantificação de pequenas mudanças na expressão gênica (Pfaffl, 2000). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Baseado nos valores de Ct (*Cycle threshold*), que é o ponto em que a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído, foi realizado a quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

descrito por Livak e Schmittgen (2001). A detecção foi realizada pelo sistema *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), sendo os genes *gyrA*, *gyrB* e *16S rRNA* avaliados para a escolha do gene normalizador (controle endógeno) para quantificação dos genes alvos *sdrC*, *clfB*, *hla*, *hly*, *icaD*, *agrA*, *saeR*, *sarA* e *rot*. O desenho dos pares de oligonucleotídeos *hla*, *agrA*, *saeR* e *rot* foi realizado através do programa *Primer3 plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), de acordo com os requisitos para PCR em tempo real.

As amostras foram analisadas em três repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata em cada placa de reação. Inicialmente, foram realizados ensaios para a determinação da concentração ótima de *primer* e da eficiência da reação. Os componentes para cada reação foram 1µL de cDNA, 6,0 µL de 2X *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystem) e *primers* nas concentrações de 200, 400, 600 e 1000 nM. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 10<sup>2</sup> (240ng/µL), 10<sup>1</sup> (24ng/µL), 10<sup>0</sup> (2,4ng/µL), 10<sup>-1</sup>(0,24ng/µL) e 10<sup>-2</sup> (0,024 ng/µL) do cDNA. Para o cálculo do valor do coeficiente angular da reta (*slope*) foi utilizada a fórmula Eficiência PCR=  $(10^{(1/-slope)} - 1) \times 100$ .

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

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

Gene alvo	Seqüência (5'- 3')	T <sub>m</sub>	Amplicon esperado (bp)	Fonte
<b><i>saeR</i></b>	F- CATGTTCTTGTGTTTTGGCAGT	63,8	102	Desenhado neste estudo
	R- TCATGATGCCAGAAGTTAATGG	63,6		
<b><i>sarA</i></b>	F- GCTTTGAGTTGTTATCAATGGTCAC	64,4	118	Ster <i>et al.</i> , 2005
	R- CTCTTTGTTTTCGCTGATGTATGTC	64,6		
<b><i>agrA</i></b>	F- GGTGCTTGAGCAAGCTAAAAAT	63,3	108	Desenhado neste estudo
	R- TGCTTACGAATTCCTACTGCCTA	63,4		
<b><i>rot</i></b>	F- ACAGGACGCTCTTTGTAAATCC	63,2	106	Desenhado neste estudo
	R- TGACGCTTAAAGAAATGGACAG	63		
<b><i>sdrC</i></b>	F- AAGACAATACGCAAACCTGCAACTG	66	96	Korem <i>et al.</i> , 2009
	R-GTCGTGATTGCATGTTACTACTAGTTTCT	64,3		
<b><i>clfB</i></b>	F- AATGCCATCATTGCACAAA	66,1	80	Korem <i>et al.</i> , 2009
	R- CACAAAACCTGATGCTTTACCAGAAA	64,9		
<b><i>hla</i></b>	F- AGTCTGGTGAAAACCCTGAAGA	63,8	118	Desenhado neste estudo
	R- CCGGTATATGGCAATCAACTTT	63,5		
<b><i>hlb</i></b>	F- TCTCAATCAGGGTGGGACAAA	66,6	99	Korem <i>et al.</i> , 2009
	R- TTACAATCGCTACGCCACCAT	66,2		
<b><i>icaD</i></b>	F-GGGTGGATCCTTAGTGTTACAATTTT	64,7	102	Korem <i>et al.</i> , 2009
	R-TGACTTTTTGGTAATTCAAGGTTGTC	64,8		
<b><i>gyrB</i></b>	F-ATCGGTGGCGACTTTGATCTA	72,0	104	Korem <i>et al.</i> , 2009
	R- CCACATCGGCATCAGTCATAA	72,0		
<b>16S rRNA</b>	F-TAT GGAGGAACACCAGTGGCGAAG	76,0	125	Ster <i>et al.</i> , 2005
	R-TCATCGTTTACGGCGTGGACTACC	76,0		

\**saeR*, *sarA*, *agrA* e *rot* – genes que codificam proteínas regulatórias; *sdrC*, *clfB*, *hla*, *hlb* – genes que codificam fatores de virulência, como descritos na tabela 1 – página 6; *icaD* – pertencente ao operon *icaADBC* que codifica as enzimas responsáveis pela produção do polissacarídeo de adesão intracelular (PIA), importante para a formação de biofilme nos isolados de *S. aureus*; *gyrB* e *16S rRNA* – genes endógenos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

O tratamento da mastite bovina é feito basicamente pela utilização de antimicrobianos (Fontana *et al.*, 2010). Porém o sucesso da terapia depende de vários fatores como tempo de administração e distribuição do antibiótico pelo úbere, anatomia do úbere, idade do animal, entre outros. Gehring e Smith (2006) citaram que esses fatores podem contribuir para que a concentração de antibióticos no tecido glandular seja insuficiente o que poderia expor as bactérias a concentrações subinibitórias de antibióticos. Outros autores já demonstraram que sob essas condições os patógenos podem apresentar um fenótipo não desejado como o aumento na produção de fatores de virulência (Joo *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2010; Rasigade *et al.*, 2011). Porém, a maioria desses estudos é voltada para isolados de origem humana e diferenças entre isolados humanos e bovinos já foi mais que comprovada (Reinoso *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2011).

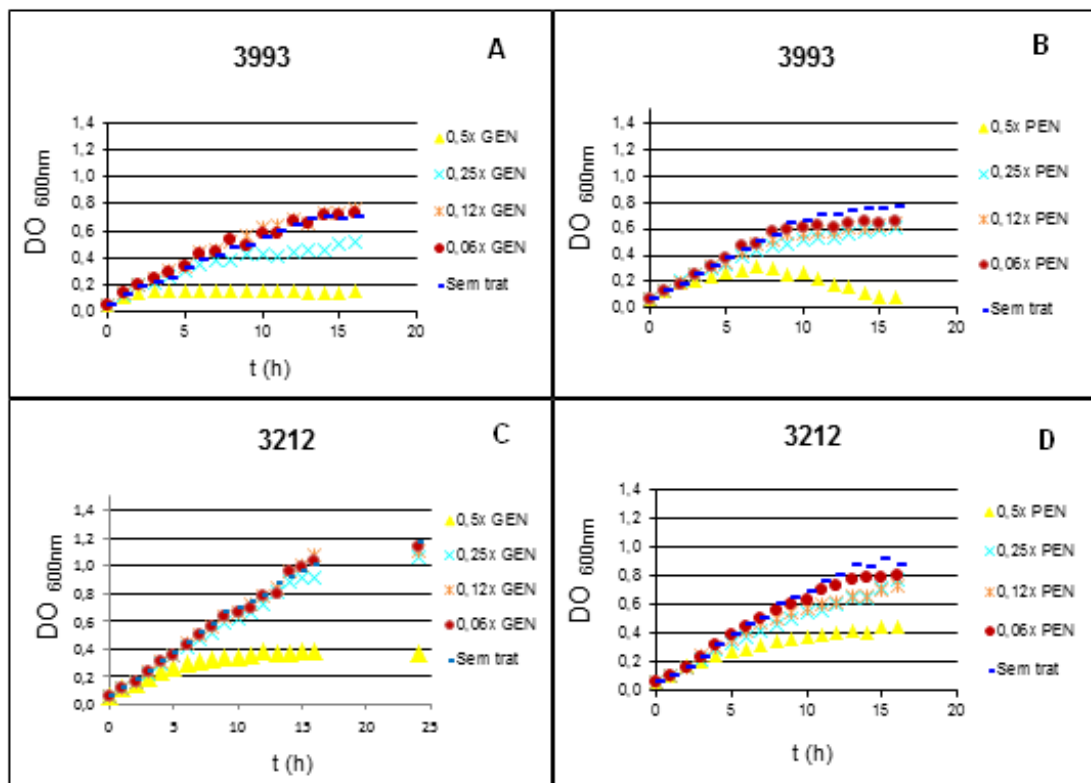
Diante do exposto pode-se supor que patógenos de origem animal possuem um mecanismo de regulação diferente dos isolados humanos e, portanto, respondem de maneira diferenciada às concentrações subinibitórias de antibióticos. No mercado existem várias formulações a base dos antibióticos utilizados nesse estudo (penicilina e gentamicina). Dentre eles podemos citar: Mastifin, Gentatec, Mastizone vs e plus, Topmast noxon (gentamicina) e Pentabiótico, Pentacilin®, Fortbiótico plus, Penfort (penicilina), sendo que a administração desses medicamentos pode ocorrer pela via intramamária ou sistêmica.

Inicialmente determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos para ambos os isolados. Sendo que a CIM dos antibióticos gentamicina e penicilina apresentaram valores próximos para os dois isolados (Tabela 3). Posteriormente, avaliou-se o efeito das sub-CIM de penicilina e gentamicina sobre o crescimento bacteriano. Na Figura 6, podemos observar que na presença de 50% da CIM dos antibióticos o crescimento bacteriano foi muito afetado, ao contrário do observado nas outras concentrações. Como os dois antibióticos testados tem efeito bactericida, foram escolhidas

concentrações que não afetassem drasticamente o crescimento bacteriano já que isso poderia ter também um reflexo na expressão dos genes analisados. Assim para obtenção das células para extração do RNA foram escolhidas as bactérias crescidas nas concentrações de 0,25x, 0,12x e 0,06x da CIM até o meio da fase exponencial e o início da fase estacionária.

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima dos antibióticos.

Isolado	Gentamicina CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	Penicilina CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>S. aureus</i> 3993	0,3	0,02
<i>S. aureus</i> 3212	0,4	0,04



**Figura 6** - Curva de crescimento para os isolados *Staphylococcus aureus* 3993 (A e B) e 3212 (C e D), quando crescidas na presença de diferentes concentrações dos antibióticos gentamicina (GEN) e penicilina (PEN).

Para a quantificação dos transcritos pela técnica PCR em tempo real foi inicialmente averiguada a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados. A figura 2A (Apêndice) apresenta a curva de dissociação e as temperaturas de dissociação ( $T_m$ 's) de cada amplicon testado, onde percebe-se a presença de um pico único, confirmando a amplificação de apenas um fragmento de DNA.

Para escolha do normalizador foram analisados três genes endógenos (*16S rRNA*, *gyrA* e *gyrB*), o gene *gyrB* foi o que apresentou menos variação nos valores de Ct, sendo por isso escolhido como normalizador (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores médios de Ct (*Cycle threshold*) para os genes endógenos avaliados.

	<i>16S rRNA</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
<b>Sem tratamento</b>	7,62±0,57	24,06±0,58	22,69±0,47
<b>0,25XCIM</b>	8,23±1,20	24,96±1,44	23,51±1,16
<b>0,125XCIM</b>	8,20±1,4	24,35±1,1	22,90±1,20
<b>0,06XCIM</b>	9,21±2,98	25,58±2,80	23,96±2,56

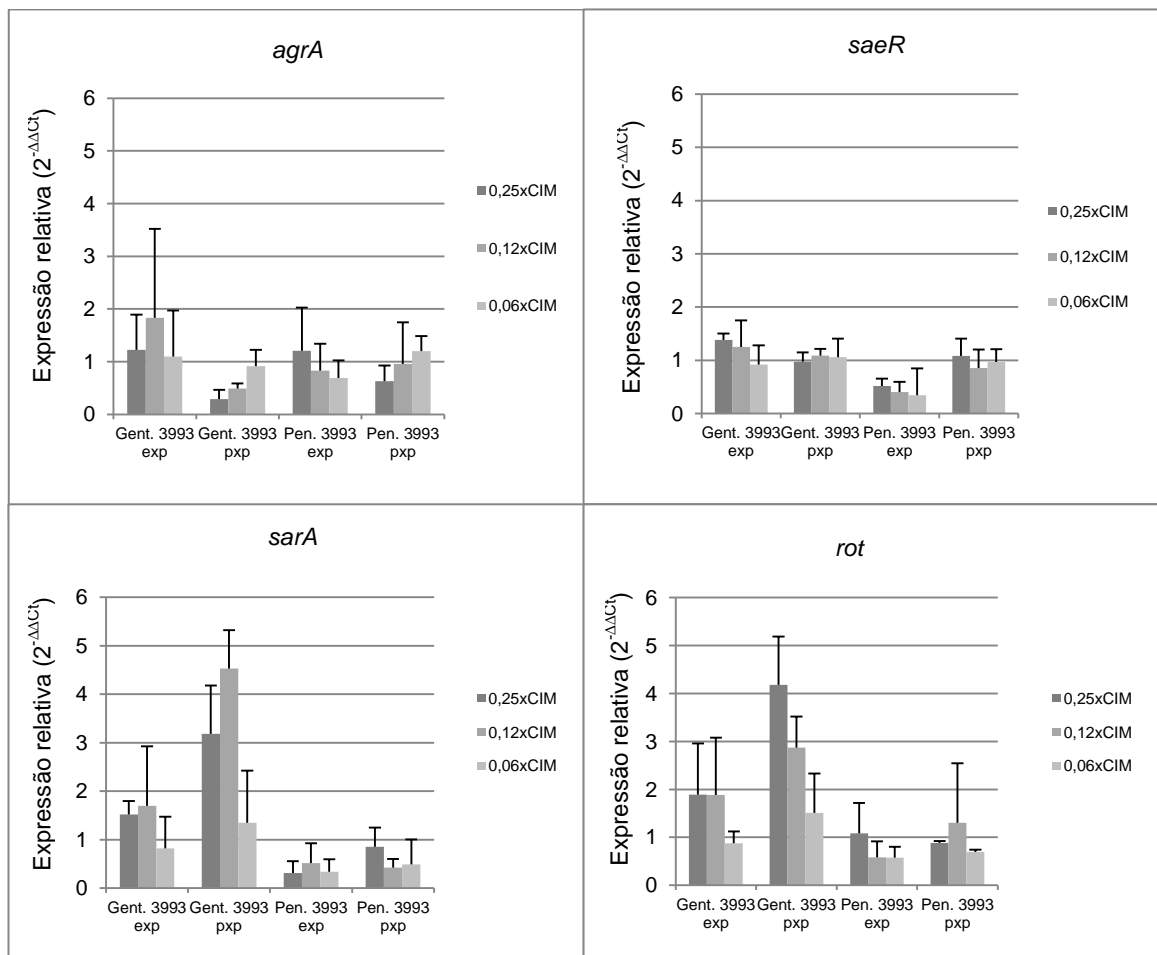
A eficiência da PCR em tempo real foi calculada através de gráfico onde os valores de Ct foram dispostos no eixo das ordenadas e os valores de cada diluição, no eixo das abscissas. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5. O cálculo utiliza a equação:  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . Quando o *slope* se aproxima de -3,32, a PCR apresenta 100% de eficiência. Para que os dados de expressão dos genes sejam validados, a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno devem possuir valores similares. Pelo método de Livak, utilizado nesse estudo, a eficiência de amplificação deve ser perto de 100% e a diferença entre o gene alvo e o controle interno deve ser em torno de 5%, como foi observado nos dados obtidos, onde os valores de eficiência variaram entre 93 e 101%.

**Tabela 5.** Eficiências de amplificação dos genes obtidas para as reações de PCR realizadas nesse estudo.

<b>Genes</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<i>agrA</i>	95,264
<i>saeR</i>	94,556
<i>sarA</i>	93,496
<i>rot</i>	95,302
<i>sdrC</i>	101,726
<i>clfB</i>	95,702
<i>hla</i>	93,023
<i>hlb</i>	93,190
<i>icaD</i>	97,696
<i>gyrB</i>	98,165

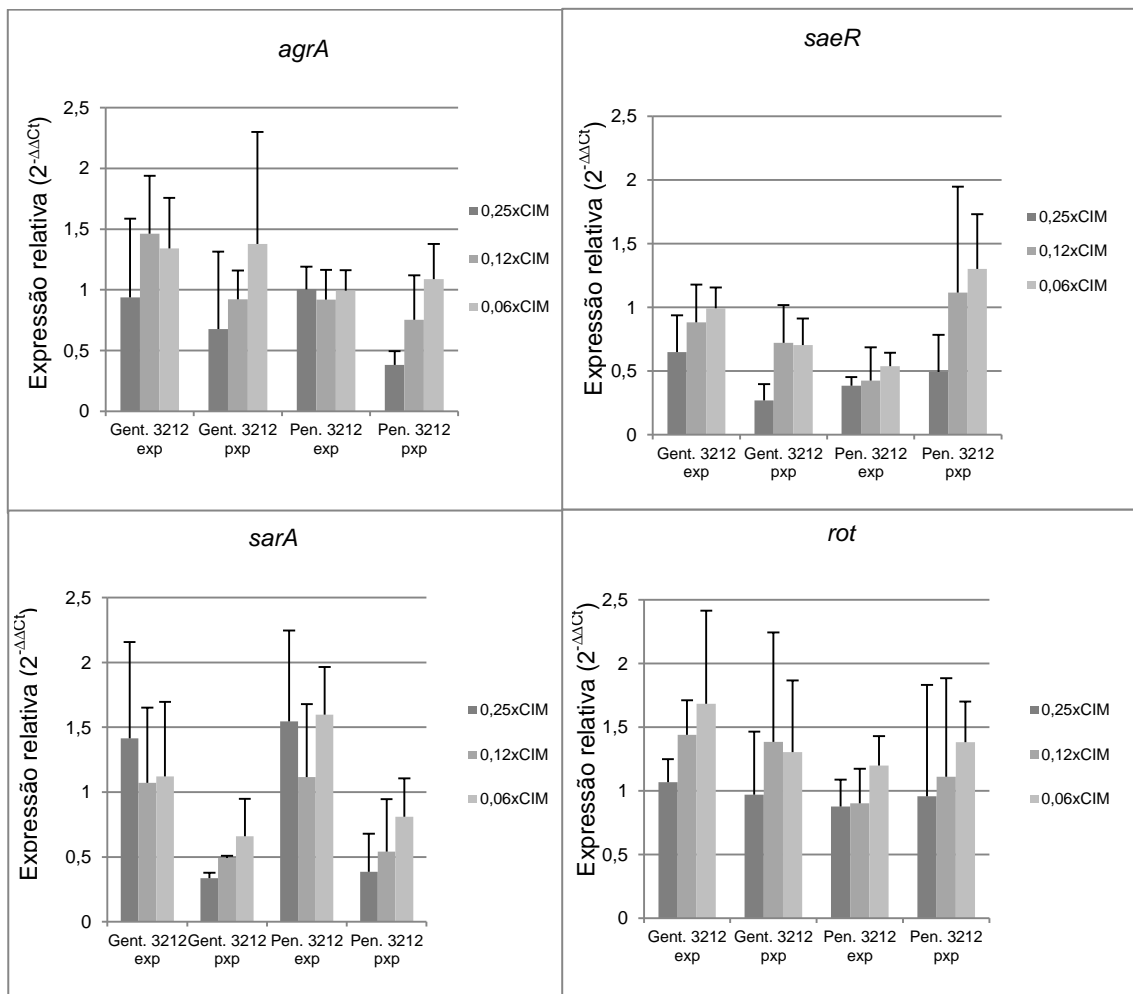
Poucos trabalhos até o momento comprovaram que os antibióticos podem interferir na expressão de genes que regulam a expressão de genes de virulência em bactérias (Kuroda *et al.* 2007; Dumitrescu *et al.* 2011), além de existir pouca informação de como os antibióticos interferem na complexa rede regulatória que controla genes de virulência em *S. aureus*. Concentrações subinibitórias de gentamicina foram capazes de provocar uma mudança na expressão dos genes reguladores quando comparada com as culturas não exposta aos antibióticos. Em relação ao isolado 3993, culturas obtidas na fase pós-exponencial e expostas a 0,25x da CIM de gentamicina foram capazes de reduzir a concentração do gene *agrA*, uma aparente diminuição que pode ser decorrente do menor crescimento da bactéria nessa condição (Figura 6). Nas outras situações analisadas e observadas na figura 7 as concentrações usadas não foram capazes de modular a expressão dos genes reguladores *agrA* e *saeR*. Entretanto, o antibiótico gentamicina foi capaz de alterar a expressão dos genes *sarA* e *rot* em mais de duas vezes mediante a exposição da cultura de *S. aureus* 3993 a 0,25x e 0,12x de CIM, obtida na fase pós-exponencial. O antibiótico penicilina não foi capaz de provocar modulação da expressão dos genes reguladores avaliados.

Era esperado que o aumento da transcrição de *sarA*, levasse a uma diminuição de *rot*, por existirem evidências que SarA está envolvido na regulação negativa da transcrição de *rot* (Manna e Ray, 2007; Dumitrescu *et al.*, 2011). Isso provocaria um aumento na expressão de toxinas como *hla* e *hlb*. Porém, *rot* foi expresso até 3 vezes mais que na condição controle. É possível que exista uma outra forma de regulação de *rot*, que independa de SarA.



**Figura 7** - Expressão relativa dos genes reguladores de *Staphylococcus aureus* 3993 quando a cultura foi exposta a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina. Cultura não exposta aos antibióticos foi utilizada como controle, sendo considerado o valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  igual a 1.

Para o isolado 3212, nenhuma das concentrações subinibitórias usadas foi capaz de provocar uma alteração significativa na expressão dos genes *agrA*, *saeR*, *sarA* e *rot*. A concentração de 0,25xCIM de gentamicina provocou uma leve redução na expressão de *saeR*, tendo 0,25x e 0,12xCIM o mesmo efeito sobre *sarA*. A concentração de 0,25xCIM de penicilina desencadeou uma leve redução na expressão de *agrA*, para as culturas obtidas na fase pós-exponencial, sendo que essa mesma concentração provocou o mesmo efeito na expressão de *saeR* para as culturas obtidas na fase exponencial (Figura 8).

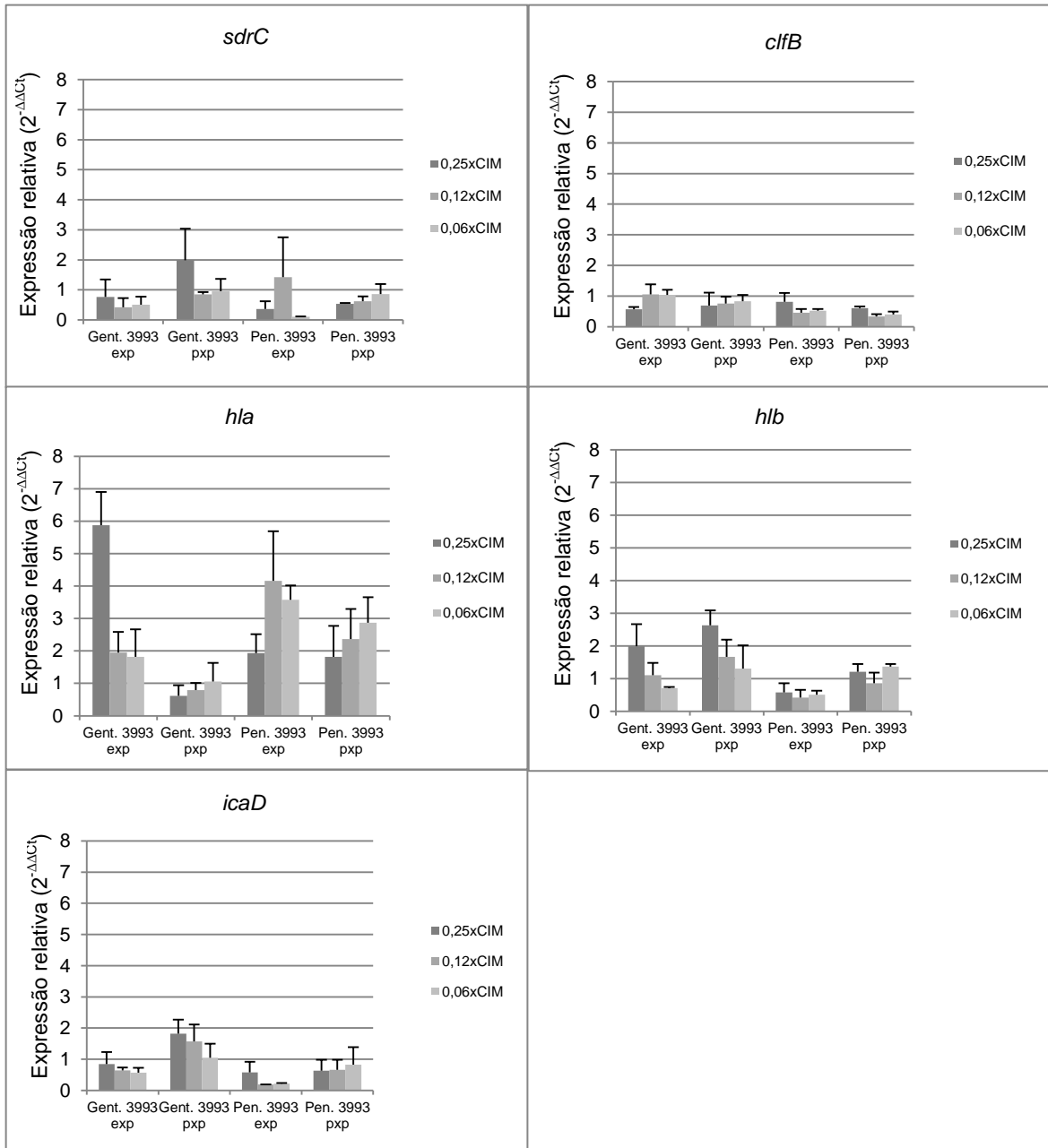


**Figura 8** - Expressão relativa dos genes reguladores de *Staphylococcus aureus* 3212 quando a cultura foi submetida a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina. Cultura não exposta aos antibióticos foi utilizada como controle, sendo considerado o valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  igual a 1.

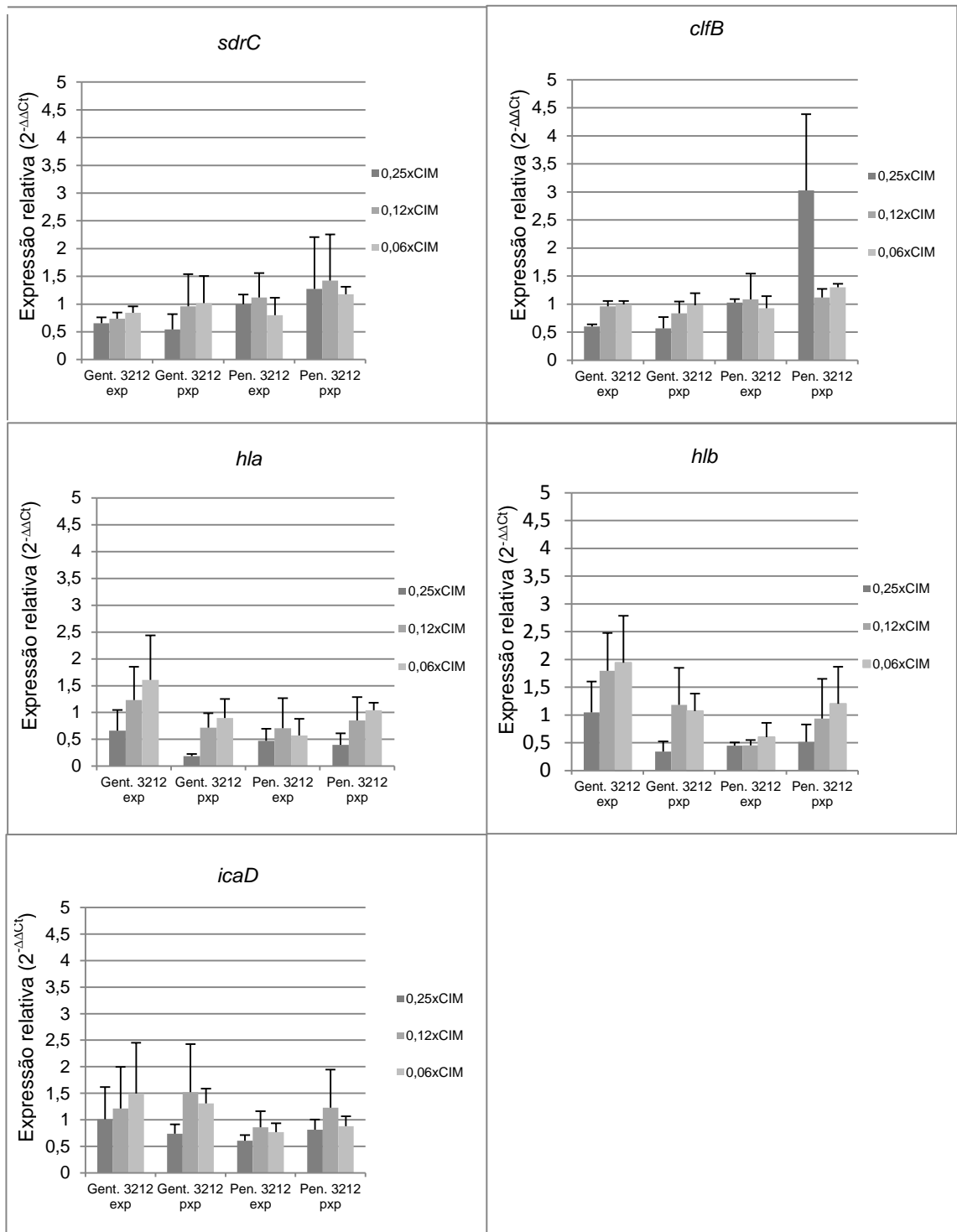
Em determinadas condições, concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina alteraram a expressão dos genes de virulência no isolado *S. aureus* 3993 (Figura 9). Observou-se que 0,25xCIM de gentamicina foi capaz de aumentar a expressão de *hla* em aproximadamente seis vezes para células recuperadas na fase exponencial. Penicilina também levou a um aumento (4x) na expressão do gene que codifica a toxina Hla nas concentrações de 0,12 e 0,06xCIM quando as culturas foram obtidas na fase exponencial. Essas mesmas concentrações também provocaram um aumento de 2,4 e 3 vezes respectivamente, para as culturas obtidas na fase pós-exponencial. Assim percebemos um aumento da expressão da  $\alpha$ -toxina (Hla) durante a fase exponencial, e não somente na fase pós-exponencial, onde se é esperada uma maior produção dessa toxina. Entretanto, um estudo desenvolvido por Jarraud *et al.*, (2000) demonstrou que em alguns isolados a expressão de *hla* é aumentada na fase exponencial, com o concomitante aumento da expressão de RNAlII, sugerindo que a transição da fase exponencial para pós-exponencial pode não ser um ponto regulatório crítico para *hla* nesses isolados. Houve aumento na expressão do gene *hly* quando o isolado *S. aureus* 3993 foi cultivada na presença de 0,25xCIM de gentamicina e recuperado na fase pós-exponencial. Nessa condição esse aumento foi devido a presença de SarA, que pode regular diretamente a hemolisina  $\beta$ .

A maioria dos estudos na modulação da expressão de proteínas mediada pelos antibióticos em *S. aureus* tem como foco as toxinas. Os resultados obtidos demonstraram que as concentrações subinibitórias de gentamicina não foram capazes de alterar a expressão dos genes das proteínas de adesão avaliadas (*clfB* e *sdrC*) para ambas as bactérias. Apenas 0,25xCIM de penicilina foi capaz de induzir a expressão do gene *clfB*, para bactéria 3212 obtida na fase pós-exponencial. Em relação aos genes *hla*, *hly* e *icaD* nenhuma das concentrações subinibitórias dos antibióticos foram capazes de modular a expressão dos genes para essa bactéria (Figura 10). Rasigade *et al.* (2011) demonstraram que subCIM de oxacilina, moxifloxacina e linezolida conduziram a um aumento da expressão dos genes que codificam as proteínas de adesão

FnbA/B (ligadoras de fibronectina), enquanto os antibióticos gentamicina e vancomicina não tiveram impacto sobre o nível de transcrição.



**Figura 9** - Expressão relativa dos genes de virulência de *Staphylococcus aureus* 3993 quando a cultura foi submetida a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina. Cultura não exposta aos antibióticos foi utilizada como controle, sendo considerado o valor de 2<sup>-ΔΔCt</sup> igual a 1.



**Figura 10** - Expressão relativa de genes de virulência em *Staphylococcus aureus* 3212 em resposta a concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina. Cultura não exposta aos antibióticos foi utilizada como controle, sendo considerado o valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  igual a 1.

Nas situações onde houve aumento da expressão de *hla*, esperava-se que ocorresse aumento na expressão de algum dos reguladores positivos *agr*, *saeR* ou *sarA* e/ou diminuição do gene repressor (*rot*), o que pode sugerir uma nova forma de controle. Burnside *et al.*, (2010) identificaram 72 genes que afetam a atividade hemolítica em *S. aureus*, entre esses os reguladores já conhecidos *agr*, *sae*, *rot* e *ccpA*, além de novos genes que foram sugeridos como sendo importantes para modular a expressão da  $\alpha$ -toxina.

De uma maneira geral, as duas bactérias avaliadas tiveram um padrão de expressão dos genes diferenciado em resposta às condições testadas. Como avaliado por Klein *et al.* (2012), o isolado 3993 possui mais genes de virulência do que o 3212, embora estudos *in vivo* ainda não tenham sido realizados para avaliar se uma é mais virulenta que a outra. Caso o isolado 3993 seja mais virulento pode-se supor que os antibióticos agem de sobremaneira sobre a bactéria mais virulenta. Porém, necessitamos de estudos futuros para esclarecer tal suposição.

Segundo Dancer (2008) nem todos os antibióticos exercem o mesmo efeito sobre a expressão dos genes de virulência, onde um efeito diferenciado pode ser observado dependendo do patógeno e do antibiótico administrado. Alguns estudos com isolados humanos de *S. aureus* evidenciaram que os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (derivados de penicilina e cefoxitina) induziram a expressão de *hla*, enquanto que os da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina, canamicina, netilmicina, estreptomicina e tobramicina) causaram a repressão do gene (Ohlsen *et al.* 1998; Kuroda *et al.* 2007; Dancer, 2008). Um efeito oposto foi verificado para *S. aureus* 3993 quando exposta a gentamicina ou penicilina, o que torna difícil uma generalização do perfil de expressão de *S. aureus* frente a antibióticos.

O aumento da expressão das hemolisinas  $\alpha$  e  $\beta$  de *S. aureus* é um resultado preocupante, já que o antibiótico ao invés de combater o patógeno, pode fazer com que a bactéria cause mais lesões a células do hospedeiro. Novos ensaios devem ser feitos testando outras toxinas para ter idéia se isso não é um efeito isolado. Estudos tem demonstrado que os antibióticos  $\beta$ -

lactâmicos conduzem a um aumento da citotoxina PVL (Leucocidina Panton-Valentine) em isolados de MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina) (Stevens *et al.*, 2007, Dumitrescu *et al.*, 2011). Segundo Wenzel *et al.* (2007) o aumento de PVL pode piorar o quadro clínico dos pacientes, sendo recomendado que o profissional da saúde suspenda o tratamento com tais antibióticos. Na prática veterinária, não existem informações para restrição do uso de determinados antibióticos que propiciam o aumento das toxinas. Assim, esse estudo representa um passo inicial nesse sentido. Acredita-se que o estudo de como a bactéria modula a expressão de seus genes em resposta ao ambiente em que se encontra vem gerar informações importantes não somente para entender mecanismos básicos de regulação gênica, mas também para ajudar a melhorar a terapia aplicada ao animal.

A tabela 6 apresenta os resultados mais relevantes obtidos para a análise de expressão dos genes avaliados nesse trabalho para o isolado de *S. aureus* 3993. Foram considerados como significativos apenas os resultados onde o nível dos transcritos mostrou variação igual ou maior que 2. O único gene modulado de modo significativo para *S. aureus* 3212 foi *clfB*, quando a cultura foi crescida em presença de 0,25x de penicilina até a fase exponencial.

**Tabela 6.** Genes reguladores e de virulência de *Staphylococcus aureus* 3993 modulados por concentrações subinibitórias de gentamicina ou penicilina.

Gene	Gentamicina		Penicilina	
	exp	pxp	exp	pxp
<i>sarA</i>		0,25x (+)		
		0,12x (+)		
<i>rot</i>		0,25x (+)		
		0,12x (+)		
<i>hla</i>	0,25x (+)		0,12x (+)	0,12x (+)
			0,06x (+)	0,06x (+)
<i>hlb</i>		0,25x (+)		

exp – fase exponencial; pxp – fase pós-exponencial; espaço em branco – não houve modulação significativa dos genes avaliados.

## 6. CONCLUSÕES

---

Os resultados obtidos por este trabalho permitem concluir:

- *S. aureus* 3993 e 3212 apresentaram um perfil de susceptibilidade similar para os antibióticos testados;
- Concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina foram capazes de alterar a expressão de genes de virulência e genes reguladores avaliados;
- Concentrações subinibitórias de penicilina e gentamicina propiciaram o aumento da expressão de toxinas, podendo conduzir a progressão da infecção;
- *S. aureus* 3993 e 3212 tiveram uma resposta diferenciada para a expressão dos genes quando submetidas às concentrações subinibitórias de gentamicina e penicilina, dificultando a generalização do efeito desses antibióticos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Adhikari, R.P.; Novick, R.P. 2008. Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiol.*, 154, 949-959.
- Aiemsraad, J.; Aiumlamai, S.; Aromdee, C.; Taweechaisupapong, S.; Khunkitti, W. 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res. Vet. Sci.*, 91, e31–37.
- Apparao, M.D.; Ruegg, P.L.; Lago, A.; Godden, S.; Bey, R.; Leslie, K. 2009. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. *J. Dairy Sci.*, 92, 2589-2597.
- Arcuri, E.F.; Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Pinto, S.M.; Ângelo, F.F.; Souza, G.N. 2006. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 440-446.
- Boisset, S.; Geissmann, T.; Huntzinger, E.; Fechter, P.; Bendridi, N.; Possedko, M.; Chevalier, C.; Helfer, A.C.; Benito, Y.; Jacquier, A.; Gaspin, C.; Vandenesch, F.; Romby, P. 2007. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Gene Dev.*, 21, 1353–1366.
- Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.*, 164, 116-128.
- Braem, G.; De Vliegher, S.; Supre, K.; Haesebrouck, F.; Leroy, F.; De Vuyst, L. 2010. (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: a comparison of type strains and field isolates. *Vet. Microbiol.*, 147, 67-74.
- Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Ribeiro, M.T. 1999. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 51, 129-135.

- Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Portugal, J.A.B. 2002. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, 57, 47-52.
- Brito, M.A.; Brito, J.R.; Arcuri, E.; Lange, C.; Silva, M.; Souza, G. 2007. Mastite. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Embrapa. [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_202\\_21720039247.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_21720039247.html). Acessado julho/2012.
- Bronner, S.; Monteil, H.; Prevost, G. 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 183-200.
- Burnside K.; Lembo, A.; de los Reyes, M.; Iliuk A.; Tran, N-T.B.; Connelly, J.E.; Lin, W-J; Schmidt, B.C; Richardson, A.R.; Fang, F.C., Tao, W.A.; Rajagopal, L. 2010. Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of *Staphylococcus aureus* by a Serine/Threonine Kinase and Phosphatase. *Plos One*, 5, e11071.
- Cheung, A.L.; Nishina, K.A.; Trottonda, M.P.; Tamber, S. 2008. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40, 355-361.
- Cheung, A.L.; Zhang, G. 2002. Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front. Biosci.*, 7, d1825-1842.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 8th ed. Approved Standards. CLSI Doc. M07-A8. Wayne, PA.
- Coser, S.M.; Lopes, M.A.; Costa, G.M. 2012. Mastite bovina: controle e prevenção. *Boletim Técnico - Lavras/MG*, 93, 1-30. [http://www.editora.ufla.br/adm/upload/boletim/Bol\\_93.pdf](http://www.editora.ufla.br/adm/upload/boletim/Bol_93.pdf). Acessado julho/2012.
- Dancer, S.J. 2008. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 61, 246–253.
- Dumitrescu, O.; Choudhury, P.; Boisset, S.; Badiou, C.; Bes, M.; Benito, Y.; Wolz, C.; Vandenesch, F.; Etienne, J.; Cheung, A.L.; Bowden, M.G.; Lina

- G. 2011.  $\beta$ - lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine Leukocidin expression by triggering *sarA* and *rot* global regulators of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55, 3261–3271.
- Embrapa. 2010. Principais países produtores de leite no mundo – 2010. <http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>. Acessado julho/2012.
- Felden, B.; Vandenesch F.; Bouloc P.; Romby P. 2011. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *Plos Pathog.*, 7, e1002006.
- Fontana, V.L.D.S.; Gianinni, M.J.S.M.; Leite, C.Q.F.; Miranda, E.T.; Almeida, A.M.F.; Fontana, C.A.P.; Souza, C.M.; Stella, A.E. 2010. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes as drogas antimicrobianas e detecção do gene da  $\beta$ -lactamase em *Staphylococcus aureus*. *Vet. Zootec.*, 17, 552-559.
- Gehring, R.; Smith, G.W. 2006. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 29, 237-41.
- Gomes, S.T. 1990. Novos e velhos problemas do leite. [http://www.ufv.br/der/docentes/stg/stg\\_artigos/Art\\_040%20%20NOVOS%20E%20VELHOS%20PROBLEMAS%20DO%20LEITE%20\(29-3-90\).pdf](http://www.ufv.br/der/docentes/stg/stg_artigos/Art_040%20%20NOVOS%20E%20VELHOS%20PROBLEMAS%20DO%20LEITE%20(29-3-90).pdf). Acessado julho/2012.
- Gruet, P.; Maincent, P.; Berthelot, X.; Kaltsatos, V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 50, 245-259.
- Haveri, M.; Roslöf, A.; Rantala, L.; Pyörälä, S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 993–1000.
- Hess, D.J.; Henry-Stanley, M. J; Wells, C. L. 2011. Gentamicin Promotes *Staphylococcus aureus* Biofilms on Silk Suture. *J. Surg. Res.* -, 1–7. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2010. Produção da Pecuária Municipal - 2010. <http://www.ibge.gov.br/estadosat/index.php>. Acessado julho/2012.
- Jarraud, S.; Lyon, G.J.; Figueiredo, A.M.; Gerard, L.; Vandenesch, F.; Etienne, J. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 182, 6517–6522.
- Johnson, M.; Sengupta, M.; Purves, J.; Tarrant, E.; Williams, P.H.; Cockayne, A.; Muthaiyan, A.; Stephenson, R.; Ledala, N.; Wilkinson, B.J.; Jayaswal, R.K.; Morrissey, J.A. 2010. Fur is required for the activation of virulence gene expression through the induction of the *sae* regulatory system in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 301, 44-52.
- Joo, H.S.; Chan, J.L.; Cheung, G.Y.; Otto, M. 2010. Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the *agr* virulence regulator and production of phenol-soluble modulins and cytolysins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 4942-4944.
- Klein, R.C.; Klein, M.H.F.; Brito, M.A.V.P; Fietto, L.G.; Ribon, A. O. B. 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet. Microbiol.* Article In Press.
- Kong, K.F.; Vuong, C.; Otto, M. 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296, 133-139.
- Korem, M.; Gov, Y.; Rosenberg, M. 2009. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb. Pathog.*, 48, 74-84.
- Kuroda, H.; Kuroda, M.; Cui, Longzhu; Hiramatsu, K. 2007. Subinhibitory concentrations of  $\beta$ -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol. Lett.*, 268, 98–105.

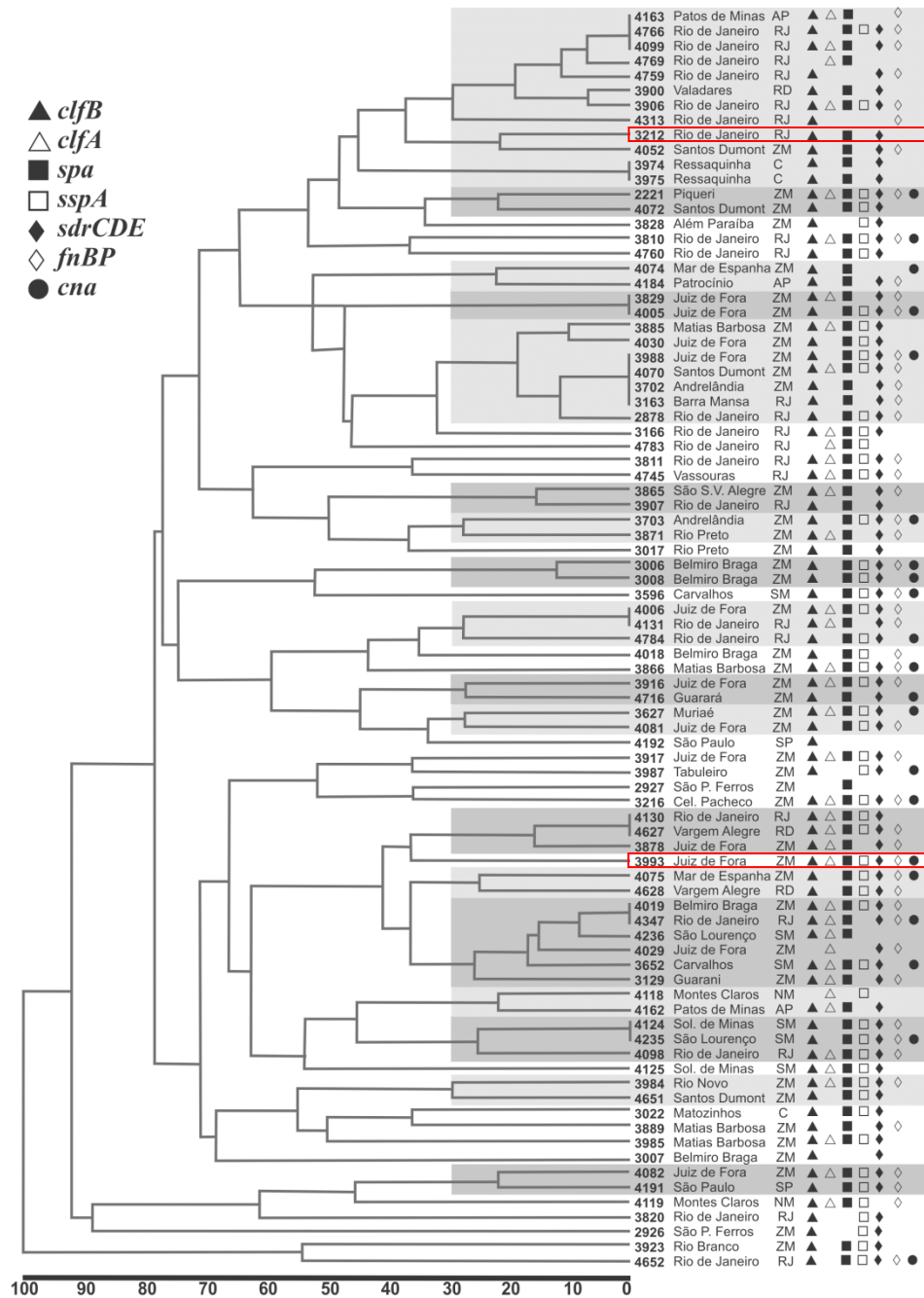
- Lacerda Jr.; P.M.G.; Zani Neto, L.; Freitas, D.C. 1953. Estudos sobre as mastites bovinas - contribuição ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas. Rev. Fac. Med. Vet., 5, 55-64.
- Le Maréchal, C.; Thiéry, R.; Vautor, E.; Le Loir, Y. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. Dairy Sci. & Technol., 91, 247-282.
- Leach, K.A.; Green, M.J.; Breen, J.E.; Huxley, J.N.; Macaulay, R.; Newton, H.T.; Bradley, A.J. 2008. Use of domestic detergents in the California mastitis test for high somatic cell counts in milk. Vet. Rec., 168, 566-570.
- Liang, X.; Hall, J.W.; Yang, J.; Yan, M.; Doll, K.; Bey, R.; Ji, Yinduo. 2011. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Hyperproduction of Alpha-Toxin in *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE, 6, e18428.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. Methods, 25, 402-408.
- Mainiero, M.; Goerke, C.; Geiger, T.; Gonser, C.; Herbert, S.; Wolz C. 2010. Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system *saers*. J. Bacteriol., 192, 613-623.
- Manna, A.C.; Ray, B. 2007. Regulation and characterization of rot transcription in *Staphylococcus aureus*. Microb. 153, 1538–1545.
- Melchior, M.B.; Vaarkamp, H.; Fink-Gremmels, J. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? Vet. J., 171, 398-407.
- Mitchell, G.; Brouillette, E.; Séguin, D.L.; Asselin, A.-E.; Jacob, C.L.; Malouin, F. 2010. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. Microb. Pathogenesis, 48, 18-27.
- Novick, R.P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol. Microbiol., 48, 1429-1449.
- Ohlsen, K.; Ziebuhr, W.; Koller, K.P.; Hell, W.; Wichelhaus, T.A.; Hacker. J. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin

- (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11, 2817-2823.
- Oliveira, M.; Bexiga, R.; Nunes, S.F.; Vilela, C.L. 2011. Invasive potential of biofilm-forming *Staphylococci* bovine subclinical mastitis isolates. *J. Vet. Sci.*, 12, 95-97.
- Otto, M. 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front. Biosci.*, 9, 841-63.
- Pedrini, S.C.B.; Margatho, L.F.F. 2003. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arq. Inst. Biol.*, 70, 391-395.
- Pfall, M.W. 2000. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2003-2007.
- Rasigade, J.P.; Moulay, A.; Lhoste, Y.; Tristan A.; Bes, M.; Vandenesch F.; Etienne, J.; Lina, G.; Laurent, F.; Dumitrescu, O. 2011. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.*, 11, 1471-2180.
- Reinoso, E.B.; El-Sayed, A.; Lammler, C.; Bogni, C.; Zschock, M. 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol. Res.*, 163, 314—322.
- Ribeiro, A.C.C.L.; Furlong, J. 2007. Controle da Mastite. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Embrapa. [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_71\\_21720039240.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_71_21720039240.html). Acessado julho/ 2012.
- Rogasch, K.; Ruhmling, V.; Pane-Farre, J.; Hoper, D.; Weinberg, C.; Fuchs, S.; Schudde, M.; Broker, B. M.; Wolz, C.; Hecker, M.; Engelmann, S. 2006. Influence of the two-component system *SaeRS* on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.*, 188, 7742-7758.

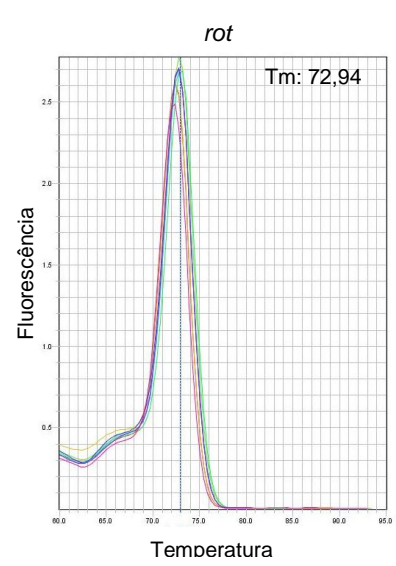
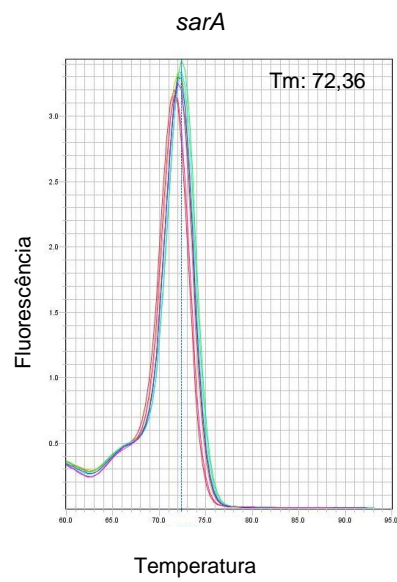
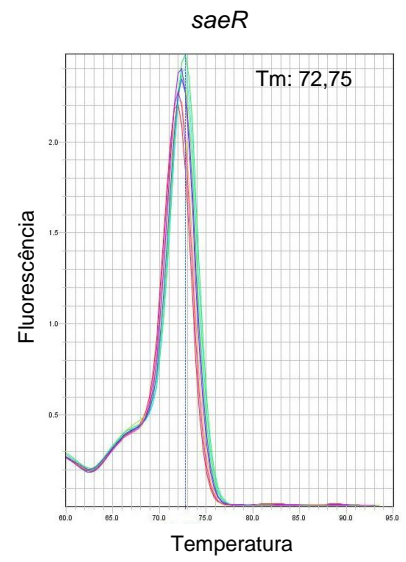
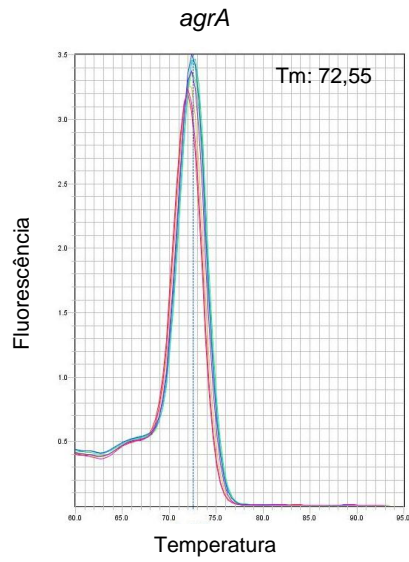
- Saïd-Salim, B.; Dunman, P.M.; McAleese, F.M.; Macapagal, D.; Murphy, E.; McNamara, P.J.; Arvidson, S.; Foster, T. J.; Projan, S.J.; Kreiswirth, B.N. 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. J. Bacteriol., 185, 610–619.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Ster, C.; Gilbert, F.B.; Cochard, T.; Poutrel, B. 2005. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. Mol. Cell Probes, 19, 227-235.
- Stevens, D.L; Ma, Y.; Salmi, D.B; McIndoo, E., Wallace, R.J.; Bryant, A.E. 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis., 195, 202–211.
- Subrt, N.; Mesak, L.R.; Davies, J. 2011. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother., 66, 979-984.
- Sudhan, N.A.; Sharma, N. 2010. Mastitis- An Important Production Disease of Dairy Animals. Farm management & diseases, 72-88.
- Sun, F.; Li, C.; Jeong, D.; Sohn, C.; He, C.; Bae, T. 2010. In the *Staphylococcus aureus* two-component system *sae*, the response regulator SaeR binds to a direct repeat sequence and DNA binding requires phosphorylation by the sensor kinase SaeS. J. Bacteriol., 192, 2111-2127.
- Verschoor, C.P.; Pant, S.D.; Schenkel, F.S.; Sharma, B.S.; Karrow, N.A. 2009. SNPs in the bovine IL-10 receptor are associated with somatic cell score in Canadian dairy bulls. Mamm. Genome, 20, 447-454.
- Viguièr, C.; Arora, S.; Gilmartin, N.; Welbeck, K.; O'Kennedy, R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. Trends Biotechnol., 27, 486-493.
- Waters, C.M.; Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21, 319-346.

- Wenzel, R.P.; Bearmana, G.; Edmonda, M.B. 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): new issues for infection control. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 30, 210–212.
- Wu, J.; Hu, S.; Cao, L. 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 3131-3135.
- Xue, T.; You, Y.; Shang, F.; Sun, B. 2011. Rot and Agr system modulate fibrinogen-binding ability mainly by regulating *clfB* expression in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *Med. Microbiol. Immunol.*, 201, 81-92.
- Zhao, X.; Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.*, 86, 57-65.

## APÊNDICE



**Figura 1A.** A diversidade genética de 85 isolados de *Staphylococcus aureus* que foram obtidas de propriedades leiteiras localizadas no sudeste do Brasil. Dendograma obtida a partir do programa GENES e o índice de dissimilaridade DICE utilizando o método UPGMA.



**Figura 2A.** Curvas de dissociação para os genes avaliados por PCR em tempo real.

Figura 2A. Continuação

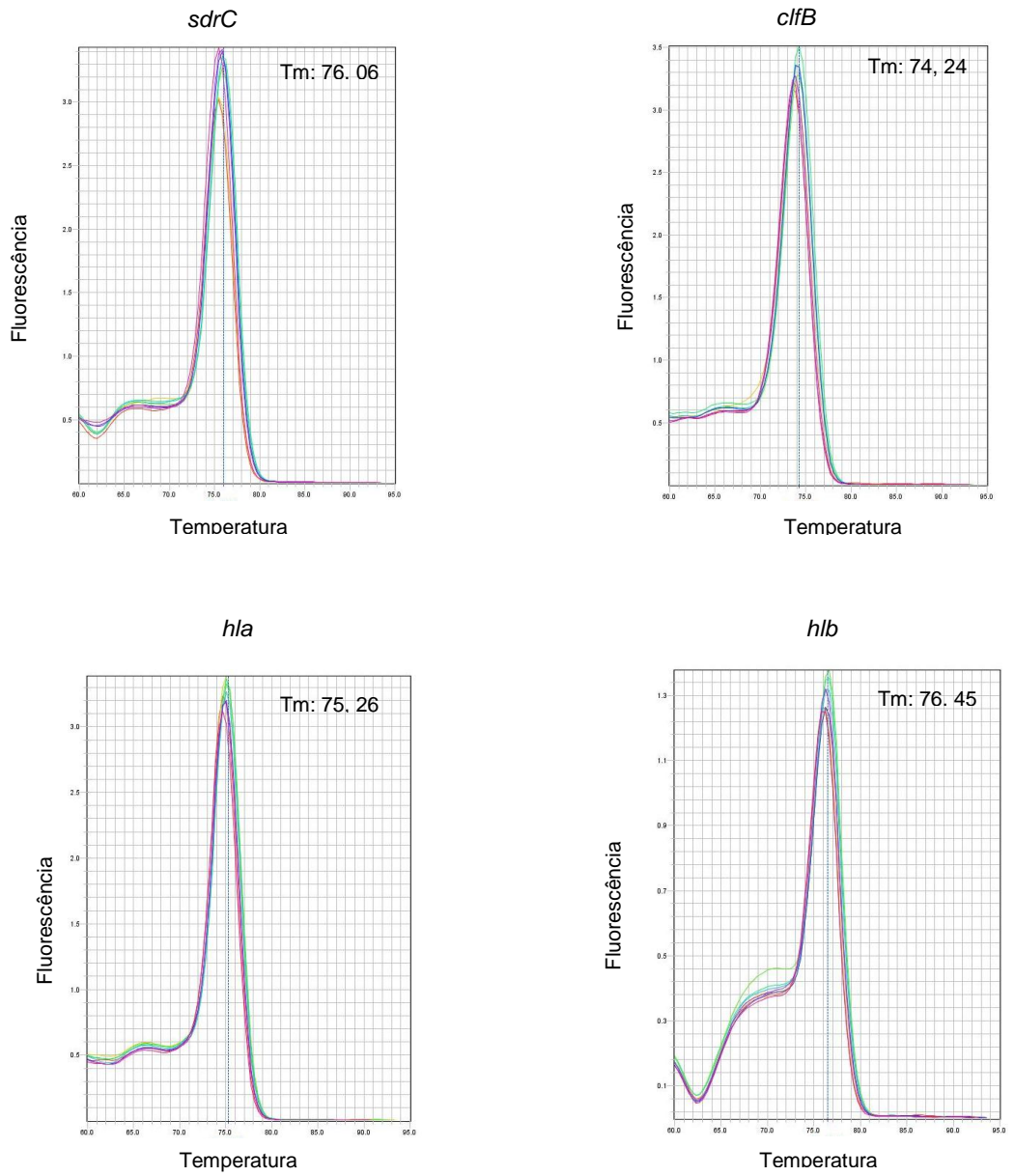
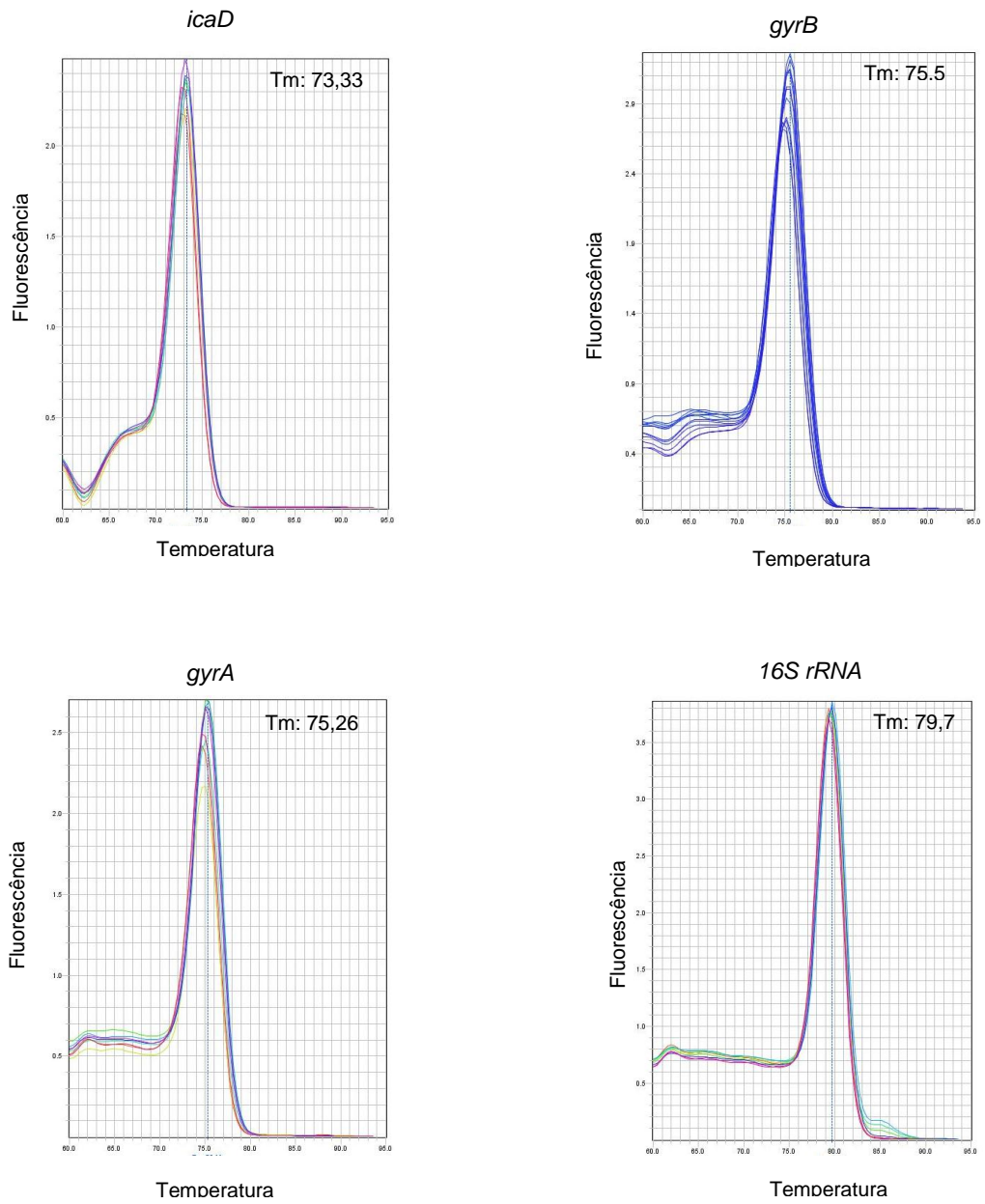
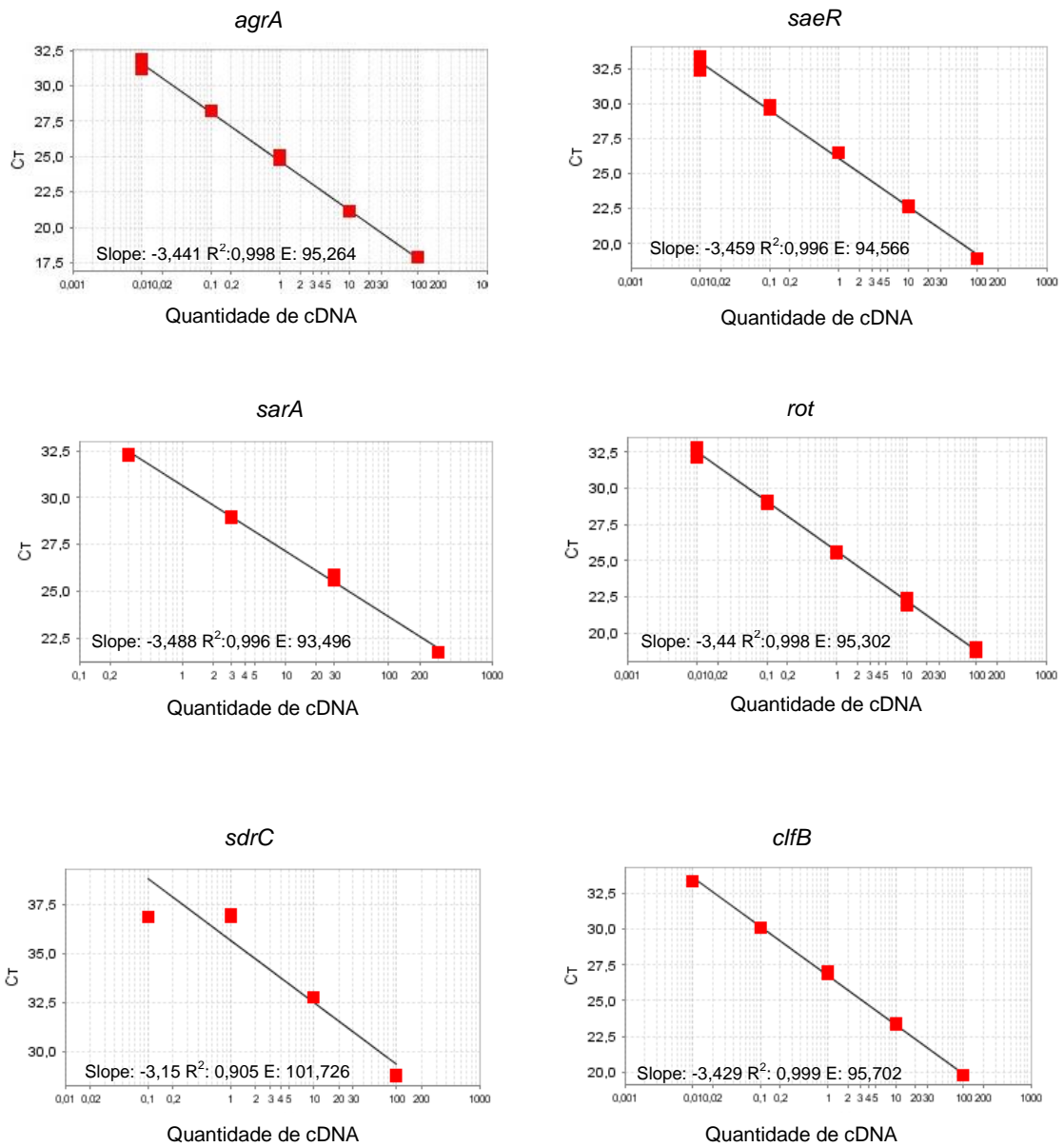


Figura 2A. Curvas de dissociação para os genes avaliados por PCR em tempo real.

**Figura 2A. Continuação**

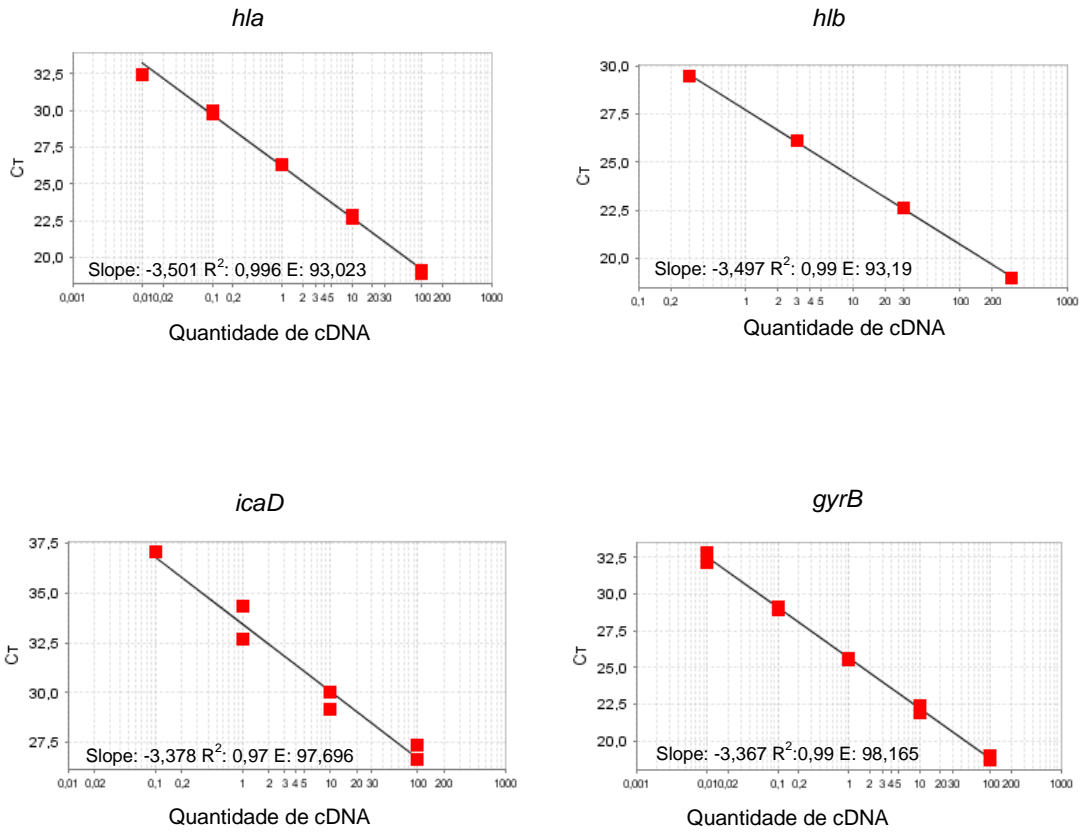


**Figura 2A.** Curvas de dissociação para os genes avaliados por PCR em tempo real.



**Figura 3A.** Eficiência (E) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica por PCR em tempo real

### Figura 3A. Continuação



**Figura 3A.** Eficiência (E) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica por PCR em tempo real