

FRANKLIN GERÔNIMO BISPO SANTOS

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR E DE FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADOS À MASTITE
BOVINA EM PROPRIEDADES DE EXPLORAÇÃO LEITEIRA DOS
ESTADOS DE SÃO PAULO E PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

FRANKLIN GERÔNIMO BISPO SANTOS

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR E DE FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADOS À MASTITE
BOVINA EM PROPRIEDADES DE EXPLORAÇÃO LEITEIRA
DOS ESTADOS DE SÃO PAULO E PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães

São Paulo

2009

RESUMO

Santos FGB. Estudo epidemiológico molecular e de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* associados à mastite bovina em propriedades de exploração leiteira dos estados de São Paulo e Pernambuco [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Um total de 2060 glândulas mamárias de 525 fêmeas em lactação de 11 rebanhos de São Paulo e Pernambuco foi submetido à triagem para diagnóstico de mastite clínica, subclínica e estágio de portador. Foram realizados CCS e lactocultura de todas as glândulas. No acompanhamento do estágio de portador, glândulas negativas às provas de triagem infectadas por *S. aureus* foram submetidas em dias subsequentes ao exame clínico, lactocultura e CCS por 16 dias. Foi realizada análise microbiológica de material de insufladores, pele do úbere, mãos e fossas nasais de ordenhadores. O total de 107 *S. aureus* isolados foi submetido à PFGE, PCR do gene *icaA* e avaliação da produção de biofilme glicose-induzido *in vitro*. Em 96 destes, pesquisou-se por PCR os genes *coa* e *spa*. A ocorrência de mastite subclínica variou de 9,7% a 81,5% entre os rebanhos. A diferença de mastite subclínica entre fazendas de Pernambuco e São Paulo foi significativa ($P < 0,0001$). PFGE identificou 31 perfis genéticos, agrupados em 12 linhagens, a partir dos 107 isolados. As linhagens evidenciadas foram: LE (64,5%), LA (15,9%), LI (5,6%) e outras nove (14%). Entre os isolados de leite houve predomínio de LE ($P < 0,0001$) em relação às demais. Isolados a partir de casos de mastite clínica, subclínica e de glândulas assintomáticas pertenceram à mesma linhagem (LA e LE). O grupo LE apresentou ampla distribuição geográfica, isto é, em 6 rebanhos de ambas as regiões e LA restringiu-se a três fazendas de Pernambuco. Em relação aos perfis genéticos, 87,1% foram detectados exclusivamente em um rebanho, 9,7% em dois e 3,2% em quatro. Três a sete diferentes perfis, agrupados em uma a quatro linhagens, foram diagnosticados em cada uma das fazendas. A PFGE mostrou maior poder discriminatório ($D=0,86$). As técnicas de PCR do gene *coa*, PCR-RFLP do gene *coa* e PCR do gene *spa* distinguiram, respectivamente: quatro perfis genéticos ($D=0,18$), quatro ($D=0,26$) e seis ($D=0,56$). Todas as 96 amostras de *S. aureus* submetidas à PCR para pesquisa dos fatores de virulência (coagulase e

proteína A) amplificaram os genes. O gene *icaA* foi detectado nas 107 amostras. *S. aureus* produtores de biofilme corresponderam a 69,2% dos isolados e 30,8% não produziram. A PFGE detectou três agrupamentos genéticos que apresentaram relação com o fenótipo de produção de biofilme, sendo LE 94,5% das amostras produtoras, concentradas no agrupamento II. Entre os isolados de leite, 76,9% produziram filme biológico. Excetuado um isolado de fossa nasal de ordenhador, os demais 11 de origem extramamária não produziram biofilme. Não foi detectada correlação entre produção de biofilme e CCS. Isolados de origem humana e animal constituíram populações geneticamente distintas. Isolados de mesmo perfil genético de insufladores e do leite refletem o eventual papel do equipamento de ordenha como possível via de transmissão na mastite, assim como a pele do úbere. Houve isolamento sucessivo do perfil E1 por 16 dias de glândulas assintomáticas, caracterizando o estágio de portador. *S. aureus* isolados de quartos portadores majoritariamente produziram biofilme, demonstrando maior capacidade de persistência e disseminação como fonte de infecção.

Palavras-chave: mastite bovina, *S. aureus*, portador, epidemiologia molecular, PFGE e PCR, biofilme.

ABSTRACT

Santos FGB. Molecular epidemiology and virulence factors of *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis in dairy herds from São Paulo and Pernambuco state. [PhD Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Two thousand and sixty mammary glands from 525 lactating cows of eleven dairy herds from São Paulo and Pernambuco were submitted to clinical, subclinical mastitis cases and carrier status detection by screening tests. All the samples were submitted to SCC and microbiological tests. In the carrier status follow up, the screening test negative glands were submitted to clinical examination, SCC and milk culture during at least 16 days. In parallel, milking machine, udder skin, milker's nostrils swabs were collected and submitted to microbiological examination. A total of 107 *S. aureus* isolates was analyzed by PFGE, PCR *spa* gene and *in vitro* glucose-induced biofilm production. From these, 96 isolates were submitted to PCR of the *coa* and *spa* genes. The subclinical mastitis occurrence ranged from 9.7% to 81.5% among the herds. It was observed a significant difference ($P < 0.0001$) between subclinical mastitis occurrence in São Paulo and Pernambuco states. From the 107 isolates, PFGE identified 31 pulsotypes grouped in 12 lineages. Lineages identified were: LE (64.5%), LA (15.9%), LI (5.6%) and, nine others (14%). Among the milk isolates there was predominance of LE ($P < 0.0001$) in relation to the others. A same pulsotype of LA and LE lineages was isolated from clinical and, subclinical mastitis as well as from asymptomatic carrier glands. The LE group was widely spread, i. e. in 6 herds from both states while LA was isolated from three herds only in Pernambuco state. Eighty-seven percent of the pulsotypes were only detected on single herds, 9.7% in two and, 3.2% in four different herds. In a same herd, three up to seven different pulsotypes, grouped in one to four lineages, were detected. PFGE showed higher discriminatory power ($D=0.86$). PCR *coa* gene, RFLP *coa* gene and PCR *spa* gene distinguished, respectively four amplicons ($D=0.18$), four ($D=0.26$) and six ($D=0.56$). All the 96 *S. aureus* isolates submitted to PCR for virulence factors (coagulase and protein A) search amplified the genes. *IcaA* gene was detected in all the 107 *S. aureus* strains and, 69,2% of them produced *in vitro* glucose-induced biofilm. PFGE detected three genetic clusters related to biofilm production

phenotype, being 94.5% LE grouped in the cluster II. It was not detected any correlation between SCC and biofilm production. Just one from the eleven extramammary origin isolated, 76.9% of the milk isolates and, 99% of the *S. aureus* isolated from carriers produced biofilm. Strains from human and animal origin were genetically different. Few isolates from milk, milking machine and udder skin showed similar pulsotype, suggesting a potential role as a transmission route in mastitis epidemiological chain. The successive isolation during more than 16 days of a same pulsotype (E1) from the asymptomatic glands characterized the carrier status. The capability to produce biofilm demonstrated by the majority of the *S. aureus* isolated from asymptomatic mammary glands showed their potential as infection source.

Keywords: bovine mastitis, *S. aureus*, carrier status, molecular epidemiology, PFGE and PCR, biofilm.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A mastite é considerada a principal enfermidade dos animais destinados à produção leiteira, por sua elevada freqüência, pelos aspectos econômicos a ela relacionados - tanto pela diminuição da produção quanto pelo menor rendimento dos derivados lácteos para a indústria de laticínios - e pelos aspectos associados à Saúde Pública, uma vez que o leite pode veicular microrganismos patogênicos, toxinas e resíduos de antimicrobianos (Langoni, 2007).

Essa afecção é uma reação inflamatória da glândula mamária de etiologia infecciosa, traumática, metabólica, fisiológica, alérgica ou psicológica. Entretanto, a mastite infecciosa é considerada a mais importante, por não ser autolimitante e por poder eventualmente evoluir para um quadro de septicemia (Costa, 2003).

Para estabelecer uma infecção, o agente etiológico deve ultrapassar a porção terminal do teto, pois a integridade do teto é a primeira linha de defesa (Nickerson, 1993). Após a penetração, o microrganismo se multiplica no canal galactóforo e atinge a cisterna do teto, onde se multiplica ativamente e se distribui pelo parênquima mamário (Langoni, 2007). A segunda linha de defesa é o sistema imunológico que inclui leucócitos nos ductos do teto e na glândula (White et al., 1980; Harmon e Heald, 1982). Observa-se imediatamente grande aporte de leucócitos polimorfonucleares, particularmente neutrófilos, como resposta do sistema imune. O processo inflamatório intensifica e se observa leve alcalinização da secreção láctea em virtude do extravasamento de líquido celular e íons, a exemplo de carbonato de sódio e cloretos. Ocorrem então, em virtude da grande multiplicação bacteriana: acidificação do leite, produção de toxinas, danos teciduais e presença de secreção purulenta e sangue no leite (Langoni, 2007).

As alterações provocadas pela mastite no tecido mamário não se refletem somente na produção do leite, mas também nas características físico-químicas, com alteração de seus componentes principais. A mastite interfere na composição do leite pela ação de lipases leucocitárias e, em decorrência, a concentração de gordura no leite proveniente de quartos mamários com elevada contagem de células somáticas (CCS) tende a diminuir (Harmon, 1994; Brito e Dias, 1998). De modo geral, o teor de gordura no leite pode variar de 2,2% a 4,0%, percentual fortemente

influenciado pela genética do animal e fatores ambientais. Em animais com mastite, porém, estes valores sofrem decréscimo de 10% (Costa et al., 2006). Recentemente, vários autores também verificaram que as concentrações de caseína, lactose e sólidos totais apresentam relação inversamente proporcional à CCS no leite (Bueno et al., 2005; Costa et al., 2006).

Paralelamente, ocorrem alterações na contagem de células somáticas que variam em função da etiologia e da virulência do agente etiológico envolvido no processo infeccioso (Radostits et al., 2002). As células somáticas compreendem a maioria das células do sistema imune da glândula mamária, na proporção de 80% nos quartos mamários hígidos e 99% nos quartos com mastite. Tais células são constituintes do mecanismo de defesa natural e incluem linfócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e algumas células epiteliais (Sordillo et al., 1997; Pillai et al., 2001; Schukken et al., 2003).

Clinicamente, as mastites podem ser classificadas como clínicas quando apresentam alterações macroscópicas no leite e/ou no úbere. A severidade da mastite clínica pode variar desde uma manifestação clínica subaguda até uma mastite clínica superaguda, na qual ocorre sintomatologia sistêmica, com elevação da temperatura corporal, desidratação, inapetência, sendo possível, em alguns casos resultar em óbito (Chafer, 2006). De sintomatologia não tão evidente, a mastite subclínica se caracteriza pela diminuição da produção leiteira, sem que sejam observados sinais visíveis do processo inflamatório na glândula mamária ou no leite (Costa, 2002).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado a partir do exame criterioso da glândula mamária e da observação de alterações macroscópicas nos primeiros jatos de leite, utilizando-se a caneca de fundo negro ou prova de Tamis. A mastite subclínica, por sua vez, pode ser diagnosticada pelo *California Mastitis Test* (CMT) e pela CCS (Langoni, 2007).

O CMT é capaz de detectar a ocorrência de mastite subclínica pela elevação do número de células somáticas na secreção láctea, particularmente leucócitos polimorfonucleares. De cada quarto mamário coleta-se alíquota de 2 mL de leite e adiciona-se igual volume do detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio + púrpura de bromocresol). Este reagente emulsifica os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite e libera o material genético (DNA) das células, produzindo viscosidade proporcional ao número de células presentes no leite e

categorizada em diferentes escores, de acordo com a intensidade do processo inflamatório (Radostits et al., 1994; Thiers et al., 1999).

Por sua vez, a CCS é um método moderno de diagnóstico da mastite, internacionalmente aceito como critério de avaliação da sanidade da glândula mamária (Middleton et al., 2002; Zecconi et al., 2005; Zecconi et al., 2006). A CCS eletrônica é realizada por citometria de fluxo com auxílio de equipamentos como Somacount IBC (Bentley Instruments Inc.) (Langoni, 2000).

As infecções intramamárias apresentam elevada frequência nos rebanhos leiteiros. Costa et al. (1995) avaliaram o nível de mastite clínica e subclínica em São Paulo e em Minas Gerais na ordem de 17,45% e 71,56%, respectivamente. Em Pernambuco, Mota et al. (1999) demonstraram que o índice de mastite subclínica em alguns rebanhos leiteiros pode chegar até 80% dos quartos mamários, na dependência do tipo de exploração leiteira. Recentemente, Pereira et al. (2007) observaram índices de mastite subclínica em Minas Gerais que variaram de 18,63% a 89,70%, com 54,83% dos rebanhos analisados apresentando taxas superiores a 50%, sendo que em 19,35% os índices foram superiores a 70%. Paralelamente, Ribeiro et al. (2007) monitoraram unidades de produção leiteira no Rio Grande do Sul e diagnosticaram mastite subclínica e clínica em, respectivamente, 31,17% e 1,22% dos quartos mamários avaliados.

Classicamente, os principais agentes etiológicos da mastite foram agrupados quanto à origem e modo de transmissão em contagiosos ou ambientais. Os patógenos considerados ambientais são mais precisamente descritos como microrganismos oportunistas, ubiqüitários, não adaptados à sobrevivência no interior do hospedeiro e presentes no ar, cama (*free stall*, por exemplo), água e fezes. São patógenos causadores de mastite ambiental: *Streptococcus uberis*, membros da família *Enterobacteriaceae* - principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp e *Serratia* sp - *Pseudomonas* sp e outros microrganismos ubiqüitários, a exemplo de fungos - principalmente leveduras e algas aclorofiladas (*Prototheca* sp) (Bradley, 2002; Costa, 2003).

Os patógenos contagiosos são microrganismos particularmente adaptados à sobrevivência no hospedeiro, especialmente na glândula mamária. Eles são capazes de estabelecer infecções subclínicas que se manifestam tipicamente pela elevação na CCS dos quartos mamários infectados e são transmitidos principalmente durante a ordenha (Bradley, 2002; Costa, 2003). Microrganismos do gênero *Staphylococcus*

estão entre os mais freqüentemente isolados em amostras de leite provenientes de vacas com mastite contagiosa, sendo *S. aureus* espécie de elevada ocorrência (Costa et al., 1986).

Staphylococcus aureus é um coco Gram-positivo, catalase negativa, produtor de coagulase. O gênero *Staphylococcus* faz parte da família *Staphylococcaceae* que inclui também os gêneros *Gamella*, *Macrococcus* e *Salinococcus* (Garrity, 2006). Todas as espécies do gênero *Staphylococcus* são produtoras da enzima catalase e se reproduzem por fissão binária em todos os planos espaciais. A divisão celular em vários planos espaciais resulta num agrupamento de células bacterianas em conformações que lembram cachos de uvas, característica especialmente evidente em células cultivadas *in vitro* e observadas por microscopia óptica (Trabulsi et al., 2004).

As espécies do gênero *Staphylococcus* são anaeróbias facultativas, conseguem crescer em meios hipertônicos (em concentrações de até 15% de NaCl), num variado espectro de pHs (de 4,2 a 9,3) e em temperaturas entre 7° C e 48,5 °C (Le Loir et al., 2003). Quanto ao *habitat*, as espécies deste gênero encontram-se amplamente distribuídas no ambiente e como microbiota autóctone de seres humanos e animais (Kloos e Bannerman, 1999).

S. aureus é um microrganismo de grande importância clínica para humanos, uma vez que é causa comum de diversos processos infecciosos que variam desde infecções cutâneas crônicas relativamente benignas, até infecções humanas potencialmente fatais. As infecções cutâneas incluem foliculite simples e impetigo, assim como furúnculos e carbúnculos, que afetam o tecido subcutâneo e produzem sintomas sistêmicos como febre. *S. aureus* é frequentemente isolado de feridas cirúrgicas infectadas que podem representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas, assim como é a causa de broncopneumonias e pneumonias nosocomiais, bacteremias, meningites e peritonites, entre outras afecções (Koneman et al., 2001).

Algumas cepas de *S. aureus* produzem toxinas responsáveis por intoxicações alimentares (algumas enterotoxinas), pela síndrome do choque tóxico (TSST-1 e algumas enterotoxinas) e pela síndrome da pele escaldada (toxinas exfoliativas). Resistência múltipla a agentes antimicrobianos tem sido observada entre isolados desse microrganismo, principalmente entre aqueles responsáveis por infecções nosocomiais (Salyers e Whitt, 2002). No Brasil já foram detectadas amostras de

Staphylococcus produtoras de enterotoxinas isoladas de casos de mastite bovina. Brabes et al. (1999) avaliaram 87 isolados de casos de mastite procedentes de propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais e identificaram 18% (16/87) dos isolados como produtores de pelo menos uma enterotoxina, sendo *S. aureus* 10 (62,5%), *S. sciuri* 5 (31,25%) e *S. chromogenes* 1 (6,25%). Dentre estes 16 isolados produtores de enterotoxina, 6 (37,5%) produziram mais que uma toxina simultaneamente.

S. aureus também é um importante agente etiológico de infecções em animais domésticos de companhia e de animais destinados à produção de alimentos (Aarestrup et al., 2000; Zadoks et al., 2000). Esse microrganismo constitui-se no agente bacteriano mais comumente isolado de casos de mastite bovina, sendo apontado pela *International Dairy Federation* como patógeno principal (Langoni, 1999). No Brasil, estudo conduzido por Brito et al. (1999) em propriedades de exploração leiteira do estado de Minas Gerais detectou *S. aureus* em 19,2% das amostras de leite de quartos mamários de vacas em lactação. Rabello et al. (2003), por sua vez, obtiveram o isolamento deste patógeno em 5,5% a 79,4% dos quartos mamários avaliados no estado do Rio de Janeiro, dependendo da propriedade analisada. Mais recentemente, estudo conduzido por Gomes et al. (2007) em 21.721 amostras de secreção láctea procedentes do estado do Rio Grande do Sul identificou a presença de *S. aureus* em 29,2% dos isolados, enquanto que Hartman et al. (2007) isolaram esse microrganismo em 11,8% dos casos de mastite diagnosticados no estado de São Paulo.

A prevalência de mastite por *S. aureus* em rebanhos leiteiros ocorre devido à sua alta infectividade associada a fatores de virulência que conferem ao microrganismo a capacidade de se instalar no parênquima mamário, formar microabscessos, resistir à fagocitose e sobreviver no interior de fagócitos, restringindo, dessa forma, o acesso dos agentes antimicrobianos, mesmo quando administrados em concentrações terapêuticas (Araújo e Andrioli, 1996).

A antibioticoterapia, por sua vez, visa auxiliar as defesas do hospedeiro eliminando patógenos (Erskine et al., 1993). O sucesso terapêutico pode ser medido tanto pela redução dos sintomas clínicos da mastite (cura clínica) quanto pela eliminação do patógeno (cura microbiológica), porém a eficácia de um tratamento é obtida quando se observa simultaneamente cura clínica e microbiológica (Costa, 2002).

A administração intramamária de antibióticos é o método mais freqüentemente utilizado no tratamento da mastite bovina (Costa, 2002). O tratamento imediato dos casos de mastite clínica e o tratamento no período seco dos casos subclínicos estão entre as medidas mais frequentemente recomendadas no controle das mastites. Adicionalmente, várias outras medidas devem ser levadas em consideração quando da implementação de protocolos de controle da enfermidade, como lavagem e secagem dos tetos antes da ordenha, manutenção regular dos equipamentos de ordenha mecânica, antissepsia pós-ordenha, descarte das fêmeas com infecção crônica e ordenha no final para as vacas infectadas (Philpot, 1984; Gill et al., 1990; Morin, 1993; Degraives e Fetrow, 1993; Kirk et al., 1994; Costa et al., 2003).

Na mastite contagiosa, a transmissão de *S. aureus* ocorre, principalmente, durante a ordenha. A prevalência da mastite por esse patógeno se deve à sua dispersão por várias vias de transmissão e fontes de infecção na propriedade leiteira, como equipamentos de ordenha, ração animal, cama e materiais da baia, pele bovina e humana, vacas cronicamente infectadas e glândulas mamárias de portadoras assintomáticas, além de outros animais da fazenda (Costa et al., 1994; Roberson et al., 1994, Zecconi e Piccinini, 1999; Radostits et al., 2002; Zadoks et al., 2002).

As estratégias de controle das mastites baseiam-se em medidas preventivas, tratamento imediato dos casos clínicos e tratamento no período seco de casos subclínicos, sendo o portador um elemento que não é usualmente considerado (Costa et al., 1992; Costa et al., 1994). O estágio de portador na mastite infecciosa é caracterizado pela ocorrência de quartos mamários destituídos de sintomatologia, embora estejam infectados, alberguem o microrganismo na glândula mamária e o disseminem pelo leite. Esses quartos mamários não apresentam reações positivas aos testes diagnósticos que detectam a presença do processo inflamatório (como CMT, condutibilidade elétrica e CCS entre outros), porém mostram-se positivos aos exames microbiológicos, caracterizando-se como uma fonte de infecção, principalmente em relação aos agentes contagiosos como *Staphylococcus* spp (Costa et al., 2001; Costa et al., 2005; Bispo et al., 2008; Santos et al., 2008a,b).

Protocolos de controle da mastite causada por *S. aureus* têm apresentado sucesso relativamente limitado, provavelmente pelo conhecimento insuficiente sobre os fatores de virulência relacionados ao processo de infecção e sobre a importância

das diferentes vias de transmissão, fontes de infecção, vetores e mecanismos de dispersão (Struelens et al., 1992).

A maioria dos fatores de virulência de *S. aureus* não é requerida para o crescimento e multiplicação do microrganismo e é frequentemente codificada por elementos genéticos acessórios, tais como plasmídeos, profagos e ilhas de patogenicidade (Kuroda et al., 2001). O carregamento por elementos genéticos acessórios implica na distribuição de genes de virulência entre cepas de *Staphylococcus*, causando uma distribuição não uniforme de determinantes genéticos de virulência entre as cepas. Há várias linhagens de *S. aureus* que apresentam combinações específicas de genes que conferem uma habilidade significativamente aumentada de causar infecções (Booth et al., 2001).

Dentre os diversos potenciais fatores de virulência descritos até o momento para *S. aureus*, a produção de biofilme constitui um aspecto relativamente pouco estudado em amostras procedentes de casos de mastite bovina. O biofilme consiste em comunidades de células bacterianas envolvidas por uma matriz polissacarídica produzida pelas bactérias que permanecem aderentes a superfícies inertes ou vivas. A formação do biofilme parece ocorrer em duas etapas: adesão da bactéria a uma superfície e adesão intercelular, formando múltiplas camadas de células bacterianas (Götz, 2002).

Dois importantes componentes de superfície têm sido implicados na formação do biofilme por *S. aureus*. Um destes componentes depende da presença do *operon icaADBC*, que codifica proteínas envolvidas na síntese do polissacarídeo de matriz poli-*N*-sucinil β -1,6 glucosamina (PNSG). Este polissacarídeo está envolvido na ligação entre as células bacterianas. Proteínas também estão envolvidas na formação de biofilme em *S. aureus* (O'Neil et al., 2007). Dentre estas proteínas, a Bap foi associada à formação de filme biológico em amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Tal proteína parece promover a ligação primária às superfícies. Outras proteínas que, como a Bap, pertencem ao grupo, as chamadas MSCRAMMs (componentes da superfície microbiana que reconhecem as moléculas adesivas da matriz) também têm sido associadas à formação do biofilme em *S. aureus* de origem humana (O'Neil et al., 2007). Dentre tais proteínas podemos citar as proteínas de ligação à fibronectina de *S. aureus* (FnbpA e B) (O'Neil et al., 2008), a proteína G de superfície de *S. aureus* (SasG) (Corrigan et al., 2007) e a proteína A (Merino et al., 2008).

Há um consenso de que o biofilme contribua para a persistência bacteriana em sítios infecciosos ou para infecções crônicas, pois dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos. Além disso, o biofilme confere maior capacidade de ligação dos microrganismos às diferentes superfícies, a exemplo de biomateriais utilizados em cirurgias, favorecendo o desenvolvimento de determinadas infecções (Cramton et al., 1999; Cucarella et al., 2001).

Em infecção experimental de glândulas mamárias de ovinos, amostras de *S. aureus* foram capazes de produzir biofilme e apresentaram maior capacidade de colonização quando comparadas a variantes não produtoras deste material (Baselga et al., 1993). O papel do biofilme na aderência de amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina também foi observado em cultura de células, o que fornece evidências de seu possível papel na colonização da glândula mamária. A adesão de *S. aureus* ao epitélio glandular mamário é considerada a primeira etapa crítica na patogênese da mastite (Aguilar et al., 2001; Vasudevan et al., 2003).

A maioria das cepas de *S. aureus* causadoras de mastite é circundada por uma camada de biofilme que auxilia a colonização do microrganismo e sua aderência ao epitélio da glândula mamária (Aguilar et al., 2001). A susceptibilidade reduzida aos antibióticos em *S. aureus* isolados de mastite também foi associada à formação de biofilme e atribuída à redução tanto da difusão dos antibióticos através da matriz de biofilme como da atividade metabólica da bactéria dentro dessa matriz (Amorena et al., 1999).

Foi sugerido inicialmente que a formação de biofilme ocorreria por um processo mediado por um antígeno capsular denominado polissacarídeo/adesina (PS/A), no qual o *S. aureus* inicialmente adere a uma superfície, multiplica-se e forma uma multicamada de biofilme que é associada à produção de adesina polissacarídica intercelular (PIA). O operon de adesão intercelular (*icaADBC*) constituído pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, codifica as proteínas mediadoras da síntese de PIA e PS/A (Cramton et al., 1999). Os genes *icaA* e *icaD* exercem importante papel na formação do biofilme em *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O gene *icaA* codifica a *N*-acetilglicosaminiltransferase, enzima envolvida na síntese de *N*-acetilglicosamina (Arciola et al., 2001a). Além disso, o gene *icaD* influi consideravelmente na expressão máxima da *N*-acetilglicosaminiltransferase, levando à expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (Gerke et al., 1998).

Entretanto, biofilme independente do operon *ica* foi descrito em amostras de *S. aureus* (O'Neil et al., 2007). A ação de proteases foi capaz de eliminar totalmente o biofilme produzido em mutantes nocautes em *ica*, apontando assim um papel essencial para as proteínas de superfície estafilocócica neste processo (O'Neil et al., 2007; Coelho et al., 2008).

S. aureus produz vários potenciais fatores de virulência, inclusive proteínas de superfície celular ancoradas na parede celular, com propriedades de ligação a diferentes proteínas do hospedeiro. Dentre estas, a proteína A, uma molécula de 42 kDa que, apresentando-se sob as formas secretada e associada à membrana, interage com ampla variedade de imunoglobulinas humanas e animais (El Sayed et al., 2006)

As propriedades de ligação da proteína A à imunoglobulina G (IgG) decorrem da presença de cinco (em algumas cepas, quatro) unidades repetidas (A-E), cada uma com habilidade de mediar ligação à porção Fc de diferentes subclasses de IgG de mamíferos (Navarre e Schneewind, 1999). Além disso, cada uma das unidades repetidas apresenta afinidade pela porção Fab da IgG, que é responsável pelo reconhecimento antigênico, de forma não antigênico-específica (Boyle, 1990).

A proteína A encontra-se ligada ao glicopeptídeo da parede celular e pode ser liberada para o meio durante o crescimento. Essa proteína atua como fator de virulência, interferindo na opsonização e na ingestão pelos leucócitos polimorfonucleares, ativando o complemento e estimulando reações de hipersensibilidade dos tipos imediato e tardio. A proteína A é imunogênica e nos indivíduos com infecções graves causadas por *S. aureus* são formados anticorpos dirigidos contra ela. A presença dessa proteína em *S. aureus* constitui a base das provas de coaglutinação utilizadas em laboratórios clínicos para identificação de microrganismos (a exemplo de gonococos) e detecção de antígenos bacterianos em líquidos corpóreos (Koneman et al., 2001).

Estudos realizados por Peterson et al. (1977) e Gemmell et al. (1991) indicaram que a expressão da proteína A na superfície bacteriana torna o microrganismo menos susceptível à fagocitose na presença do soro humano, possivelmente como resultado da propriedade de ligação da proteína A à porção Fc da IgG. Entretanto, na presença de soro deficiente de IgG, a expressão da proteína A apresentou efeito oposto, pois aumentou a susceptibilidade da bactéria à fagocitose (Peterson et al., 1977).

O efeito da proteína A sobre o complemento foi investigada em vários estudos (Spika et al., 1981; Kozlowski et al., 1996). Kozlowski et al. (1996) mostraram que a propriedade de ligação da proteína A à porção Fab da IgG medeia a ativação do sistema complemento pela via clássica, permitindo uma possível explicação para a observação realizada por Peterson et al. (1977), o qual havia sugerido que o aumento da susceptibilidade à fagocitose por *S. aureus* que expressa a proteína A em meio deficiente de IgG poderia resultar da interação entre a proteína A e a IgM.

Vários estudos relataram que a proteína A ativa linfócitos B (Forsgren et al., 1976; Lipsky, 1990). A proteína A ligada à parede celular induziu sozinha a ativação dos linfócitos B, enquanto a proteína A solúvel foi inativa neste aspecto ou necessitou do auxílio de linfócitos T (Lipsky, 1990; Schuurman et al., 1980). Além disso, Ringden e Rynnel (1978), Schuurman et al. (1980) e Romagnani et al. (1984) observaram que a proteína A solúvel aumentou a atividade mitogênica dos linfócitos T, embora esta propriedade tenha sido atribuída por outros pesquisadores à contaminação da proteína A solúvel disponibilizada comercialmente com enterotoxinas estafilocócicas (Schrezenmeier e Fleischer, 1987; Das e Langone, 1989).

A tipagem epidemiológica utilizando a proteína A constitui um método baseado na diversidade do gene *spa* que codifica a região Xr da proteína A (Frénay et al., 1994). Enquanto a porção N-terminal da proteína A encontra-se envolvida na ligação com a porção Fc da IgG, o domínio C-terminal, associado à ligação com a parede celular, contém a região Xr, constituída por sequências repetitivas em *tandem* formadas por oito unidades de aminoácidos (Uhlén et al., 1984; Guss et al., 1984). O número de unidades repetitivas na região Xr varia entre as amostras de *S. aureus*, podendo ser determinado pela amplificação do DNA dessa região pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Kobayashi et al., 1999).

A coagulase é um produto extracelular dos isolados de *S. aureus* que apresenta a propriedade de coagular o plasma de diferentes espécies. Esta característica constitui o principal critério utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica na identificação de *S. aureus* isolados de infecções (Goh et al., 1992).

A coagulase se liga à protrombina formando um complexo denominado estafilotrombina, que pode clivar o fibrinogênio, potencializando a formação do coágulo. Nenhuma atividade enzimática foi associada à coagulase, sendo a ligação à protrombina suficiente para a expressão da clivagem do fibrinogênio (Hempker et

al., 1975). A coagulase também pode se ligar ao fibrinogênio e, em virtude desta propriedade, sugeriu-se que esta atividade era responsável pela agregação de *S. aureus* ao plasma (Jeljaszewicz et al., 1983). Entretanto, estudos moleculares indicaram que a coagulase não é um fator de agregação. Ambas as propriedades de ligação da coagulase são localizadas em dois sítios distintos da proteína. A região N-terminal contém o sítio de ligação à protrombina e a região C-terminal apresenta o sítio de ligação ao fibrinogênio (McDevitt et al., 1992).

Várias formas sorológicas da coagulase baseadas na neutralização cruzada da atividade de coagulação foram descritas. As sequências de DNA de três sorotipos foram determinadas (Kaida et al., 1987; Kaida et al., 1989; Phonimdaeng et al., 1990) e a análise da sequência do gene *coa* mostrou que a região N-terminal apresentou-se variável (aproximadamente 50% de identidade entre as três sequências) e que houve uma região central altamente conservada (identidade superior a 90%). A região C-terminal mostrou-se composta de repetições em *tandem* de 27 aminoácidos e cada uma das sequências publicadas apresentou número diferente de repetições. A amplificação das repetições, seguida pela digestão com a endonuclease de restrição *AluI*, produziu padrões de bandas, indicando que este achado poderia ser utilizado para diferenciar isolados (Goh et al., 1992; Hookey et al., 1998; Schwartzkopf et al., 1994).

Desde então, esta característica tem sido utilizada para subtipar *S. aureus* de origem humana e bovina. O método da tipagem pelo gene da coagulase (*coa*) mostrou-se simples, específico, reprodutível, de fácil interpretação e discriminatório (Goh et al., 1992; Annemüller et al., 1999; Lange et al., 1999; Raimundo et al., 1999; Shopsin et al., 2000; Schlegelova et al., 2003; Guler et al., 2005; Saei et al., 2009).

Sob o ponto de vista epidemiológico, é importante determinar a origem dos microrganismos envolvidos na etiologia da doença e, em virtude da existência de diversos clones de *S. aureus*, os isolados devem ser tipados a fim de se estabelecer fontes e rotas de distribuição do patógeno na população (Struelens et al., 1992).

O objetivo dos estudos de genotipagem é fornecer evidências laboratoriais de que agentes etiológicos epidemiologicamente relacionados, ou seja, coletados durante um período determinado de tempo e em uma área geográfica específica, também seriam geneticamente relacionados e, assim, representariam uma mesma cepa que se disseminou (Tenover et al., 1995). Em relação à mastite bovina, a caracterização da diversidade genética dos *S. aureus* isolados de rebanhos leiteiros

é fundamental para uma melhor compreensão do padrão de dispersão do patógeno. Tais informações poderão auxiliar na elaboração de estratégias mais eficientes que visem à redução dos casos de infecção, uma vez que a partir dos perfis moleculares é possível inferir relações genéticas existentes entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção no rebanho (Kapur et al., 1995).

O cromossomo se constitui no componente fundamental da identidade celular e, portanto, representa item indispensável à análise de relações genéticas entre isolados. Uma abordagem frequentemente utilizada para esta finalidade tem sido a digestão do DNA cromossomal com enzimas de restrição, a qual resulta em uma série de fragmentos de diversos tamanhos que forma diferentes padrões quando analisados por eletroforese em gel de agarose. Diferenças nesses padrões são denominadas de polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs) (Singh et al., 2006).

As enzimas utilizadas para clivar frequentemente o DNA reconhecem vários sítios presentes no cromossomo bacteriano, resultando em vários fragmentos de bandas. Recentemente, enzimas de restrição que clivam o cromossomo menos frequentemente têm sido utilizadas. Os fragmentos de DNA resultantes são excessivamente grandes para serem separados por eletroforese convencional e, em virtude deste aspecto, métodos alternativos denominados de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) têm sido empregados para superar este obstáculo (Schwartz et al., 1983; Schwartz e Cantor, 1984; Carle et al., 1986; Sambrook et al., 1989; Finney, 1993; Ausubel et al., 1994; Chang e Chui, 1998).

Métodos moleculares estão sendo desenvolvidos e têm sido utilizados na identificação e comparação de *S. aureus* em estudos epidemiológicos (Gürtler e Barrie, 1995; Hookey et al., 1998; Lange et al., 1999; Su et al., 1999; van Leeuwen et al., 1999; Pereira et al., 2002; Zadoks et al., 2002). Dentre esses métodos, a análise de macrorrestrição do DNA cromossômico e separação dos fragmentos pela técnica de PFGE é, por sua vez, a ferramenta de tipagem de maior poder discriminatório para *S. aureus* e um bom método para se estabelecerem relações clonais em estudos epidemiológico-moleculares (Tenover et al., 1995; Zadoks et al., 2002; Sommerhäuser et al., 2003). A sensibilidade do método de PFGE é tão elevada que simples mutações ou rearranjos podem ser muitas vezes detectados (Hall, 1994).

Na PFGE, padrões de restrição de genomas bacterianos completos são analisados e comparados. O cromossomo bacteriano é digerido por uma endonuclease de restrição de corte raro, com o objetivo de produzir um número moderado de fragmentos de DNA. Para proteger o DNA bacteriano de danos mecânicos, os microrganismos são imobilizados pela mistura da suspensão bacteriana em agarose fundida antes da lise celular. Os blocos contendo DNA purificado e digerido são inseridos em géis de agarose e os fragmentos de DNA separados por eletroforese em campo pulsado, no qual a orientação do campo elétrico sofre alternância (Lukinmaa et al., 2004). Na eletroforese convencional, moléculas de DNA com tamanho superior a 40-50 kb não migram eficientemente em géis de agarose. Através da mudança periódica da direção do campo elétrico no qual o DNA é separado, a PFGE permite a separação de fragmentos superiores a 1000 kbp de comprimento (Singh et al., 2006).

Para interpretar os padrões de restrição gerados pela PFGE e transformá-los em informação epidemiologicamente útil, o microbiologista deve compreender como comparar padrões e como eventos genéticos aleatórios podem alterá-los (Singh et al., 2006). Critérios propostos por Tenover et al. (1995) têm sido frequentemente utilizados na interpretação de padrões de restrição gerados pela PFGE, a fim de determinar relações genéticas entre isolados. De acordo com estas diretrizes, isolados que apresentam o mesmo perfil de PFGE são considerados indistinguíveis. Isolados que sofreram um único evento genético apresentam de uma a três bandas de diferença e são considerados provavelmente relacionados. Isolados que diferem por quatro a seis bandas (geradas por dois eventos genéticos independentes) são considerados possivelmente relacionados. Por fim, consideram-se não relacionados aqueles que diferem em mais de seis bandas.

Faz-se necessário destacar que tais critérios são aplicáveis apenas à análise de um pequeno conjunto de isolados obtidos em estudos epidemiológicos de surtos nosocomiais ou em comunidades, durante um período relativamente curto de tempo (um a três meses) (Tenover et al., 1995), onde presumivelmente, a variabilidade genética é limitada (Olive e Bean, 1999). Estes critérios não são aplicáveis ao estudo de grandes coleções bacterianas de microrganismos coletados em períodos superiores a um ano (Tenover et al., 1995).

Frequentemente, análises de padrões de PFGE são efetuadas utilizando-se *softwares* como BioNumerics. Rementeria et al. (2001) compararam resultados de

três *softwares* com a análise visual e observaram que cada método produziu resultados aceitáveis. Enquanto a análise visual de um pequeno número de perfis genotípicos pode ser realizada, os *softwares* apresentam capacidade de normalização dos perfis obtidos em diferentes géis e de estocagem dos dados em bancos de dados, permitindo comparação de vários perfis no decorrer do tempo. A maioria dos programas de análise também contém algoritmos que permitem realizar análises filogenéticas, proporcionando a detecção da evolução da amostra analisada e das relações ancestrais entre os isolados (Dice, 1945; Fitch e Margoliash, 1967; Backeljau et al., 1996; Jorgensen et al., 1996). Geralmente, amostras são consideradas idênticas se mostrarem 100% de similaridade e são consideradas clonalmente relacionadas se apresentarem similaridade superior a 80%. O dendrograma ilustra relações filogenéticas e proporciona uma representação visual de linhagens, similaridades e diferenças genéticas entre grupos (Singh et al., 2006).

CONCLUSÕES

A técnica de PFGE apresenta maior poder discriminatório quando comparada às demais técnicas de tipagem baseadas em PCR, mesmo quando utilizadas conjuntamente, o que a ratifica como a técnica considerada padrão-ouro. Por ela observou-se considerável multiplicidade de clones de *S. aureus* dentro dos rebanhos, uma vez que foram diagnosticados três a sete diferentes perfis genéticos, agrupados em uma a quatro linhagens, em cada uma das fazendas analisadas.

Algumas das linhagens de *S. aureus* evidenciadas por PFGE apresentaram ampla distribuição geográfica, considerando-se os rebanhos e as regiões estudadas. Entre as diferentes linhagens de *S. aureus* detectadas, um pequeno número foi responsável pela maioria dos casos de mastite. A linhagem (LE) caracterizou-se como predominante e amplamente disseminada tanto entre rebanhos localizados na mesma região, quanto em regiões geograficamente distintas.

Não foi detectada correlação entre linhagens de PFGE e CCS. Ao se compararem os dois perfis genéticos, pertencentes à linhagem predominante, com maior frequência de isolamento, observou-se diferença quanto à capacidade de elidir o processo inflamatório aferido pela CCS.

Ao se analisar um mesmo perfil genético de *S. aureus*, verificou-se que este foi isolado a partir de diferentes intensidades do processo inflamatório - mastite clínica e subclínica – e a partir do leite de glândulas portadoras assintomáticas. Esses fatos permitiram concluir que, em relação à mastite por *S. aureus*, a intensidade do processo inflamatório não está restrita aos fatores de virulência próprios do patógeno, mas também, como verificado em outras afecções, à interação parasita – hospedeiro.

O isolamento de *S. aureus* pertencente ao mesmo perfil genético em insufladores e a partir de amostras de leite reflete o papel do equipamento de ordenha como possível via de transmissão na mastite bovina no rebanho. O mesmo pode ser inferido em relação à pele do úbere.

Isolados de *S. aureus* de origem humana e animal constituíram populações geneticamente distintas, portanto, no presente estudo, não se obteve evidências de transmissão cruzada a partir de portadores humanos.

Caracterizou-se o estágio de portador assintomático de *S. aureus* na mastite bovina com base em evidências epidemiológico-moleculares, uma vez que houve sucessivo e repetido isolamento de um mesmo perfil genético (E1) da mesma glândula mamária por intervalo de tempo prolongado.

Observou-se multiplicidade de perfis dos genes que codificam a produção de coagulase e proteína A entre as amostras de *S. aureus* avaliadas.

A análise de produção *in vitro* de biofilme glicose-induzido permitiu que fossem evidenciados três agrupamentos genéticos gerados por PFGE que apresentaram relação com o fenótipo da produção de biofilme, sendo que cerca de 95% das amostras produtoras de biofilme pertenceram à linhagem LE e se concentraram num mesmo agrupamento (*cluster* II).

Não foi detectada correlação entre produção de biofilme e a CCS de glândulas infectadas por diferentes linhagens de PFGE.

A presença do locus *ica* em todos os isolados de *S. aureus* procedentes de casos de mastite confirma seu potencial papel como fator de virulência na patogênese da mastite em bovinos.

A habilidade de formação de biofilme confere maior capacidade de aderir-se com eficiência ao epitélio secretor glandular, de colonizá-lo, assim como de estabelecer infecções persistentes, o que justificaria a maior infectividade e maior capacidade de dispersão, inter e intrarrebanhos, determinando verdadeiros surtos como verificado pelo perfil E1 em uma das fazendas estudadas.

A constatação de que quartos mamários portadores assintomáticos foram predominantemente infectados por *S. aureus* fortemente produtores de biofilme,

justifica plenamente a persistência desses perfis genéticos nas glândulas mamárias e reforça a tese de que a produção de biofilme não confere uma maior patogenicidade. Há, portanto, necessidade da realização de estudos sobre outros fatores de virulência associados à patogenia da mastite causada por este microrganismo.

Glândulas mamárias portadoras assintomáticas representam importante fonte de infecção de *S. aureus* com capacidade de formar filme biológico e permitem a persistência do patógeno no rebanho, impossibilitando sua erradicação em fazendas onde se utiliza CMT e CCS como ferramentas de diagnóstico e controle de mastite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. Can J Vet Res. 1995;59:124-8.

Aarestrup FM, Agerso Y, Ahrens P, Jorgensen JCO, Madsen M, Jensen LB. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. Vet Microbiol. 2000;74:353-64.

Aguilar B, Amorena B, Iturralde M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. Vet Microbiol. 2001;78:183-91.

Aires-de-Sousa M, Parente CESR, Vieira-da-Motta O, Bonna ICF, Silva DA, de Lencastre H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Appl Environ Microbiol. 2007;73:3845-9.

Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. The predominant variant of the brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. J Infect Dis. 2005;192:801-10.

Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart JL, Hernandez-Yago, J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. J Antimicrob Chemother. 1999;44:43-55.

Annemüller C, Lämmle C, Zschöck, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Vet Microbiol. 1999;69:217-24.

Araújo MLC, Andrioli JL. *Staphylococcus aureus* resistance patterns to antimicrobial and penicillinase among strains isolated from apparently lactating cows. Braz J Microbiol. 1996;1:60-63.

*** De acordo com:**

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

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

Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagn Mol Pathol.* 2001b;10:130-7.

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

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K., editors. *Current protocols in molecular biology.* New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; 1994.

Backeljau T, De Bruyn L, De Wolf H, Jordaens K, Van Dongen S, Winnepenninckx B. Multiple UPGMA and neighbor-joining trees and the performance of some computer packages. *Mol Biol Evol.* 1996;13:309-13.

Baselga R, Albizu I, De La Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun.* 1993;61:4857-62.

Beeken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun.* 2003;71:4206-11.

Bispo F, Rivera ING, Arcaro JRP, Rey CMA, Costa EO. *Staphylococcus aureus* carriers: epidemiological molecular evidence on asymptomatic bovine mammary glands. In: *International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections*; Cairns. 2008. South Perth: Australian Society for Antimicrobials; 2008. p.XX.

Booth MC, Pence LM, Marasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun.* 2001;69:345-52.

Boyle MDP. The type I bacterial immunoglobulin-binding protein: Staphylococcal protein A In: Boyle, editor. *Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins, Microbiology, Chemistry, and Biology.* San Diego CA, USA: Academic Press; 1990. vol 1, p. 17-28.

Brabes KCS, Carvalho EP, Dionísio FL, Pereira ML, Garino Jr F, Costa EO. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Napagama*. 1999;3:4-11.

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

Brito JRF, Dias JC. A qualidade do leite. Juiz de Fora: Embrapa/Tortuga; 1998. 98.

Brito MAVP, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. Padrão de infecção de intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1999;51:129-35.

Brouillette E, Hyodo M, Hayakawa Y, Karaolis DKR, Malouin F. 3',5'-Cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49, 3109-13.

Bueno VFF, Mesquita AJ, Nicolau ES, Oliveira AN, Oliveira JP, Neves RBS, Mansur JRG, Thomaz LW. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no estado de Goiás. *Ciênc Rural*. 2005;35:848-54.

Buzzola FR, Quelle L, Gomez, MI, Catalano M, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Denamiel G, Sordelli DO. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol Infect*. 2001;126:445-52.

Cabral KG, Lämmler C, Zschöck M, Langoni H, de Sá, MEP, Victória C, da Silva AV. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can J Microbiol*. 2004;50:901-9.

Carle GF, Frank M, Olson MV. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*. 1986;232:65-68.

Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol*. 2007;391:127-144.

Cerca N, Jefferson KK, Oliveira R, Pier GB, Azeredo J. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect Immun*. 2006;74;4849-55.

Chafer M. Tendências e avanços do agronegócio do leite nas Américas: produção primária. In: Congresso Panamericano do Leite; 2006; Porto Alegre. Montevideu: Fepale; 2006. 128.

Chambers ST, Peddie B, Pithie A. Ethanol disinfection of plastic-adherent microorganisms. *J Hosp Infect.* 2006;63:193-6.

Chang N, Chui L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;31:275-9.

Cho S-H, Naber K, Hacker J, Ziebuhr W. Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2002;19:570-5.

Christensen GD, Baddour LM, Simpson WA. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun.* 1987;55:2870-7.

Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN, Nickerson SC, Marquardt WW. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 1994;77:970-83.

Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2007;121:1-17.

Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimarães MA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. *agr* RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 2008;154:3480-90.

Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology.* 2007;153:2435-46.

Costa EO, Coutinho SD, Castilho W, Teixeira CM, Gambale W, Gandra CRP. Etiologia bacteriana da mastite bovina no estado de São Paulo, Brasil. *Braz J Microbiol.* 1986; 17:107-12.

Costa EO, Abe SY, Mascoll R, Oliveira PLI, Viani FC, Hirata AN, White CR. Avaliação do estágio de portador na epidemiologia da mastite infecciosa bovina. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1992; Curitiba. Curitiba: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária;1992. p.XX.

Costa EO, Viani FC, Mascoli R, Oliveira PLJ, Hirata AN, White CR. Evaluation of the carrier in the epidemiology of infectious bovine mastitis. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1993;30:86.

Costa EO, Viani FC, White CR, Abe S, Lopes VCA. Importância do portador na dinâmica da infecção intramamária. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1994; Olinda. Olinda: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 1994. p. 239.

Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Watanabe ET, White CR, Pardo RB. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Rev Bras Med Vet.* 1995;17:215-17.

Costa EO. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. *Rev Educ Contin CRMV-SP.* 1998;1:3-9.

Costa EO, Garino-Júnior F, Watanabe ET, Silva JAB, Ribeiro AR, Horiuti AM. Patógenos de mastite bovina isolados de glândulas mamárias negativas aos Testes de Tamis e CMT. *Napgama.* 2001;4:12-6.

Costa EO. Uso de antimicrobianos na mastite. In: Spinosa HS, Gorniak SL, Bernardi M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. cap 42; p. 443-55.

Costa EO. Mastite: fatores de resistência. *Napgama.* 2003;6:24-6.

Costa EO, Ribeiro AR, Garino-Júnior F, Silva JAB, Watanabe ET, Deblire E, Leão EF. Portador: um importante elo na epidemiologia da mastite infecciosa bovina. *Napgama.* 2005;8:3-6.

Costa EO, Santos FGB, Mármore C, Arcaro J, Peres AAC, Raia R. Influência da intensidade da mastite subclínica por microrganismo do gênero *Staphylococcus* estimada pelos escores de CMT, CCS e na composição do leite: gordura, proteína e lactose. *Napgama.* 2006;9:13-8.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284:1318-22.

Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 1999;67:5427-33.

Cruz RS. Análise do efeito do locus *agr* sobre a formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap a, *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001;183:2888-96.

Cucarella C, Tormo MA, Úbeda C, Trotonda MPilar, Monzón M, Peris CI, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2004;72:2177-85.

Das C, Langone JJ. Dissociation between murine spleen cell mitogenic activity of enterotoxin contaminants and anti-tumor activity of Staphylococcal protein A. *J Immunol*. 1989;42:2943-48.

Degraves FJ, Fetrow J. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1993;9:421-34.

Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 1945;26:297-302.

Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J*. 2000;46:S47–S52.

Duthie ES, Lorenz LL. Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol*. 1952;6:95-107.

El-Sayed A, Alber J, Lämmle C, Abdulmawjood A, Zschöck M, Castañeda VH. Comparative sequence analysis of *spa* gene of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: characterization of an unusual *spa* gene variant. *J Dairy Res*. 2006;73:322-7.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2000;38:1008-15.

Erskine RJ, Kirk JH, Tyler JW, Degraives FJ. Advances in the therapy for mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1993;9:499-517.

Finney M. Pulsed-field gel electrophoresis, In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. editors. Current protocols in molecular biology. New York: Greene-Wiley; 1993. vol. 1. p. 2.5.9-2.5.17.

Fitch WM, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees. Science. 1967;155:279-84.

Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Epidemiol Infect. 1997;119:261-9.

Forsgren A, Svedjelund A, Wigzell H. Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*. Eur J Immunol. 1976;6:207-13.

Fowler VG, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. Med Microbiol Immunol. 2001;189:127-31.

Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton CT. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: the effect of milking time hygiene practices. Cornell Vet. 1991;81:183-93.

Fox LK, Gay JM. Contagious mastitis. Vet Clin North Am Food An Pract. 1993;9:475-87.

Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. Vet Microbiol. 2005;107:295-9.

Frank KL, Patel R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;57:355-9.

Frénay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J Clin Microbiol. 1994;32:846-67.

Frénay HME, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grals, CMJE, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:60-4.

Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer-Verlag; 2006. vol. 3, p. xx-xx: The Low G+C Gram-positive bacteria.

Gemmell CG, Tree R, Patel A, O'Reilly M, Foster TJ. Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A, α -haemolysin and b-toxin deficient mutants of *S. aureus* isolated by allele-replacement. In: Jeljaszewicz J, Ciborowski P, editors. The Staphylococci. Proceedings of the VIth International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, Zbl. Bakt. Suppl. 21. Stuttgart (NY): Gustav Fisher Verlag; 1991. p. 273-277.

Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F. Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem. 1998;273:18586-93.

Gill R, Howard WH, Leslie KE, Lissemore K. Economics of mastitis control. J Dairy Sci. 1990;73:3340-8.

Goh SW, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol. 1992;30:1642-5.

Gomes MJP, Duarte MPMB, Ferreira T, Torres HM. Mastite bovina: microrganismos identificados em rebanhos leiteiros-RS, Brasil. In: Encontro de Pesquisadores em Mastites; 2007; Botucatu. Botucatu: UNESP; 2007. p. 80.

Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol. 2002;43:1367-78.

Guler L, OK U, Gunduz K, Gulcu Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J Dairy Sci. 2005;88:3149-54.

Gürtler V, Barrie HD. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology*. 1995;141:1255-65.

Guss B, Uhlén M, Nilsson B, Lindberg M, Sjöquist J, Sjödahl J.. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem*. 1984;138:413-20.

Hall LMC. Are point mutations or DNA rearrangements responsible for the restriction fragment length polymorphisms that are used to type bacteria? *J Med Microbiol*. 1994;140:197-204.

Harmon RJ, Heald CW. Migration of polymorphonuclear leukocyte into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am J Vet Res*. 1982;43:992-8.

Harmon RJ. Fatores que afetam as contagens de células somáticas. *Anais of the I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite*. 1998; Curitiba: 1998. p. 36-9.

Harraghy N, Seiler S, Jacobs K, Hannig M, Menger MD, Herrmann M. Advances in *in vitro* and *in vivo* models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *Int J Artif Organ*. 2006;29:368-78.

Hartman M, Faccioli PY, Matos AVR, Langoni H. Perfil microbiológico na mastite bovina durante a lactação. In: *Encontro de Pesquisadores em Mastites; 2007; Botucatu*. Botucatu: UNESP; 2007. p. 101.

Haveri M, Taponen S, Vuopio-Varkila J, Salmenlinna S, Pyörälä S. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J Clin Microbiol*. 2005;43:959-61.

Hempker HC, Bas BM, Muller AD. Activation of a proenzyme by stoichiometric reaction with another protein. The reaction between prothrombin and staphylocoagulase. *Biochim Biophys Acta*. 1975;379:180-8.

Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiology*. 1998;36:1083-9.

Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26:2465-6.

Jeljaszewicz J, Switalski LM, Adlam C. Staphylocoagulase and clumping factor. In: Easman CSF, Adlam C, editors. *Staphylococci and staphylococcal infections.* London: Academic Press; 1983. vol. 2, 525-7.

Johnson M, Cockayne A, Williams PH, Morrissey JA. Iron-responsible regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves fur-dependent and fur-independent mechanisms. *J Bacteriol.* 2005;187:8211-5.

Joo YS, Fox LK, Davis WC, Bohach GA, Park YH. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet Microbiol.* 2001;80:131-8.

Jorgensen M, Givney R, Pegler M, Vickery A, Funnell G. Typing multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*: conflicting epidemiological data produced by genotypic and phenotypic methods clarified by phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:398-403.

Kaida S, Miyati T, Yoshizawa Y, Kawabata S, Morita T, Igarashi H, Iwanaga S. Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. *J Biochem.* 1987;102:1177-86.

Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Igarashi H, Iwanaga S. Nucleotide and deduced amino acid sequence of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acid Res.* 1989;17:8871.

Kapur V, Sischo WM, Greer RS, Wittam TS, Musser JM. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol.* 1995;33:376-80.

Karahan M, Çetinkaya B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Vet J.* 2007;174:428-31.

Karaolis DKR, Rashid MH, Chythanya R, Luo W, Hyodo M, Hayakawa Y. c-di-GMP (3',5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1029-38.

Kirk JH, DeGraves F, Tyler J. Recent progress in treatment and control of mastitis in cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;204:1152-8.

Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 264-77.

Knobloch JKM, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol.* 2002;191:101-6.

Kobayashi N, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Analysis of genomic diversity within the *Xr*-region of the protein A gene in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol Infect.* 1999;122:241-9.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn-Junior WC. *Diagnóstico Microbiológico*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 1465.

Kozlowski LM, Soulika AM, Silverman GJ, Lambris JD, Levinson AI. Complement activation by a B cell superantigen. *J Immunol.* 1996;157:1200-6.

Krieg NR, Holt JC. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins; 1994.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001;357:1225-40.

Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Joo YS, Park YO. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IV isolated from bovine milk in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:624-32.

Lam TJGM, Lipman LJA, Schukken YH, Gaastra W, Brand A. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am J Vet Res.* 1996;57:39-42.

Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol.* 1999;67:127-41.

Langoni H. Complexidade etiológica na mastite bovina. Encontro de Pesquisadores em Mastites; 1999; Botucatu. Botucatu: UNESP; 1999. p. 13-8.

Langoni H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. *Rev Educ Contin CRMV-SP.* 2000;3:57-64.

Langoni H. Mastite bovina: conceitos e fundamentos. Encontro de Pesquisadores em Mastites; 2007; Botucatu. Botucatu: UNESP; 2007. p. 8-17.

Larsen HD, Sloth KH, Elsberg C, Enevoldsen C, Pederson LH, Eriksen NHR, Aarestrup FM, Jensen NE. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Vet Microbiol.* 2000;71:89-101.

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

Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. Biofilm associated proteins. *C R Biol.* 2006;329:849-57.

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

Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:6489-94.

Lipsky PE. Staphylococcal protein A, a T cell-regulated polyclonal activator of human B cells. *J Immunol.* 1980;125:155-62.

Lopes CA, Moreno G, Curi PR, Gottschalk AF, Modolo JR, Horacio A. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. *Br Vet J.* 1990;146:443-8.

Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS.* 2004;112:908-29.

Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK, Elsner HA, Feucht HH. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun*. 2000;68:3799-807.

Mackie DP, Pollock DA, Rodgers SP, Logan EF. Phage typing of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical bovine mastitis. *J Dairy Res*. 1987;54:1-5.

Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

Matos JS, White DG, Harmon RJ, Langlois BE. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *J Dairy Sci*. 1991;74: 1544-9.

Matthews KR, Harmon RJ, Langlois BE. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J Dairy Sci*. 1992;75:1835-9.

McDevitt D, Vaudaux P, Foster TJ. Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not Clumping Factor. *Infect Immun*. 1992;60:1514-23.

McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science*. 1999;284:1523-7.

Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B*. 2006a;53:326-32.

Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J*. 2006b;171:398-407.

Melchior MB, van Osch MHJ, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, Gaastra W, Fink-Gremmels J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet Microbiol*. 2009;137:83-9.

Middleton JR, Fox LK, Gay JM, Tyler JW, Besser TE. Influence of *Staphylococcus aureus* strain-type on mammary quarter milk somatic cell count and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in cattle from eight dairies. *J Dairy Sci*. 2002;85:1133-40.

Monzon M, Oteiza C, Leiva J, Amorena B. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob. Chemother. 2001;48:793-801.

Monzon M, Oteiza C, Leiva J, Lamata M, Amorena B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002;44:319-24.

Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Joo YS, Park YH, Kim MN, Koo HC. Antibiogram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. J Dairy Sci. 2007;90:1716-24.

Moore PC, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. J Clin Microbiol. 2001;39:2760-7.

Morin DE. Economics analysis of a mastitis monitoring and control program in four dairy herds. J Am Vet Med Assoc. 1993;202:540-7.

Mota RA, Oliveira AAF, Sá MEP, Silva LBG, Souza MI. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* no estado de Pernambuco, Brasil. Ciênc Vet Trop. 1999;2:53-4.

Mullarky IK, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. Infect Immun. 2001;69:45-51.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 7. ed. Washington (DC): American Society for Microbiology, 1999.

Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev. 1999;63:174-229.

Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J Dairy Sci. 1969;52:696-707.

Nickerson SC. Preventing new *Staphylococcus aureus* infections. Vet Med. 1993;33:368-73.

O'Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 2007;270:179-88.

Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol. 1999;37:1661-9.

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O'Gara JP. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. J Clin Microbiol. 2007;45:1379-88.

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. J Bacteriol. 2008;190:3835-50.

Pereira MSV, Leal NC, Leal TCA, Sobreira M, Almeida AMP, Siqueira-Júnior JP, Campos-Takaki GM. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. Lett Appl Microbiol. 2002;34:1-5.

Pereira UP, Costa GM, Silva MA, Silva N. Mastite subclínica bovina em rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais. Encontro de Pesquisadores em Mastites; 2007; Botucatu. Botucatu: UNESP; 2007. p. 92.

Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. Infect Immun. 1977;15:760-4.

Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed field gel electrophoresis. In: Isemberg HD. editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1993.

Philpot WN. Control of mastitis by hygiene and therapy. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1984;6:233-45.

Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley AJ, Foster TJ. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. Mol Microbiol. 1990;4:393-404.

Pillai SR, Kunze E, Sordillo LM, Jayarao BM. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. J Dairy Sci. 2001;84:1413-20.

Rabello RF. Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética entre amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica bovina no estado do Rio de Janeiro [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2003.

Rabello RF. Diversidade genética e genes de virulência de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina no estado do Rio de Janeiro [tese (Doutorado em Microbiologia)]. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2007.

Rabello RF, Souza CRVM, Duarte RS, Lopes RMM, Teixeira LM, Castro ACD. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 2005;88:3211-9.

Rabello RF, Moreira BM, Lopes RMM, Teixeira LM, Riley LW, Castro ACD. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol.* 2007;56:1505-11.

Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:3357-63.

Radostitis OM, Leslie KE, Fetrow J. Mastitis control in dairy herds. In: Herd health food animal production medicine. Philadelphia: W. B. Saunders; 1994. p. 229-276.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Clínica Veterinária. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. cap. 15, p. 541- 629.

Raimundo O, Deigton M, Capstick J, Gerraty N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet Microbiol.* 1999;66:275-84.

Rementeria A, Gallego L, Quindos G, Garaizar J. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:331-6.

Ribeiro MER, Zanela MB, Gomes JF, Stumpf-Júnior W, Schramm R, Barbosa RS. Mastite bovina no sul do Rio Grande do Sul. Encontro de Pesquisadores em Mastites; 2007; Botucatu. Botucatu: UNESP; 2007.p. 95.

Ringden O, Rynnel D. Activation of human B and T lymphocytes by protein A of *Staphylococcus aureus*. Eur J Immunol. 1978;8:47-52.

Rivas AL, Gonzalez RN, Wiedmann M, Bruce JL, Cole EM, Bennett GJ, Schulte III HF, Wilson DJ, Mohammed HO, Batt CA. Diversity of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* ribotypes recovered from New York dairy herds. Am J Vet Res. 1997;58:482-7.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci. 1994;11:3354-64.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. J Dairy Sci. 1998;81:687-93.

Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JKM, Ragunath C, Kaplan JB, Mack D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. Biomaterials. 2007;28:1711-20.

Romagnani S, Biagiotti R, Giudizi MG, Almerigogna F, Alessi A, Ricci M. Protein A and enterotoxin A: two distinct *Staphylococcus* mitogens for human T lymphocytes. J Immunol. 1984;132:566-8.

Rosemberger G. Exame Clínico dos Bovinos. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. cap. 10, p. 299-308.

Sabour PM, Gil JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R, Leslie K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. J Clin Microbiol. 2004; 42:3449-55.

Saei HD, Ahmadi M, Mardani K, Batavani RA. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Vet Microbiol. 2009;137:202-6.

Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis - A molecular approach. Washington: American Society for Microbiology; 2002. p. 216-231: *Staphylococcus* species.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Santos FGB, Mota RA, Silveira-Filho VM, Souza HM, Oliveira MBM, Johner JMQ, Leal NC, Almeida AMP, Leal-Balbino TC. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Napgama*. 2003;6:19-23.

Santos FGB, Mármore C, Arcaro JRP, Costa EO. Evidências epidemiológico-moleculares do diagnóstico do estágio de portador assintomático de *Staphylococcus aureus* em glândulas mamárias bovinas. Encontro de Pesquisadores em Mastites; 2007; Botucatu. Botucatu: UNESP; 2007. p. 90.

Santos FGB, Rey CMA, Matarazzo SV, Arcaro JRP, Costa EO. Epidemiology of infectious mastitis: a PCR evaluation of *Staphylococcus aureus* carrier mammary glands. World Buiatrics Congress; 2008a; Budapest. Budapest: World Association for Buiatrics, 2008a. p. XX.

Santos FGB, Rivera ING, Arcaro JRP, Mamizuka EM, Mendonça CL, Melville PA, Costa EO. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases and asymptomatic carrier mammary glands World Buiatrics Congress; 2008b; Budapest. Budapest: World Association for Buiatrics, 2008b. p. XX.

Schalm OW, Noorlander BS. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J Am Vet Med Assoc*. 1957;130:199-207.

Schlegelová J, Dendis M, Benedik J, Babak V, Rysanek D. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. *Vet Microbiol*. 2003;92:327-34.

Schrezenmeier H, Fleischer B. Mitogenic activity of staphylococcal protein A is due to contaminating staphylococcal enterotoxins. *J Immunol Methods*. 1987;105:133-7.

Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res*. 2003;34:579-96.

Schuurman RK, Gelfand EW, Dosch HM. Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro. I. Characterization of the lymphocyte response to a T cell-independent B cell mitogen. *J Immunol*. 1980;125:820-6.

Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR. New techniques for purifying large DNA's and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1983;47:189-95.

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 1984;37:67-75.

Schwartzkopf A, Karch H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. *J Clin Microbiol*. 1994;32:2407-12.

Selander RK, Musser JM. Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. In: Novick RP, editor. *Molecular biology of the Staphylococcus aureus*. New York: VHC Publishers; 1990; v. 59.

Shopsin B, Gomez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3453-6.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:512-30.

Smith TH, Fox LK, Middleton JR. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. *J Am Vet Med Assoc*. 1998;212:553-6.

Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Kruze JV, Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2005a;43:4737-43.

Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Dowson CG. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2005b;43:4731-6.

Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet Microbiol*. 2003;96:91-102.

Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee JC. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J Clin Microbiol*. 2000;38:846-50.

Sordillo LM, Shafer-Weaver K, de Rosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci.* 1997;80:1851-65.

Spika JS, Verbrugh HA, Verhoef J. Protein A effect on alternative pathway complement activation and opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 1981;34:455-60.

Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Maes N, Serruys E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2599-605.

Stutzenberger FJ, San Clemente CL. Nephelometric assay of bovine antistaphylocoagulase serum. *J Bacteriol.* 1967;94:821-5.

Su C, Herbelin C, Frieze N, Skardakova O, Sordillo LM. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol Infect.* 1999;122:329-36.

Su C, Kanevsky I, Jayarao BM, Sordillo LM. Phylogenetic relationships of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. *Vet Microbiol.* 2000;71:53-8.

Swartz R, Jooste PJ, Novello JC. Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Bloemfontein dairy herds. *J S Afr Vet Assoc.* 1985;56:69-73.

Tager M, Hales HB. The experimental production of antibodies to staphylocoagulase. *J Immunol.* 1948;60:475-85.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:407-15.

Tenover FC, Arbeit R, Goering R, Mickelsen PA, Murray B, Persin DH. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.

Thiers FO, Benites NR, Ribeiro AR, Costa EO. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de “California Matitis Test” (CMT) no leite de vacas. *Napgama*. 1999;4:9-12.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. 718 p.

Uhlén M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A: a gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem*. 1984;259:1695-702.

van Belkum A, Riewarts E, Sijmons M, van Leeuwen W, van den Bergh M, Kluytmans J, Espersen F, Verbrugh H. Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 1997;46:222-32.

van Leeuwen W, Verbrugh H, van der Velden J, van Leewen N, Heck M, van Belkum A. Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 1999;37:664-74.

Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, van Eldere J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *J Infect Dis*. 2003a;188:730-7.

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

Vandenbergh MFQ, Yzerman EPF, van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3133-40.

Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*. 2003;92:179-85.

White EA, Paape MJ, Weinland AJ, Mather IH. Virulence of three strains of *Staphylococcus aureus* isolated from clinically infected bovine mammary glands. *J Dairy Sci*. 1980;63:1128-33.

Zadoks RN, Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, van Belkum A. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. 2000;38:1931-9.

Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis and binary typing. J Clin Microbiol. 2002;40:3894-902.

Zecconi A, Piccinini R. Teoria e prática de controle de mastites por *Staphylococcus aureus*. Napgama.1999;5:4-11.

Zecconi A, Binda E, Borromeo V, Piccinini R. Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates or somatic cell counts. J Dairy Res. 2005;72:203-8.

Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. Microb Pathog. 2006;40:177-83.

Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, Meyer P, Wilms K, Straube J, Hacker J. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infect Immun. 1997;65:890-6.

Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Loessner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Mol Microbiol. 1999;32:345-56.

Ziebuhr W, Dietrich K, Trautmann M, Wilhelm M. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. Int J Med Microbiol. 2000;290:115-20.