



GENÔMICA E PROTEÔMICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* EM MASTITES

Fernanda Antunha de Freitas¹, Albenones José de Mesquita²
Marília Cristina Sola³, Janaina Costa Feistel³, Ervaldo Lourenço de Sousa Sena⁴

¹Mestranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

²Doutor, Professor adjunto na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

³Doutoranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

⁴Biomédico, Gerente do Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia, Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

*fernandaantunha@gmail.com

Recebido em: 30/09/2013 – Aprovado em: 08/11/2013 – Publicado em 01/12/2013

RESUMO

A mastite ou inflamação da glândula mamária tem sido considerada a infecção de maior ocorrência no gado leiteiro, sendo responsável por inúmeras perdas econômicas visto a diminuição na produção e na qualidade do leite, elevação dos custos com medicamentos, mão-de-obra, além do descarte precoce de animais. Este processo inflamatório da glândula mamária pode ser causado por diversos fatores, como traumas mecânicos ou agentes infecciosos. As bactérias são classificadas como agentes etiológicos mais comuns e frequentes, sendo o *Staphylococcus aureus* o principal agente etiológico patogênico de mastite bovina. O estudo das características moleculares dos patógenos é importante, uma vez que permite o entendimento das interações hospedeiro-patógeno. Vários métodos moleculares têm sido utilizados para entender os mecanismos pelos quais os microrganismos interagem com seus hospedeiros para causar doenças, possibilitando a compreensão dos elementos genéticos na expressão da resistência e a identificação dos genes que sintetizam fatores responsáveis por sua virulência. Deste modo, as tecnologias genômica e proteômica se completam nas investigações destes sistemas biológicos.

PALAVRAS-CHAVE: inflamação da glândula mamária, métodos moleculares, qualidade do leite.

GENOMICS AND PROTEOMICS OF *Staphylococcus aureus* VIRULENCE FACTORS IN BOVINE MASTITIS

ABSTRACT

Mastitis, or inflammation of the mammary gland has been considered the most frequent infection in dairy cattle and is responsible for numerous economic losses

since the decrease in the production and quality of milk, rising drug costs, beyond premature disposal of animals. This inflammation of the mammary gland can be caused by several factors, such as mechanical trauma or infectious agents. Bacteria are classified as the most common etiological agents and frequent, and *Staphylococcus aureus* the main etiological agent of bovine mastitis pathogen. The study of molecular characteristics of pathogens is important, since it allows an understanding of the host-pathogen interactions. Several molecular methods have been used to understand the mechanisms by which microorganisms interact with their hosts to cause disease, enabling the understanding of the genetic expression of resistance and identification of genes that synthesize factors responsible for its virulence. Thus, genomic and proteomic technologies complement the investigations of these biological systems.

KEYWORDS: inflammation of the mammary gland, molecular methods, quality of milk.

INTRODUÇÃO

A mastite, ou inflamação da glândula mamária é considerada a doença de maior ocorrência e importância econômica na atividade leiteira, sendo o patógeno *S. aureus* o seu principal causador. Acarreta graves prejuízos à cadeia leiteira, decorrentes principalmente da diminuição da produção láctea, do comprometimento na qualidade do leite produzido e até da perda total da capacidade secretora da glândula mamária (KOSKINEN, 2009), por acometer grande quantidade de animais em uma única propriedade e por causar uma enfermidade de tratamento difícil e com altos índices de recorrência e de se tornar crônica.

O genoma, composto por todos os genes de um determinado organismo, é considerado estático, não possuindo alterações entre diferentes análises realizadas. Este é responsável pela regulação e expressão gênica. O proteoma, composto pelo conjunto de proteínas produzidas em um determinado momento de um organismo, por sua vez, não é estático, podendo variar de acordo com as condições ambientais e expressão gênica. A visão proteômica da fisiologia celular fornece uma informação global da fisiologia basal celular, em respostas do metabolismo ou a situações de estresse (KÖHLER et al., 2005).

A relação existente entre a genômica e a proteômica é que o proteoma é determinado pela expressão gênica. Assim, o estudo da genômica e proteômica é importante no sentido de esclarecer as interações entre o hospedeiro e o patógeno, permitindo o desenvolvimento de novas drogas e terapias.

O presente estudo tem por objetivo revisar os principais estudos de genômica e proteômica de fatores de virulência de *S. aureus* isolados de casos de mastites clínicas e subclínicas, em diferentes regiões do mundo, abrangendo aspectos gerais das ciências genômica e proteômica e algumas características da enfermidade mastite e do patógeno *S. aureus*.

ASPECTOS BÁSICOS DE GENÔMICA E PROTEÔMICA

A genômica e o perfil genético têm contribuído para o entendimento dos mecanismos moleculares nas funções de cura e patologia. Entretanto há limitações em relação ao tipo de informação que se pode extrair do perfil genético (JAMESDANIEL et al., 2009).

A era pós-genômica de *S. aureus* iniciou-se em 2001, quando a primeira sequência genômica de duas cepas foi publicada (KURODA et al., 2001). O genoma de *S. aureus* codifica aproximadamente 2.600 a 2.700 proteínas. A sequência

genômica permitiu a predição de muitas reações metabólicas e reguladores de expressão gênica (HECKER et al., 2010).

As tecnologias “ômicas” evoluíram e se tornaram potentes ferramentas para elucidação dos processos regulatórios dos genes em diferentes níveis celulares. As técnicas modernas de proteômica têm como objetivo obter uma descrição compreensiva do inventário proteico de uma célula e de alterações consequentes nos níveis de proteína quer seja numa base relativa ou absoluta, possibilitando a obtenção de resultados de formas complexas (OTTO et al., 2012).

O termo proteoma foi introduzido pela primeira vez em 1996 para se referir à totalidade de proteínas em uma célula, e assim veio o nome proteômica, designando o estudo do proteoma (NEIDHARDT, 2011). Portanto, proteômica é considerada uma tecnologia fundamental para estudar o proteoma celular de qualquer organismo, incluindo eucariontes e procariontes (YAHN et al., 2012). Proteômica pode ser definida como o estudo geral das proteínas e enzimas ou ainda, o estudo integrado da soma de todas as proteínas produzidas pelos organismos ou grupo de organismos (JAMESDANIEL et al., 2009).

A primeira análise proteômica realizada aconteceu em 1975, por O'FARRELL, por meio da técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida para separação de proteínas, no qual foram identificadas aproximadamente 1.000 proteínas de *Escherichia coli* (Figura 1). Devido à sua alta resolução, esta técnica foi considerada uma ferramenta valiosa para análise e detecção de complexos proteicos a partir de fontes biológicas (O'FARRELL, 1975).

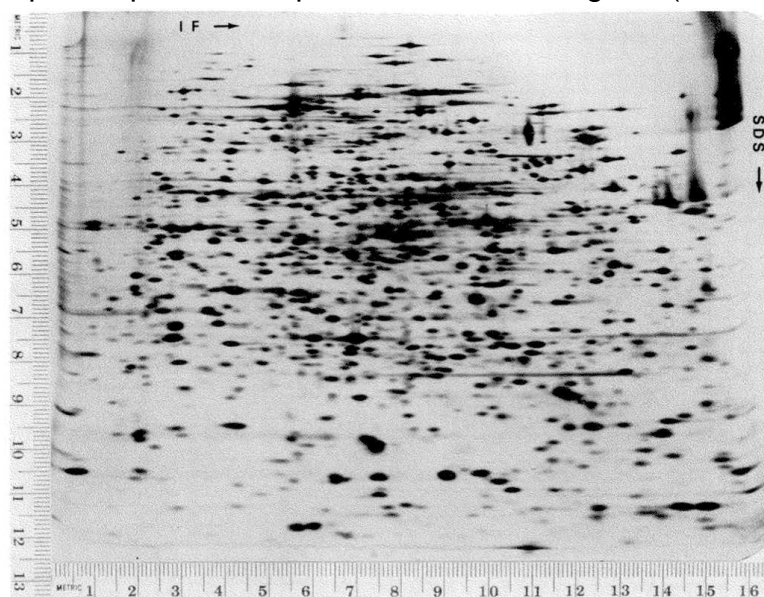


FIGURA 1: Separação de proteínas de *E. coli* (O'FARRELL, 1975).

Inicialmente, a proteômica microbiana estava focada na mudança da expressão proteica a nível celular em diferentes estágios ou condições específicas de crescimento, resultando na detecção negligenciada de proteínas de baixa abundância, incluindo a maioria dos fatores de virulência. A partir disso, muitas estratégias foram desenvolvidas para fracionar as porções do proteoma, como meio de enriquecê-las e caracterizá-las (HECKER et al., 2010; YAHN et al., 2012).

Para todos os microrganismos de importância clínica, uma ou mais sequências de genoma completa tornaram-se disponíveis nos últimos anos, gerando

catálogos completos de conteúdos genéticos e de importância eminente na abordagem proteômica, no qual proteínas ou peptídeos podem ser atribuídos a certos genes (BRÖKER & BELKUM, 2011). Enquanto que a sequência genômica fornece apenas o desenho, o proteoma a leva para a vida real. O perfil da expressão proteica é uma abordagem não só para mostrar que o padrão das proteínas expressas depende das condições ambientais, mas também, em que ponto cada proteína é expresso. Assim, o estudo da proteômica é uma extensão natural do progresso na biologia molecular, no qual a informação da proteômica complementa e estende a interpretação e aplicação dos achados da genômica (JAMESDANIEL et al., 2009).

A visão proteômica da fisiologia celular fornece uma informação global da fisiologia basal celular, em respostas do metabolismo ou a situações de estresse (KÖHLER et al., 2005). Estudos relativos de proteômica comparam, por exemplo, diferentes estados celulares de cepas ou amostras. Já os estudos absolutos possuem foco na determinação absoluta dos níveis de proteínas de vias metabólicas, compreendendo todas as proteínas detectáveis na amostra. Consequentemente, a análise da composição de proteína e suas modificações facilitam a caracterização de vias regulatórias e respostas metabólicas de estímulos internos ou externos (OTTO et al., 2012).

Estudos de proteômica são concebidos para produzir tanto informações qualitativas sobre proteínas (identificação, distribuição, interações, estrutura e função), quanto informações quantitativas (abundância, distribuição dentro de diferentes localizações, variações temporais de abundância devido a síntese e degradação ou ambos) (OTTO et al., 2012). A proteômica é uma técnica madura para o estudo de organismo procariontes, como bactérias. A variedade de técnicas é grande, e ao menos uma técnica é adaptada para quase todos os tipos de amostras ou análises (FRANÇOIS et al., 2010). Em adição, proteínas podem ser utilizadas como biomarcadores para tecidos, tipos celulares, estágios de desenvolvimento e estados de doença, bem como alvos potenciais para descobrimento de novas drogas e abordagens intervencionistas (JAMESDANIEL et al., 2009).

A análise proteômica de eletroforese bidimensional (2D-E) é uma ferramenta importante para abordar questões fisiológicas, acompanhamento das respostas rápidas ao estresse e modificações proteicas, como processamento de proteínas, fosforilação ou dano proteico, já que muitas vias metabólicas e principais respostas a situações de estresse podem ser visualizadas nos geis de eletroforese bidimensional (HECKER et al., 2010).

A tecnologia de eletroforese bidimensional é a união de duas técnicas de eletroforese; uma de separação por massa molecular em gel de poliacrilamida em presença de SDS (Dodecil-sulfato de sódio), a SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio), e outra onde a separação se dá por gradiente de pH também em gel de poliacrilamida contendo anfólios carregados, a IEF (Focalização isoeletrica) (O'FARRELL, 1975; OTTO et al., 2012; RADHOUANI et al., 2012). Uma vez que estes dois parâmetros não estão relacionados, é possível obter uma distribuição quase uniforme de manchas de proteínas através de um gel de duas dimensões (O'FARRELL, 1975). Nas regiões dos pontos isoeletricos 4 a 7, as proteínas mais abundantes são as enzimas metabólicas, fatores translacionais ou *chaperons*. Já na região alcalina, as proteínas ribossômicas são as mais abundantes (HECKER et al., 2010).

A técnica de 2D-E pode fornecer mais de 10.000 pontos de proteínas detectáveis em uma única análise. Assim, proteínas com modificações pós-

tradicionais (PTMs), como fosforilação, processamento e glicolização, podem ser seguramente encontradas em forma de pontos separados (RADHOUANI et al., 2012). Após o traçado de um local no interior do gel, as proteínas separadas podem ser visualizadas, por exemplo, por coloração, identificadas na base de dados e comparadas em silico por diferentes imagens de análises em gel (OTTO et al., 2012; RADHOUANI et al., 2012).

Após a análise no gel de eletroforese, a identificação das proteínas é feita pela digestão utilizando a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight) (RADHOUANI et al., 2012). (DEKKER & BRANDA, 2011).

MASTITE ESTAFILOCÓCICA

O principal problema que afeta os rebanhos leiteiros, mundialmente, são as infecções intramamárias (IIMs), que ocorrem quando um agente infeccioso, químico, mecânico ou térmico, agride a glândula mamária, produzindo uma reação inflamatória e danos ao tecido glandular, caracterizando um quadro denominado mastite (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). Em países com a indústria e pecuária leiteira bem desenvolvida, a mastite é a doença mais comum e que mais onera os custos de produção de fazendas leiteiras. Em adição ao impacto negativo na eficiência e qualidade da produção, a mastite é um assunto importante na sanidade e bem-estar animal (KEEFE, 2012). O conhecimento da prevalência e distribuição dos patógenos, bem como os fatores de risco associados com a doença são pontos críticos na prevenção da mastite (PICCININI et al., 2012).

A mastite pode ser classificada como clínica e subclínica, podendo ser diferenciadas pela forma de apresentação da enfermidade. A primeira apresenta sinais sistêmicos de infecção e sinais clínicos locais, além de alterações na composição e aparência do leite secretado (KOSKINEN et al., 2010; BARLOW, 2011). Já na forma subclínica não se observam as alterações macroscópicas, mas sim alterações na composição do leite, como o aumento de Contagem de Células Somáticas (CCS), e alterações na quantidade produzida de leite. (KOSKINEN et al., 2010; BARLOW, 2011).

Do ponto de vista tecnológico, a mastite é uma das causas que provoca maior prejuízo sobre a composição e características físico-químicas do leite, no qual é observada uma perda da produção dos três principais componentes do leite, gordura, lactose e proteína. Quanto maior a CCS, maior a perda da produção (HALASA et al., 2009). Os prejuízos causados pela mastite incluem os custos de diagnóstico microbiológico, medicamentos, mão de obra, descarte de leite, redução da produção de leite em razão da mastite clínica e subclínica, descarte do animal ou perda do quarto, e risco de transmissão da infecção para outras vacas, além do risco de transmissão em alimentos (SANTOS et al., 2011, KEFEE, 2012).

A mastite bovina pode ser causada por 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, sendo a bactéria com maior prevalência e de principal importância o patógeno *Staphylococcus aureus*. Este microrganismo é considerado contagioso, ou seja, a contaminação e disseminação do patógeno ocorrem durante a ordenha, sendo o úbere a principal fonte de infecção (CAPURRO et al., 2010; MICHEL et al., 2011, KEEFE, 2012). Tal bactéria possui um papel importante no controle de mastite, já que é um microrganismo de tratamento difícil devido à elevada resistência aos antibióticos (FERREIRA et al., 2006; NADER FILHO et al., 2007).

Uma vez que o reservatório primário da infecção com agentes patogênicos contagiosos é o gado infectado, o foco de controle está relacionado a biossegurança do rebanho. O controle de agentes patogênicos contagiosos é realizado pela diminuição de novas infecções e redução do reservatório da infecção no rebanho. Para KEEFE (2012), os procedimentos de desinfecção dos tetos nos intervalos de pré e pós – ordenha e a terapia da vaca seca auxilia na diminuição da prevalência de mastite. Há evidências de que a utilização de luvas de ordenha é uma parte integrante do controle de mastite contagiosa e a produção de leite de alta qualidade. Rebanhos devem ser fechados ou ter protocolos de biossegurança rigorosos para prevenir a introdução de novas estirpes de patógenos causadores de mastite contagiosa.

Os dez princípios básicos do *National Mastitis Council* – Estados Unidos (NMC) para o controle de mastite são os seguintes: (1) estabelecimento de metas para a saúde do úbere, (2) a manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável, (3) procedimentos adequados de ordenha, (4) manutenção e uso adequado dos equipamentos de ordenha, (5) boa manutenção dos registros, (6) apropriado manejo de mastite clínica durante a lactação, (7) manejo eficaz da vaca seca, (8) manutenção da biossegurança para patógenos contagiosos e para comercialização de vacas cronicamente infectadas, (9) o acompanhamento regular do estado de saúde do úbere, (10) revisão periódica do programa de controle de mastite (KEEFE, 2012).

A mastite associada a *S. aureus* é uma das principais doenças contagiosas que assola a pecuária leiteira, já que *S. aureus* é o principal agente etiológico patogênico de mastite bovina, e provoca perdas econômicas significantes no gado leiteiro em todo o mundo. Este patógeno produz uma grande variedade de fatores de virulência, responsáveis por infecções subclínicas e crônicas. A investigação da distribuição e dos fatores de virulência de *S. aureus* fornece informações importantes para estabelecimento de estratégias de controle de infecções (HWANG et al., 2010). Os produtos do gene associados com a especificidade do hospedeiro poderiam ser alvos ideais para agentes terapêuticos para prevenir o carreamento e infecções em animais ou humanos, reduzindo a morbidade, letalidade ou perdas na agricultura (L-SUNG et al., 2008).

Cada linhagem de *S. aureus* tem uma única combinação de proteínas de superfície e reguladores, chamados genes variáveis centrais (CV), e correspondem aos complexos clonais (CCs), resultando em múltiplos recombinantes de genes CV entre as linhagens. Além disso, todas as cepas são portadoras de uma variedade de elementos genéticos móveis (MGE) que codificam genes de resistência e virulência, e há muita variação dentro das linhagens, indicando frequente transferência horizontal. (L-SUNG et al., 2008).

S. aureus é um microrganismo comensal e patogênico de diversas espécies mamíferas, particularmente humanos e ruminantes (L-SUNG et al., 2008). Sua virulência depende de uma grande variedade de fatores, principalmente, proteínas extracelulares, como enzimas e exotoxinas, que contribuem no desencadeamento da doença. Cepas de *S. aureus* podem albergar diferentes genes de virulência que codificam enterotoxinas estafilocócicas (SEs), leucocidinas, esfoliatinas, hemolisinas, toxinas da síndrome do choque tóxico 1 e alelos do gene acessório regulador (*agr*), sendo que a presença ou ausência desses genes é essencial para determinar o potencial de virulência das cepas. O padrão dos genes de virulência e do polimorfismo genético pode ser usado para determinar o “biovar” e a relação com a origem dos isolados (SPANU et al., 2012).

Entre os fatores contribuintes para a virulência deste patógeno, a resistência a antibióticos possui um importante papel. Cepas de *S. aureus* podem ser caracterizadas como resistentes a uma única ou a várias drogas, representando a principal ameaça para a saúde pública, como é o exemplo das cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA) (SPANU et al., 2012), patógeno importante na medicina humana, mas que também pode colonizar e causar infecções em várias espécies animais (FEBLER et al., 2010). Em relação ao MRSA, este é um assunto de importância para a saúde pública. A cepa MRSA encontrada em gado parece agir de maneira similar de outras cepas, porém, o fato de MRSA ser encontrada em gado indica graves entraves na saúde pública (KEFEE, 2012).

A mastite estafilocócica em ovelhas leiteiras possui duas formas de apresentação, a forma subclínica e a forma gangrenosa letal. Os fatores de virulência de *S. aureus*, ou os fatores do hospedeiro e eventos epidemiológicos que contribuem para o desencadeamento de uma das formas, ainda não são conhecidos. Em mastites de ovelhas suspeita-se que cepas de *S. aureus* possuem potenciais de virulência diferentes, mas as características genéticas associadas com a diferente evolução ainda são desconhecidas (VAUTOR et al., 2009).

GENÔMICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. Aureus*

Isolados de MRSA da linhagem clonal ST398 tem ganhado atenção particular como agentes colonizadores em porcos, porém raramente como agentes causadores de infecções. Estudos prévios mostraram que isolados ST398 não são restritos a porcos, podendo ser isolados de humanos e outros animais, sendo que pessoas em contato íntimo com suínos estão em risco de serem colonizadas por esse patógeno. Assim, portadores de MRSA ST398 possuem um papel importante na disseminação destes em diferentes ambientes e para diversas espécies animais (FEBLER et al., 2010).

Para acompanhar a disseminação, a caracterização da cepa se faz necessária. Em um estudo realizado por FEBLER et al., (2010) objetivou-se caracterizar isolados MRSA de casos de mastite bovina por suas relações genômicas e propriedades de resistência a antimicrobianos e de virulência. Para isso, o diagnóstico por microarranjo e técnicas clássicas para tipificação foram aplicadas e suplementadas com unidades repetidas diretas (dru) (FEBLER et al., 2010). Para este estudo, foram utilizados 25 isolados de MRSA provenientes de casos de mastite clínica bovina e dois isolados de trabalhadores das propriedades.

Foram encontrados três diferentes tipos do gene *spa*, o tipo t011 dominante, o t034 com três isolados e o t2576 com apenas um isolado. Em uma análise mais profunda das unidades repetidas percebeu-se que os três tipos *spa* são relacionados, sendo que t034 (08-16-02-25-02-25-34-24-25) se difere de t011 (08-16-02-25-34-24-25) pela duplicação de 02-25, e t2576 (08-12-16-02-25-34-24-25) tem uma repetição adicional de 12 em comparação com t011. A tipificação de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) revelou a presença de *SCCmec* do tipo IV em um isolado, um isolado com cassete cromossômico não identificado e, nos, 25 isolados restantes, a presença do *SCCmec* tipo V. Dentre os 27 isolados, cinco diferentes tipos de dru foram identificados, o dt11a (padrão repetido 5a-2d-4a-0-2d-5b-3a- 2g-3b-4e-3e), presente em 20 isolados, o dt11ab (5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-3b-4e-2f), presente em três isolado, dt6j (5a-2d-4a-0-2d-3e), presente em dois isolados, e tipos dt10a (5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-3b-4e) e dt10q

(5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-2c-4e), encontrados em um isolado cada (FEBLER et al., 2010).

A análise de genotipagem revelou um padrão uniforme de genes de virulência dentro dos 27 isolados de MSRA. Todos os isolados foram positivos para a presença do gene de codificação de α e θ hemolisina, gene do grupo *agr1* e o gene de codificação do polissacarídeo capsular tipo 5; e estes ainda eram portadores de um conjunto similar ao gene da família de moléculas da matriz adesiva de reconhecimento de componentes de superfície microbianos (MSCRAMM), incluindo os genes do fator de aglomeração A e B (*clfA* e *B*), proteína ligadora de fibrinogênio A e B (*fnbA* e *B*), proteína ligadora de colágeno (*cna*) e proteína ligadora de elastina (*ebpS*), entre outros. Todos os isolados foram negativos para os gene de codificação de leucocidinas Panto-Valentine (PVL), *lukF-PV* e *lukS-PV*, o gene *tst*, da toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), os genes *etA*, *etBeetD*, da toxina esfoliativa, bem como genes de enterotoxinas estafilocócicas (FEBLER et al., 2010).

Testes de susceptibilidade revelaram a presença de dez padrões diferentes. O padrão mais frequente, detectado em 11 isolados, consiste na resistência a b-lactâmicos e tetraciclinas. Outros três isolados mostraram resistência para trimetropim e tiamulina, em adição a b-lactâmicos e tetraciclina. Os restantes 12 isolados, entretanto, exibiram padrões de resistência mais extensos, que inclui seis membros de oito classes de agentes antimicrobianos. Todos os isolados MRSA foram susceptíveis a vancomicina. Os 27 isolados MRSA carregavam o gene *mecA* e o operon b-lactamase *blaZ-blaI-blaR*. Já a resistência a tetraciclina era mediada pelos genes *tet(M)ptet(K)* em 15 isolados, *tet(M)ptet(K)ptet(L)* em 10 isolados e *tet(M)ptet(L)* ou *tet(M)* em um isolado cada. Todos os isolados com presença do gene *tet(L)* carregavam o gene de resistência a trimetropim (*dfpK*) (FEBLER et al., 2010).

Os isolados de MRSA doados pelos trabalhadores de uma propriedade obtiveram resultados idênticos aos três isolados bovinos obtidos da mesma fazenda. Essa observação sugere transferência de MRSA entre os animais e pessoas da mesma fazenda. Com isso, a presença de isolados MRSA do ambiente nosocomial em gado leiteiro ou em amostras de leite mastíticas sugere a transmissão desses isolados entre humanos e animais, demonstrando um perfil zoonótico do patógeno (FEBLER et al., 2010).

No estudo de FEBLER et al. (2010) todos os isolados apresentaram resultado negativo para a presença de genes que codificam leucocidinas (PVL) e gene que codificam enterotoxinas estafilocócicas, que possuem papel importante em casos intoxicação alimentar pelo consumo de leite contaminado com *S. aureus*.

Em outro estudo, que teve como objetivo realizar uma caracterização dos fatores de virulência e estudar a variabilidade genética dos isolados de *S. aureus* de queijo de leite cru de ovelha, 81% dos isolados teve um perfil de patogenicidade atribuível a “biovar animal”, enquanto que 16% pode ser relacionado a “biovar humano”, permitindo, assim, estimar a origem mais provável de contaminação. Cem isolados de *S. aureus* de amostras de queijo produzidas em fábricas artesanais foram analisadas para a presença de genes que codificam enterotoxinas (*sea-see*), genes de proteínas semelhantes a enterotoxinas (*seh*, *sek*, *sel*, *sem*, *seo*, *sep*), leucocidinas, exfoliacinas, hemolisinas, toxina da síndrome do choque tóxico 1 (*tst*) e o alelo do gene acessório regulador (*agr*). Concentrações mínimas inibitórias (MICs) de nove agentes antimicrobianos e a presença de genes correspondentes que

codificam para resistência antimicrobiana também foram investigados (SPANU et al., 2012).

Genes que codificam SEs B, D, E, H, K, P, Leucocidina Panton Valentine e exofoliatinas A, B e D não foram detectados. O gene que codifica SEC foi encontrado em 23 cepas e foi associado com genes *sel* e *tst*. Em sete de dez isolados o gene *sea* foi associado com os genes *sem* e *seo*. A alta prevalência de cepas portando genes *sec*, *set* e *etst*, tanto sozinhas ou combinadas com gene *hly*, observado na pesquisa atual, sugeriu a origem animal dos isolados. O locus regulador *agr* é outro fator importante que define a correlação entre *S. aureus* e seu hospedeiro. A maioria das cepas (40%) portava alelo *agr* do grupo III, frequentemente observado em isolados de *S. aureus* de origem ovina (SPANU et al., 2012).

Foram identificados 18 isolados portando genes *blaZ*, e estes demonstraram resistência a ampicilina e penicilina; seis isolados que portavam o gene *tetM* foram resistentes a tetraciclina. A presença do gene *mecA* e resistência a meticilina, típicos em cepas de origem humana, não foi detectado. Como a resistência múltipla e a resistência a meticilina são típicas em cepas humanas, a ausência dessas dá suporte a hipótese que a maior parte dos isolados era de origem animal. Os padrões de virulência observados na maioria dos isolados levam a concluir que a contaminação com *S. aureus* do queijo de ovelha artesanal é de origem animal, e a detecção do biotipo humano é esporádica (SPANU et al., 2012).

Em um estudo de campo, realizado por VAUTOR et al (2009), 16 isolados de *S. aureus* foram coletados de seis casos de mastite subclínica (033, 046, 047, 054, 063 e 064), um caso de mastite gangrenosa letal (011), de oito fossas nasais de ovelhas (0193 – 0200), e um isolado do ar ambiente de uma sala de ordenha (0192). Foi realizada uma comparação entre um isolado proveniente de mastite subclínica (O46) e outro de mastite gangrenosa (O11), além da realização de análises de tipificação para caracterizar e identificar os isolados de mastite gangrenosa em narinas dos animais.

De acordo com os resultados obtidos pelas análises realizadas para discriminar os isolados de *S. aureus*, o isolado gangrenoso O11 é idêntico aos isolados O193, O194, O195 e O196. Também foram considerados muito semelhantes aos isolados O192, O199 e O200, variando apenas no perfil de bacteriófagos. Já o isolado de mastite subclínica O46, indistinguível dos isolados O33 e O54, não obteve relação com os isolados das fossas nasais de ovelhas (VAUTOR et al., 2009). Ainda de acordo com os resultados das análises de tipificação, o isolado de mastite gangrenosa (O11) é portador de alguns genes de virulência, tais como *sdrD*, *clfA-B*, *sasA*, *sasB*, *sasD*, *sasI* e *splE*, porém não foi detectado o gene de codificação da proteína de ligação ao fibrinogênio B (*fnbB*) e um profago. A tipificação mostrou também que a cepa O11 emergiu após um quadro inicial de mastite subclínica, porém persistiu em narinas de quatro ovelhas (VAUTOR et al., 2009).

As duas cepas, O11 e O46, foram agrupadas na linhagem CC130 de vacas, essas tinham em comum 3615 ORF idênticos e não tinham evidências de plasmídeos livres. As principais diferenças entre os isolados foram a presença/ausência de alelos para *sdrD*, *splE*, *fnbB*, *clfA-B* e a presença de genes profagos (*SAS0897*, *SAR1558*, *SAR0940*, *SAR2100* e *SACOL0343*). Além disso, a tipificação do gene *sas* entre O11 e O46 (variações em *sasA*, *sasB*, *sasD* e *sasI*) indicou pequenas variações na codificação de produtos adicionais de superfície, portanto, foram encontradas diferenças genômicas entre essas cepas

geneticamente relacionadas, mas não foram encontradas diferenças em genes envolvidos em processos celulares, síntese de parede celular ou metabolismo intermediário (VAUTOR et al., 2009).

Em outro estudo com as cepas O11 e O46 causadores de mastite gangrenosa e subclínica, respectivamente, foi realizado uma comparação genômica para identificar os fatores estafilocócicos ligados à severidade da mastite a fim de definir as características de cada cepa associada com hiper-virulência em mastites. A análise genômica revelou diferenças mínimas, a grande maioria dos genes foi encontrada nas duas cepas, exceto por um sorogrupo adicional de profago B (42CDS) no genoma da cepa O46 (MARECHAL et al., 2011).

As cepas O11 e O46 demonstraram alta similaridade com a sequência genômica de ED133, outra cepa originada de mastite ovina (FIGURA 2). No estudo, foi encontrado que a maior parte dos genes presentes no genoma ED133 estava presente nos genomas de O11 ou O46. Tanto O11 e O46 portavam fagos relacionados aos fagos *wSaov1* e *wSaov3* de ED133, mas não continham *wSaov2*, reportado apenas em ED133. Os genes *scn*, da proteína inibidora do complemento, *vwb*, do fator von Willebrand ligador de proteína, e *SAOV_2050*, de uma proteína hipotética, carregados pela ilha de patogenicidade *SaPlov 2*, foram identificados nas sequências O11 e O46 (MARÉCHAL et al., 2011).

Embora os genomas de O11 e O46 sejam clonais, como demonstrado pelas análises de tipificação de *spa* e de eletroforese de campo pulsado (PFGE) e pelo conteúdo genômico, as cepas contêm polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNP). A comparação entre O11 e O46 mostrou que os SNPs eram distribuídos de maneira uniforme no genoma e não correlacionava com a localização ou função de proteínas. Ainda, a comparação entre O11 e O46 revelou 103 genes truncados, presentes em uma das duas cepas, correspondentes, por exemplo, a pontos de mutação. Entre os 103 genes truncados, 37% estavam envolvidos no funcionamento da célula; 8,7% na regulação gênica; 3% no metabolismo do ferro; 11% na virulência; e 36% na codificação de proteínas com função desconhecida (MARÉCHAL et al., 2011).

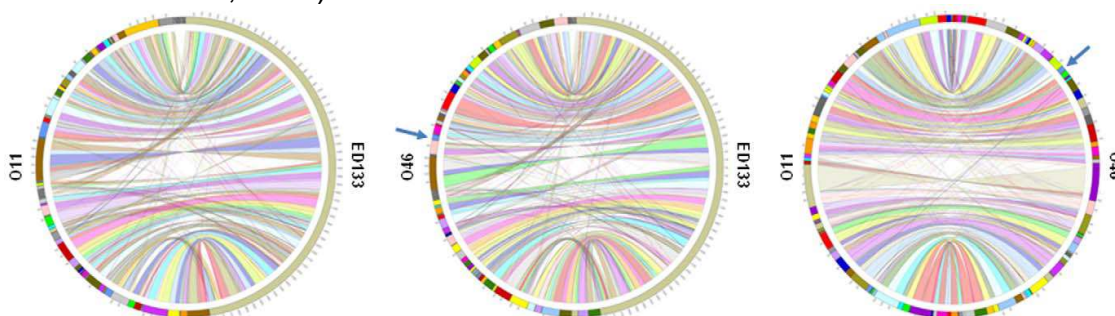


FIGURA 2: Mapa gráfico dos genomas de *S. aureus* O11, O46 e ED133. Sequências homólogas entre as cepas estão ligadas por fitas coloridas. As setas indicam as sequências contíguas contendo o fago adicional em O46 (MARECHAL et al., 2011).

Em um estudo, realizado no Reino Unido, foram comparados 56 isolados de *S. aureus* que causaram infecção em vacas, cavalos, carneiro, ovelha e camelo, com 161 isolados humanos de portadores saudáveis e de infecções adquiridas na comunidade. O objetivo foi identificar genes de *S. aureus* associados com a especificidade do hospedeiro, determinar a relação entre isolados humanos e animais, e ainda identificar se a troca de elementos genéticos móveis (MGEs) contendo genes de resistência e de virulência entre os isolados humanos ou animais

é frequente (L-SUNG et al., 2008). Foi encontrado que os *S. aureus* associados a animais se agruparam em dez linhagens, com 61% presente em quatro linhagens (ST 151, ST771, ST130 e ST873), únicas em animais. Dos 37 isolados bovinos, 81% pertenciam principalmente a três linhagens, ST151 (n513), ST771 (n59) e ST97 (n58). O restante dos isolados bovinos foi designado como ST130 (n53); ST188 (n53), encontrado em baixa frequência em humanos; St1 (n51), uma linhagem dominante de humanos; e um órfão (sem caracterização). A presença de isolados de caso de mastite bovina proveniente de linhagens humanas vai contra a ideia de que apenas isolados animais causam doenças em animais e apenas isolados humanos são carregados por humanos ou causam doenças em humanos (L-SUNG et al., 2008).

O estudo de L-SUNG et al. (2008), pode estimar os principais genes associados à especificidade do hospedeiro. Muitos genes de virulência conservados nos isolados humanos não foram encontrados em uma ou mais linhagens animais, como a linhagem específica de genes *fnbA*, *fnbB* e *coa*. Genes portadores de MGEs, como *chp*, proteína inibidora de quimiotaxia, *scn*, proteína inibidora do sistema complemento, e *sak*, estafiloquinase, também foram pouco comuns em isolados de *S. aureus* de origem animal; e o gene *bap* não foi encontrado. Apesar de haver evidências de trocas de MGEs, como bacteriófagos e ilhas de patogenicidade, entre isolados humanos e animais, não há evidências de transferência de genes de resistência nos cassetes cromossômicos estafilocócicos (SCC) ou plasmídeos.

Os resultados de L-SUNG et al., (2008) sugerem que pode haver algumas diferenças conservadas entre *S. aureus* de humanos e animais. Isso é devido ao fato que a maioria dos *S. aureus* de humanos e bovinos parecem ser hospedeiros-específicos para colonização e patogenicidade. Isso pode ser explicado com a baixa incidência de genes de virulência nos isolados animais, como *scn*, que codifica um inibidor da formação do complemento e reduz a fagocitose por neutrófilos; *chp*, que codifica moduladores de respostas a quimiocinas que previne a quimiotaxia neutrofilica e sua ativação; e *sak*, codificador de uma anti-opsonina e inibidor de defensina. É possível que as proteínas codificadas por esses genes tenham como alvo respostas específicas à imunidade humana e não a respostas imunes animais. Portanto, é possível que genes que tem como alvo o sistema imune específico animal sejam encontrados em cepas animais, mas não existem provas deles nos microarranjos de DNA.

Os isolados animais foram mais sensíveis a antibióticos que os isolados humanos e, surpreendentemente, dois isolados animais que portavam os elementos *SCCmec* e foram positivos para a presença do gene *mecA* eram fenotipicamente sensíveis a meticilina. O gene *vra*, possivelmente associado com a síntese da parede celular e resistência à vancomicina, foi encontrado em três linhagens humanas e em nenhum isolado animal. Os perfis de resistência a antibióticos de isolados animais mostraram pouca evidência de difusão de resistência a antibióticos em linhagens animais (L-SUNG et al., 2008).

No estudo de HWANG et al. (2011), 44 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite em cinco províncias na Coreia do Sul foram investigadas pelo método de tipificação de *spa* e perfil do gene de codificação de SE. Dos resultados da tipificação de *spa*, foram identificados 14 tipos diferentes, sugerindo que estes são provenientes de um ancestral comum. Os isolados foram agrupados em cinco grupos e dois isolados sozinhos baseados nos tipos de *spa*, são eles: grupo 1 (t164, t2094, t1987), grupo 2 (t286, t127), grupo 3 (t148, t324, t664), grupo 4 (t1151, t519), grupo 5 (t034, t1456), isolados sozinhos (t002, t008). Além disso, a análise do perfil do gene de codificação de SE revelou a prevalência de cada subtipo

dos genes de SE ou da proteína semelhante a SE e o MGE associado relacionado a esses genes.

Os genes de codificação de SE e de proteína semelhante a SE foram detectados em 34 isolados (77,3%), sugerindo que as enterotoxinas estafilocócicas e as toxinas semelhantes às enterotoxinas estafilocócicas causam mastite pela depressão do sistema imune bovino. Ao todo, foram detectados 10 diferentes genes de codificação de SE e proteína semelhante a SE, são eles: *sea* (2 isolados), *seb* (1 isolado), *seg* (17 isolados), *seh* (16 isolados), *sei* (17 isolados), *selk* (2 isolados), *selm* (17 isolados), *seln* (17 isolados), *selo* (17 isolados) e *selq* (2 isolados). Não foram detectados os genes *sec*, *sed*, *see*, *sej*, *sell*, *selp*, *selr* e *selu*. O perfil gênico SE mais prevalente foi uma composição dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*, detectado em 36,3% (16) dos isolados (HWANG et al., 2010).

O perfil genético de SE e os tipos de *spa* dos isolados de *S. aureus* também foram comparados. Muitos tipos de *spa* mostraram mais de dois perfis gênicos de SE. Dentre os oito isolados do tipo t164, sete possuíam os genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*. Os oito isolados t286 possuíam dois perfis SE: positivo para o gene *seh* (seis isolados) e isolados negativos (dois isolados). No caso do tipo t127, sete isolados abrigavam o gene *seh* e um isolado, os genes *sea*, *selk*, *selq* e *seh*. Os isolados do tipo t189 apresentaram três tipos de perfis genéticos de SE: Três isolados foram considerados suspeitos de possuírem os genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*, dois isolados possuíam o gene *seh*, e dois isolados não abrigavam gene de toxinas. A presença de diferentes perfis do gene SE dentro do mesmo tipo *spa* indica a possibilidade de associações de MGEs (HWANG et al., 2010).

O objetivo do estudo de GAO et al., (2012) foi detectar diversidade dos tipos moleculares em isolados de *S. aureus* de casos de mastite em um rebanho bovino e detectar os padrões de resistência a antibióticos e genes de resistência relacionados dentre os isolados. Para isso, 53 isolados de *S. aureus* de vacas com mastite clínica ou subclínica foram utilizados. As análises de tipificação revelaram a presença de dois tipos de *S. aureus*, indicando a presença de duas cepas no rebanho. O tipo I foi predominante tanto nos casos de mastite subclínica (27 quartos mamários), quanto nos casos de mastite clínica (23 quartos mamários). A baixa diversidade indica que uma cepa (tipo I) causando mastite se difundiu de uma vaca para outra no rebanho.

Os testes de susceptibilidade a antimicrobianos demonstraram resistência à tetraciclina, penicilina e eritromicina dentre os isolados de *S. aureus*. Os 51 isolados resistentes a penicilina continham o gene *blaZ*; o gene *ermC* estava presente em todos os 35 isolados resistentes a eritromicina, contudo, quatro isolados portavam o gene *ermC* e eram susceptíveis a eritromicina. Os 52 isolados resistentes a tetraciclina portavam o gene *tetM*, dentre eles, seis isolados portavam também o gene *tetK*. Combinado com os resultados de tipificação, a alta frequência da resistência do microrganismo *S. aureus* a penicilina e tetraciclina pode ser explicada pela disseminação de uma cepa no rebanho, possivelmente devido às más condições de higiene de ordenha e alta prevalência de animais infectados de forma subclínica (GAO et al., 2012).

O estudo de REINOSO et al., (2008) utilizou 45 isolados de *S. aureus* coletados de humanos, bovinos e amostras de alimentos na Argentina. Dentre eles, 15 isolados foram obtidos de infecções de humanos, sete foram obtidos de narinas de pessoas aparentemente saudáveis, 15 isolados de mastite subclínica bovina e oito isolados de amostras de alimentos. Foram realizadas análises para identificar determinantes genéticos de virulência e características regulatórias. As análises

incluiram genes de codificação da região de ligação a imunoglobulina G e região X da proteína A estafilocócica (*spa*), coagulase (*coa*), fator de aglomeração A (*clfA*), domínios de ligação ao colágeno A (*cnaA*) e B (*cnaB*), o polissacarídeo capsular 5 (*cap5*) e 8 (*cap8*), o gene acessório regulador (*agr*) I a III e o gene de expressão de exoproteínas de *S. aureus* (*sae*). Entre os isolados humanos, 19 (86%) foram resistentes à penicilina, nove (41%) à estreptomicina, oito (36%) à eritromicina, sete (32%) à tetraciclina, quatro (18%) à canamicina, dois (9%) à novobiocina e um à cefalotina (4%). Entre os isolados de mastite bovina, quatro apresentaram resistência à penicilina e quatro à estreptomicina. Os isolados de *S. aureus* restantes de amostras de alimentos foram susceptíveis a todos os antibióticos testados. A resistência a antibióticos parece ser mais pronunciada entre os isolados humanos comparados com os isolados de mastite bovina. Esse aumento da resistência antimicrobiana de isolados humanos pode ser causado por uma transferência horizontal de genes (REINOSO et al., 2008).

Os isolados foram divididos em sete grupos com 60% de similaridade genética relativa, de acordo com os resultados da análise de REP-PCR, e denominados I-VII (FIGURA 3). O grupo II consistia de 13 (87%) isolados de infecções humanas, os grupos III e IV de 14 (93%) de isolados de mastite bovina, os grupos V e VII de cinco (71%) de isolados de narinas e pessoas saudáveis; seis (75%) dos isolados de amostras de alimentos foram agrupados junto com os isolados humanos no grupo II. O grupo com os isolados restantes de *S. aureus* não teve correspondência com a origem dos outros isolados (REINOSO et al., 2008).

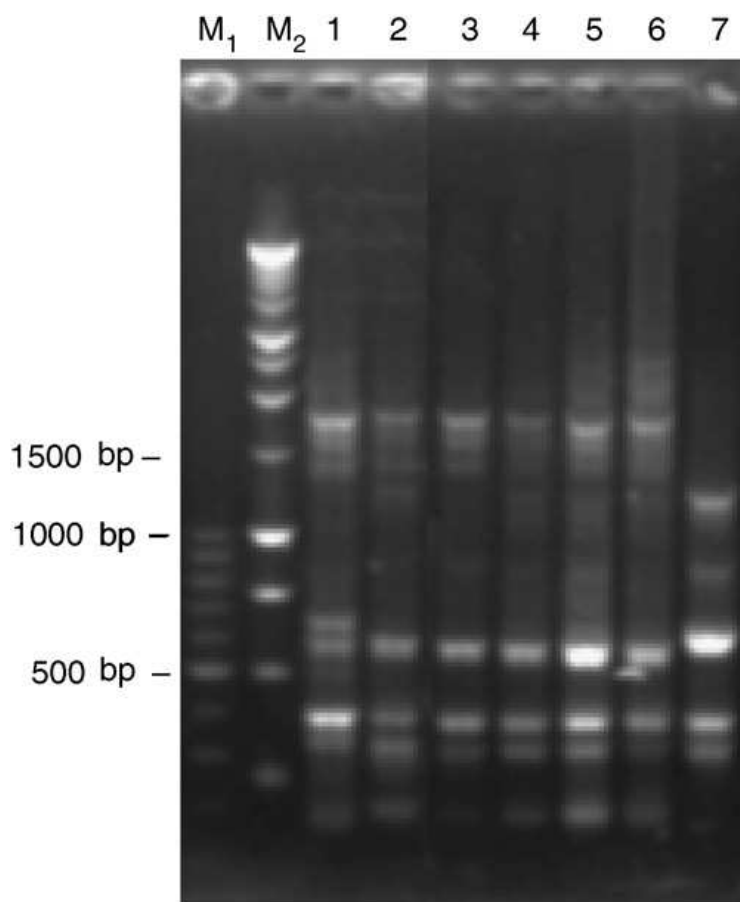


FIGURA 3: impressões de sete isolados de *S. aureus* representando os grupos II (1-6) e III (7) (REINOSO et al., 2008).

De acordo com os resultados da análise de REP-PCR, os isolados de *S. aureus* de humanos era bem distintos dos perfis genéticos dos isolados bovinos. Foi realizada também a identificação e caracterização molecular do patógeno por amplificação de PCR de genes de virulência. A determinação do tamanho da região de codificação do gene *spa* da ligadora a IgG revelou um tamanho de *amplicon* idêntico, aproximadamente 900bp, em 42 isolados de *S. aureus*, indicando que o gene *spa* desses isolados codifica cinco domínios de ligação a IgG. Entretanto, o gene *spa* de três isolados humanos produziram *amplicons* de tamanho de 700pb, sugerindo a falta de um domínio (REINOSO et al., 2008).

A amplificação da região X de codificação de parte do gene *spa* produziu diferentes tamanhos de *amplicons* para os isolados humanos, bovinos e de amostras de alimentos, com uma relação específica entre o número de repetição e a origem. A amplificação do gene *coa* dos isolados apresentou vários polimorfismos gênicos. Um *amplicon* de 700pb estava presente em sete isolados de infecções humanas, indicando a presença de sete repetições. Por outro lado, seis isolados bovinos apresentaram *amplicon* de tamanho de 900pb (FIGURA 4). De acordo com o tamanho dos *amplicons* exibidos pela amplificação da região X e do gene *coa*, os isolados de amostras de alimentos parecem ser relacionados a cepas bovinas. A amplificação do gene do fator de aglomeração A (*clfA*) revelou um único tamanho de *amplicon* de aproximadamente 1.000pb, indicando nenhum polimorfismo no tamanho e nenhuma diferença significativa entre os isolados de *S. aureus*. No estudo, 21 isolados de *S. aureus* portavam o gene *cap5*, e sete, o gene *cap8*, e 17 isolados foram negativos para ambos os genes. O gene *can* foi detectado em apenas cinco cepas humanas (REINOSO et al., 2008).

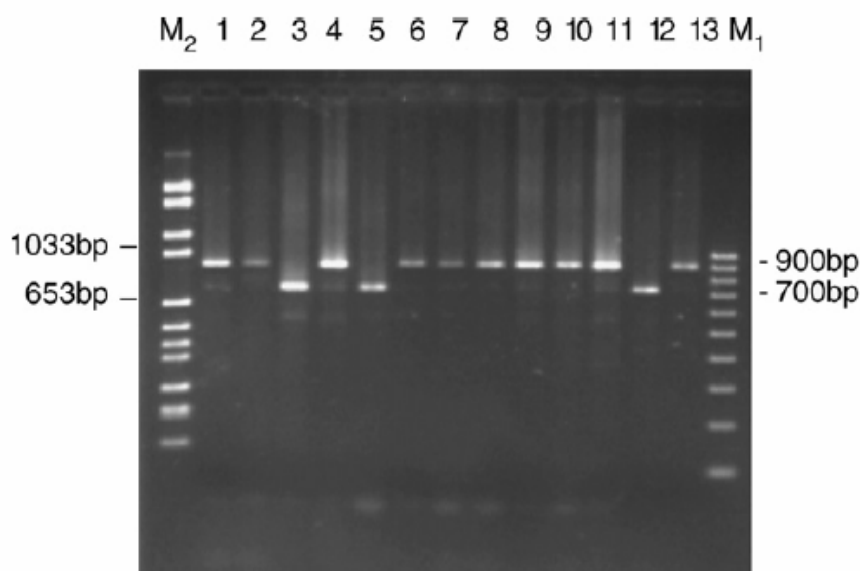


FIGURA 4: Amplicons de segmentos de gene *spa* de codificação da região ligadora de IgG com tamanhos 700pb (3, 5 e 12) e 900pb (1, 2, 4, 6 – 11, 13)(REINOSO et al., 2008)

Proteômica de fatores de virulência de *S. aureus*

As proteínas de superfície associadas a parede celular expressas por *S. aureus* possuem um importante papel na virulência e formação do biofilme. Em particular, em infecções intramamárias bovinas, os componentes de superfície

desempenham um papel fundamental na adesão bacteriana ao tecido mamário do hospedeiro e na resistência a fagocitose por células do leite. Além disso, os constituintes da parede celular detêm algumas respostas sobre a resistência em cepas diferentes (TAVERNA et al., 2007).

O estudo de TAVERNA et al. (2007) teve como objetivo a obtenção de um mapa de referência pelo método de eletroforese bidimensional de proteínas de superfície, isoladas de uma cepa de *S. aureus* selecionada por suas características de virulência e por promover mastite em vacas. A cepa *S. aureus* 1673 foi isolada de um caso de mastite subclínica bovina. As principais características genéticas do isolado são: coagulase positivo, proteína ligadora de colágeno negativo, proteína ligadora do fibrinogênio positivo, proteína A positivo e enterotoxinas G e I positivo. Foi realizada a análise de eletroforese bidimensional (2-DE) para separação de proteínas. A identificação e a caracterização foram realizadas pela técnica de espectrometria de massa, MALDI-TOF. Muitas proteínas foram encontradas na faixa ácida e muitas delas, de 30 a 150 kDa, foram representadas por um padrão indicativo de múltiplas formas do mesmo polipeptídeo, sugerindo um possível processo pós-traducional ou artefatos experimentais (FIGURA 5).

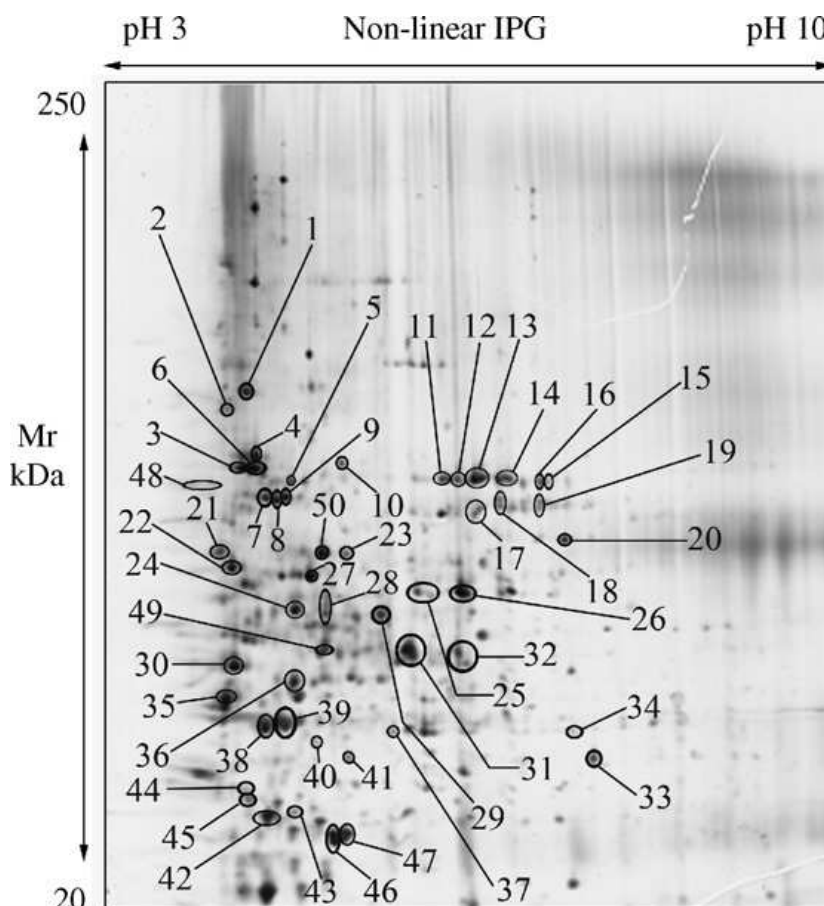


FIGURA 5: Gel de eletroforese bidimensional de proteínas associadas a superfície de *S. aureus*. Os números de referência dos pontos estão listados no quadro 1 (TAVERNA et al., 2007).

Na análise de eletroforese bidimensional, a maioria das proteínas migrou de acordo com o ponto isoelétrico e peso molecular. A identificação das proteínas

confirmou que a amostra, após o tratamento com lisostafina, foi enriquecida com proteínas com padrões de hélices transmembranas, incluindo proteínas associadas à parede celular, ou ao menos temporariamente associadas à parede celular por analogia a suas localizações em outros microrganismos. A sequência de peptídeos sinalizadores, cujo alvo são proteínas de secreção, estavam presentes em 11 pontos (7-10, 23, 24, 36, 38, 39, 49, 50). Os pontos 7-10 e 48 foram identificados como adesinas já conhecidas. 25 pontos foram identificados como proteínas de hélices transmembranas (2, 7-10, 14-24, 26-28, 36, 38, 39, 41, 49, 50) (TAVERNA et al., 2007).

Por outro lado, 16 proteínas (1, 3-6, 11-13, 25, 29-35, 37, 40, 42-45) não tiveram nenhuma sequência sinalizadora ou padrão de hélice transmembrana conhecidos. Entre elas, quatro proteínas foram descritas como associadas à membrana ou como proteína putativa de membrana; cinco proteínas apresentam propriedades hidrofóbicas, o que talvez permita que estas se associem a bicamada lipídica (1, 11, 13, 37, 42, 45). Apenas sete das 33 proteínas descritas (50 pontos) não são preditas de serem associadas à parede celular ou à membrana, porém sugere-se que as proteínas *EF-TU* (3-6), alquil-hidróxido-redutase (30 e 31), e proteínas hipotética *ansA* (34) podem se associar a membrana temporariamente (TAVERNA et al., 2007).

QUADRO 1: Proteínas identificadas por espectrometria de massa (TAVERNA et al., 2007)

Número	Proteína identificada
Transporte e ligação	
7-10	Proteína A ligadora a IgG
35	Proteína de transporte ABC ligadora a ATP
36	Proteína ligadora de membrana dependente de sistemas de transporte
48	Proteína ligadora de fibronectina
Metabolismo de parede celular	
20	Fator essencial para expressão da resistência a meticilina (<i>FemA</i>)
23	Enzima de síntese de polissacarídeo capsular
24	Serina-tipo-D-Ala-D-Ala Carboxipeptidase
46, 47	Proteína putativa de membrana
Metabolismo energético	
22	ATP sintase de cadeia beta
26	Álcool desidrogenase
27, 28	Piruvato desidrogenase componente E ₁
37	Frutose-bifosfatoaldolase classe 1
Metabolismo de aminoácidos	
14	Formato-tetrahidrofolatoligase
15, 16	Formil-tetrahidrofolatosintetase
17-19	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase
29	D-isômero específico 2-hidroxiácido desidrogenase putativa
34	Proteína putativa hipotética
41	Naftoatosintetase
Detoxificação	

11-13	Catalase
30, 31	Alquil-hidroperóxidoreductase
42, 43	Superóxido dismutaseSodA
Regulação de transcrição	
32	Proteína de controle de catabolito A
33	Repressor pleiotropico de transcrição codY
40	Proteína hipotética SA1666
Síntese proteica	
1	Proteína DnaK
2	GroEL
3-6	Fator translacional de alongação TU
44, 45	Proteína 50S ribossomal L4
Outras	
21	Proteína putativa de membrana
25	Proteína hipotética SA2098
38, 39	Lipase A/ Esterase
49	Exotoxina
50	Proteína putativa exportada

No estudo realizado por MARÉCHAL et al., (2011) com cepas de *S. aureus* O11 e O46 isolados de mastite subclínica e gangrenosa de ovelhas, além da comparação genômica foram realizadas comparações dos perfis proteômicos entre as duas cepas. As amostras de proteínas representando frações totais, de parede celular e extracelular foram preparadas de isolados de O11 e O46 com crescimento em condições anaeróbicas, para simular o contexto *in vivo* da infecção. A imagem das análises identificou 41 pontos de expressão diferentes, sendo a maioria deles observado em amostras extracelulares. A maior parte das proteínas comuns entre O11 e O46 é proveniente dos extratos de proteínas totais e de parede celular, entretanto, algumas diferenças foram observadas, principalmente em função de diferenças de volume. Em geral 17 proteínas de frações de proteínas totais e de parede celular foram super produzidas por O11, e oito por O46, com várias categorias funcionais, como metabolismo, processos celulares, entre outras (MARÉCHAL et al., 2011). Por outro lado, o proteoma extracelular revelou diferenças mais pronunciadas (FIGURA 6). A maioria das proteínas, 28 entre as 35 proteínas, que diferem entre O11 e O46, foram super produzidas por O11 no gel 2-DE de frações extracelulares, e essas estavam diretamente implicadas na virulência (32%), como exemplo as proteínas *LukE*, *LukM*, *Hla*, *Hlg* e *Sbi*; ou participavam no metabolismo celular ou outro processo, como exemplo as proteínas *IsdA*, *B*, *C*, e *H*, envolvidos no metabolismo do ferro (MARÉCHAL et al., 2011).

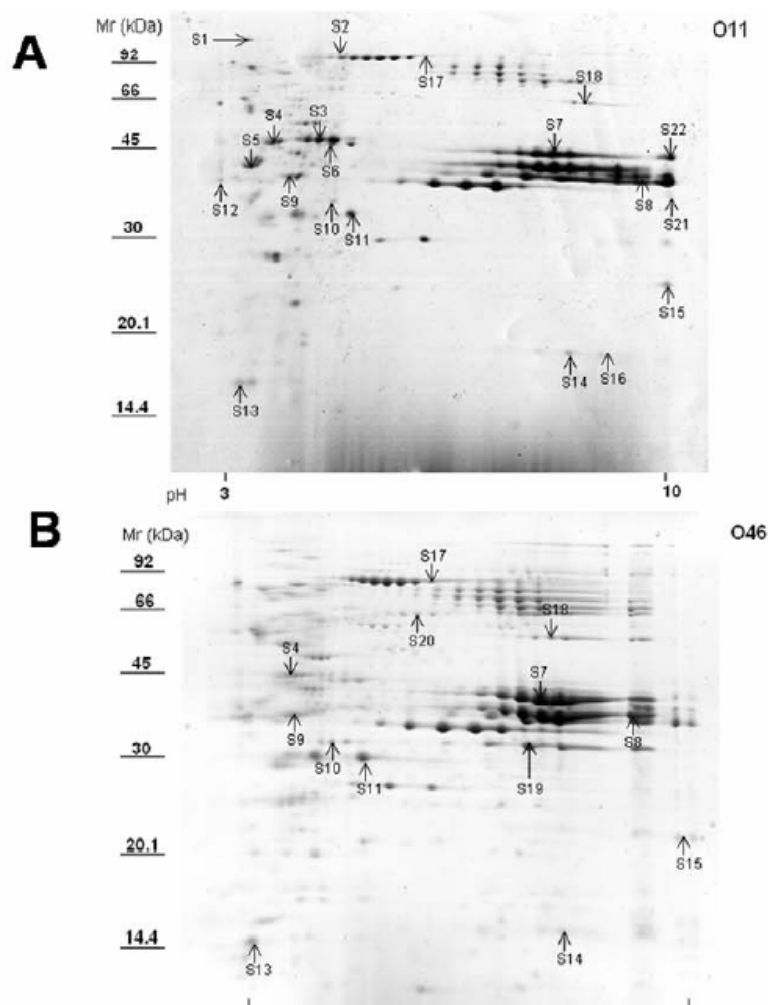


FIGURA 6: Comparação de exoproteínas produzidas por *S. aureus* isolados de mastites clínicas e subclínicas. A: representativo do gel 2-DE de proteínas secretadas por O11, B: representativo do gel 2-DE de proteínas secretadas por O46 (MARÉCHAL et al., 2011)

Algumas diferenças na expressão proteica podem ser explicadas pela presença de deleções em uma das duas cepas, o que resulta em uma diferença no transcriptoma ou proteoma. Esse é o caso, por exemplo, de *IdsH*, o qual contém uma deleção de 1.215pb em O46, e *IsdA*, no qual o gene contém uma inserção de 45pb em O46. Outra observação interessante é que algumas proteínas são super expressas por um isolado na fase log e por outro isolado durante a fase estacionária, *lukE* e *nuc* são super expressas na fase log a nível de transcriptômica e proteômica por O46, mas é super produzida por O11 durante a fase estacionária a nível de proteômica (MARÉCHAL et al., 2011).

A comparação proteômica revelou que O11 super-expressa gene de codificação de exoproteínas, enquanto que O46 super-expressa genes de codificação de componentes de superfície. Os resultados indicam que vários sistemas contribuem com a severidade da mastite, incluindo MGE, metabolismo de ferro, produção de exotoxinas e reguladores sigma (MARÉCHAL et al., 2011).

No estudo de TEDESHI et al. (2009), foi utilizada uma cepa de *S. aureus* 1673 isolada de um caso de mastite subclínica bovina, com características genéticas de coagulase positivo, proteína ligadora de colágeno negativo, proteína ligadora de fibrinogênio positiva, proteína A positivo, e enterotoxina G e I positivo; para a identificação de proteínas imunogênicas pela análise sorológica do proteoma, pelos métodos de eletroforese bidimensional e de espectrometria de massa MALDI-TOF. Nesse estudo, três proteínas altamente imunogênicas foram identificadas, são elas: DNA translocase FtsK, proteína ribossomal S1 e uma proteína hipotética que apresenta alta similaridade com a família de proteínas semelhante a tell, associadas a resistência a telurito (te_R). A proteína DNA translocase FtsK é requerida para a replicação, recombinação e transferência do DNA entre células e possui um domínio N-terminal com cinco hélices transmembranas. A proteína ribossomal S1 possui um domínio transmembrana hipotético, além de apresentar moléculas com boas propriedades antigênicas. A análise foi centrada no proteoma de frações de superfície, principalmente por duas razões: as proteínas de superfície são mais adequadas para o desenvolvimento de vacinas; e as amostras são menos complexas que os proteoma totais, garantindo melhor separação e identificação mais confiável das proteínas imunogênicas (TEDESHI et al., 2009).

WOLFF et al., (2011) realizaram um estudo de caracterização proteômica com 16 isolados de *S. aureus* de vacas com mastite clínica ou subclínica em diferentes regiões geográficas. Todos os isolados foram identificados por análises microbiológicas convencionais e foram detectados os genes de codificação de coagulase (*coa*) e termonuclease (*nuc*). A análise proteômica foi realizada pelos métodos de eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massa MALDI-TOF, no qual foram identificadas 232 proteínas extracelulares diferentes, sendo que 74 dessas possuem sequências sinalizadoras específicas para o mecanismo translocacional Sec-dependente, sendo 44 destas caracterizadas como extracelular e oito associadas à parede celular.

Outra observação de WOLFF et al., (2011) foi a identificação nos exoproteomas de isolados de mastite bovina de seis proteínas associadas a membranas e de 139 proteínas citoplasmáticas, como esperado devido ao estudo genômico prévio. Os padrões de proteínas extracelulares tiveram variações consideráveis entre os diferentes isolados. Apenas uma proteína (*LtaS*) foi encontrada no exoproteoma de todos os isolados; onze proteínas (*Atl*, *Nuc*, *SAB0566*, *GlpQ*, *Hla*, *SAB2176*, *SspA*, *SspB*, *Aur*, *SAB0846*, e *PdhB*) foram expressas em pelo menos 80% dos isolados, com oito dessas sendo proteínas secretadas. Quinze proteínas extracelulares foram secretadas por, no máximo, três dos 16 isolados, sendo algumas destas proteínas caracterizadas como fatores de virulência, como a toxina 1SAGs da síndrome do choque tóxico, *SEC-bov* e *SEL*, serina proteases *SpIB*, *C* e *F*, a proteína inibitória de FPRL1 (*FLPr*), *HysA1eHysA2*, *Pbp2*, *Ssl11*, e *Ssl9*; mas também foram encontradas proteínas com funções desconhecidas (*SAB0739*, *SAB1980c*, e *SAB2421c*) (WOLFF et al., 2011).

Foram encontrados quatro grupos de isolados com composições genéticas muito similares: (i) D8-628.24 e D8-644.15, (ii) N305, 377, e D4-106.06, (iii) D9-780.07e D9-798.19; e (iv) A, B, C, F. A similaridade genética foi refletida pelos padrões de expressão proteica similares, exemplificado pelos isolados N305 e 377. Entretanto, mesmo isolados com genes de virulência muito similares, os padrões de exoproteínas se diferem, isto pode ser exemplificado pela comparação da expressão de tais proteínas, no qual o gene estava conservado, nos isolados A, B, C e F. Dos 82 genes conservados, os produtos de 20 genes foram identificados

no proteoma extracelular de apenas um dos isolados; apenas seis proteínas (*Aur*, *Hlb*, *LukD*, *Luk-PV*, *LukMeSspA*) foram secretados por todos os quatro isolados, enquanto que 14 proteínas foram expressas por no máximo dois isolados. Assim, conclui-se que a variabilidade na regulação da expressão de genes de virulência, em particular na falta de expressão de alguns genes, está ligada a especificidade do hospedeiro do patógeno *S. aureus* (WOLFF et al., 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite causada por *S. aureus* é uma enfermidade importante para a produção leiteira, que provoca perdas econômicas incluindo custos com tratamento e diagnóstico, descarte de animais enfermos, queda na quantidade de leite produzida, entre outros. Assim, o estudo das características moleculares do patógeno é importante, uma vez que permite o entendimento das interações hospedeiro-patógeno.

Estudos relacionados à genômica de fatores de virulência de *S. aureus* provenientes de casos de mastite são frequentes, porém uma limitação para estes estudos com isolados de origem animal é que as análises de microarranjo de DNA são específicas para genes de cepas humanas, assim, não é possível detectar genes de microrganismo *S. aureus* direcionados para as relações hospedeiro-patógeno; obtendo resultados pouco significativos em relação às reais características moleculares de virulência dos patógenos quando estes estão associados em enfermidades animais, principalmente pelo fato de não se ter ensaios analíticos para detectá-las.

Comparado a análises proteômicas do leite bovino ou análises genômicas de patógenos de origem alimentar ou de mastites, poucos dados relacionados às mudanças no perfil proteômico de patógenos causadores de mastite estão disponíveis, provavelmente devido à ênfase dada em análises genômicas nos anos anteriores, e também pelo fato de que a proteômica comparativa ainda é uma tecnologia recente no âmbito das ciências veterinárias e de alimentos.

É importante ressaltar, então, que estudos genômicos e proteômicos para identificar especificamente os principais agentes moleculares promotores de enfermidades e da severidade desta, em animais, precisam ser desenvolvidos, para que a relação hospedeiro animal-patógeno seja elucidada e para, futuramente, identificação de novas drogas e opções terapêuticas.

REFERÊNCIAS

BARLOW, J. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. **Journal of Mammary Gland, Biology and Neoplasia**, v. 16, n.4, p. 383-407, 2011.

BROKER, B. M.; BELKUM, A. Immune proteomics of *Staphylococcus aureus*. **Proteomics**, v. 11, n.15, p. 3221-3231, 2011.

CAPURRO, A.; ASPÁN, A.; ERICSSON UNNERSTAD, H.; PERSSON WALLER, K.; ARTURSSIN, K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 180-191, 2010.

DEKKER, J. P.; BRANDA, J. A.; MALDI-TOF Mass spectrometry in clinical microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 33, n. 12, p. 87-93, 2011.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causados por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Revista Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FEBLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n.4, p. 619-625, 2010.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Revista Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1228-1234, 2006.

FRANÇOIS, P.; SCHERL, A.; HOCHSTRASSER, D.; SCHERENZEL, J. Proteomic approaches to study *Staphylococcus aureus* pathogenesis. **Journal of Proteomics**, v. 73, n.4, p. 701-708, 2010.

GAO, J.; FERRERI, M.; YU, F.; LIU, X.; CHEN, L.; SU, J.; HAN, B. Molecular typer and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis is a single herd in China. **The Veterinary Journal**, v. 192, n.3, p. 550-552, 2012.

HALASA, T.; NIELEN, M.; DE ROOS, A. P.; VAN HOORNE, R.; DE JONG, G.; LAM, T. J.; VAN WERVEN, T.; HOGEEVEEN, H. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch Dairy cows estimated with a test day model. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 599-606, 2009.

HECKER, M.; DORTE, B.; FUCHS, S.; ENGELMANN, S. A proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n.2-3, p. 76-87, 2010

HWANG, S. Y.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; PARK, Y. H. *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, p. 125-131, 2010.

JAMESDANIEL, S.; SALVI, R.; COLLING, D. Auditory proteomics: Methods, accomplishments and challenges. **Brain Research**, v. 11, n.2, p. 24-36, 2009.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n.2, p. 203-216, 2012.

KOHLER, C.; WOLFF, S.; ALBRECHT, D.; FUCHS, S.; BECHER, D.; BUTTNER, K.; ENGELMANN, S.; HECKER, M. Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* in growing and non-growing cells: A physiological approach. **International Journal of Medical microbiology**, v. 295, n. 8, p. 547-565, 2005.

KOSKINEN, M. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 952-959, 2009.

KOSKINEN, M. T.; WELLENBERG, G. J.; SAMPIMON, C. O.; HOLOPAINEN, L.; ROTHKAMP, A.; SALMIVIKI, L.; VAN HAERINGEN, W. A.; LAM, T. J. G. M.; PYÖTÄLÄ, S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5707-5715, 2010.

KURODA, M.; OHTA, T.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMTSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 357, n. 9264, p. 1225-1240, 2001.

LE MARECHAL, C.; SEYFFERT, N.; JARDIN, J.; HERNANDEZ, D.; JAN, G. I.; RAULT, L.; AZEVEDO, V.; FRANÇOIS, P.; SCHRENZEL, J.; van de GUCHTE, M.; EVEN, S.; BERKOVA, N.; THIERY, R.; VAUTOR, E.; FITZGERALD, J. R.; LE LOIR, Y. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Bacteriology**, v.6, n. 11, p., 2011.

L-SUNG, J. M.; LLOYD, D. H.; LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Journal of Microbiology**, v. 154, n.7, p. 1949-1959, 2008.

MICHEL, A.; SYRING, C.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Intramammary infections with the contagious *Staphylococcus aureus* genotype B in Swiss dairy cows are associated with low prevalence of coagulase-negative staphylococci and *Streptococcus spp.* **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 313-317, 2011.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

NEIDHARDT, F. C. How microbial proteomics got started. **Proteomics**, v. 11, n.15, p. 2943-2946, 2011.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OTTO, A.; BERNHARDT, J.; HECKER, M.; BECHER, D. Global relative and absolute quantitation in microbial proteomics. **Current opinion in Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 364-372, 2012..

PICCININI, R.; TASSI, R.; V, D.; PILLA, R.; FENNER, J.; CARTER, B.; ANJUM, M. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n 2. p. 1-7, 2012.

RADHOUANI, H.; PINTO, L.; POETA, P.; IGREJAS, G. After genomics, what proteomics tools could help us understand the antimicrobial resistance of *Escherichia coli*? **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 10, p. 2773-2789, 2012.

REINOSO, E. B.; EL-SAYED, A.; LAMMLER, C.; BOGNI, C.; ZSCHOCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Journal of Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 314-322, 2008.

SANTOS, M. V.; TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L. Novas estratégias para o tratamento da mastite bovina. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p. 131-137, 2011.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 53-57, 2012.

TAVERNA, F.; NEGRI, A.; PICCININI, R.; ZECCONI, A.; NONNIS, S.; RONCHI, S.; TEDESHI, G. Characterization of cell wall associated proteins of a *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis case by a proteomic approach. **Journal of Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 240-247, 2007.

TEDESHI, G.; TAVERNA, F.; NEGRI, A.; PICCININI, R.; NONNIS, S.; RONCHI, S.; ZECCONI, A. Serological proteome analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from sub-clinical mastitis. **Journal of Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3-4, p. 388-391, 2009.

VAUTOR, E.; COCKFIELD, J.; LE MARECHAL, C.; LE LOIR, Y.; CHEVALIER, M.; ROBINSON, D. A.; THIERY, R.; LINDSAY, J. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. **Journal of Veterinary Research**, v. 40, n.6, p., 2009.

WOLFF, C.; KUSCH, H.; MONECKE, S.; ALBRECHT, D.; HOLTFRETE, S.; von EIFF, C.; PETZL, W.; RAINARD, P.; BROKER, B. M.; ELGEMANN, S. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. **Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 2491-2501, 2011.

YANG, X.; LU, J.; SUN, X.; HE, Q. Application of subproteomics in the characterization of Gram-positive bacteria. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 10, p. 2803-2810, 2012.