

MARY HELLEN ARAÚJO FABRES

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOREATIVAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADO DE MASTITE BOVINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2010

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

T

F123i
2010
Fabres, Mary Hellen Araújo, 1981-
Identificação de proteínas imunoreativas de
Staphylococcus aureus isolados de mastite bovina / Mary
Hellen Araújo Fabres. – Viçosa, MG, 2010.
xiv, 38f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 30-38.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Antígenos. 3. Biblioteca
genômica. 4. Mastite. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 579.353

MARY HELLEN ARAÚJO FABRES

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOREATIVAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADO DE BOVINA ESTAFILOCÓCICA**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2010

Prof^ª. Maria Cristina Baracat-Pereira
(Coorientadora)

Prof. Luciano Gomes Fietto

Dra. Maria Aparecida V. de Paiva Brito

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Prof^ª. Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Orientadora)

A Deus

Aos meus pais, Sandra e Arildo (*in memoriam*)

Ao meu noivo, Raphael

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar nos momentos de dificuldade;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade e pelo apoio acadêmico e institucional;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

Aos meus pais Sandra e José Arildo (*in memoriam*), pelo amor, dedicação e por não medirem esforços para que eu pudesse seguir em frente sempre;

Ao meu noivo Raphael, por tudo o que vivemos e ainda vamos viver juntos. Pelo amor, carinho, dedicação, paciência e amizade.

À professora e orientadora Andréa de Oliveira Barros Ribon, por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos, que me levaram à execução e conclusão desta dissertação.

Aos professores Luciano e Juliana Fietto, pela amizade, orientação e ensinamentos de vida que levarei comigo.

À professora Maria Cristina Baracat-Pereira, pelas sugestões e por se disponibilizar a participar da banca examinadora.

Aos professores Leandro Licursi de Oliveira e Sérgio Oliveira de Paula, pelos conselhos notáveis para o aprimoramento deste trabalho e por se disponibilizarem a participar da banca examinadora.

À Maria Aparecida V. de Paiva Brito, por ceder gentilmente as cepas utilizadas neste trabalho e por participar da banca examinadora.

Aos meus irmãos Bianca e Júnior, pelo amor e alegria de viver;

A toda minha família, pelo incentivo e amor concedidos. Em especial às minhas avós Maria e Luzia, pelo exemplo de vida e minha tia Elaine, pela amizade.

À família do meu noivo Raphael, pela atenção e por torcer pelo meu sucesso.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular, pela convivência agradável e pelo apoio, Ancely, Marina, Carlos, Daniela, Mariana, Adiverson, Héllida, Mário, Zamira, Ananda, Danielle, Silvana e Aline.

Ao Eduardo secretário do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela competência, apoio e amizade;

Ao Luis Eugênio Augusto Franklin, pela ajuda na imunização dos coelhos e por sua amizade;

A todos os amigos de Viçosa, pela convivência e amizade, e a todos os demais que me incentivaram e torceram por minha vitória.

A todos os professores: “Ensinar é um exercício de imortalidade, o professor de alguma maneira se eterniza naqueles que aprenderam a ver o mundo pela magia de suas palavras, o professor assim não morre jamais” (Rubem Alves).

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo trabalho imprescindível.

BIOGRAFIA

Mary Hellen Araújo Fabres, filha de José Arildo Fabres e Sandra Araújo Fabres, nasceu na cidade de Vitória, Espírito Santo, em 17 de julho de 1981.

Em dezembro de 1998 completou o ensino médio no Centro Educacional Neo em Vitória.

Em março de 2003, ingressou no bacharelado em Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se em janeiro de 2008.

Ingressou no Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola em março de 2008, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA E TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	
4.1. Microrganismos utilizados e condições de cultivo.....	11
4.2. Produção de anticorpos policlonais anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	11
4.3. Preparo de <i>Escherichia coli</i> DH5 α eletrocompetentes.....	12
4.4 Construção e <i>Screening</i> da biblioteca genômica.....	12
4.6 Sequenciamento do DNA plasmidial e análises de bioinformática.....	13
4.7. Preparo de extratos protéicos.....	13
4.9 <i>Western Blotting</i>	14
4.10 Digestão <i>In-gel</i> e sequenciamento MALDI-TOF/TOF.....	15
5. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÕES.....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. <i>Western blotting</i> utilizando soro pré-imune ou imune.....	16
Figura 2. <i>Screening</i> imunológico de biblioteca genômica de <i>Staphylococcus aureus</i> com antisoro de animal imunizado com extrato de proteínas estafilocócicas totais.....	17
Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial extraído dos clones positivos.....	17
Figura 4. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 14% contendo dodecil sulfato de sódio de extratos de proteínas secretadas e de parede célula.....	23
Figura 5. <i>Western blotting</i> utilizando antisoro FL ou antisoro FE de extrato de proteínas secretadas e de proteínas parede celular.....	24
Tabela 1. Alinhamento das sequências dos clones imunoselecionados com o genoma de <i>Staphylococcus aureus</i> RF122.....	18
Tabela 2. Distribuição das proteínas identificadas entre micro-organismos causadores de mastite bovina.....	20

LISTA DE ABREVIACOES

- ACN – Acetonitrila
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- B. cereus* - *Bacillus cereus*
- B. thuringiensis* - *Bacillus thuringiensis*
- BHA - gar infusão cérebro-corao
- BHI - Caldo infusão cérebro-corao
- BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA -Albumina bovina sérica
- C. kroppenstedtii* - *Corynebacterium kroppenstedtii*.
- CCS - Contagem de células somáticas
- CMT - *California Mastitis test*
- CNPGL - Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite
- CNS - *Staphylococci* coagulase negativo
- D.O. - Densidade ptica
- DAB - Tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina
- E. coli* - *Escherichia coli*
- E. faecalis* - *Enterococcus faecalis*
- E. faecium* - *Enterococcus faecium*
- Efb - Proteína de ligao ao fibrinogênio
- ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FAO - *Food and Agriculture Organization*
- FE - Fase estacionária
- FL - Fase logarítmica
- H. cinaedi* - *Helicobacter cinaedi*
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IMI - Infeco intramamária
- kb – Kilobases
- kDa – KiloDaltons
- L. innocua* - *Listeria innocua*
- L. monocytogenes* - *Listeria monocytogenes*

LB - Luria-Bertani
LDH - Lactato Desidrogenase
MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
NAGase - N-acetil- β -D-glucosaminidase
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NMC - National Mastitis Council
P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SERPA - *Serological proteome analysis*
Staph. aureus - *Staphylococcus aureus*
Staph. capitis - *Staphylococcus capitis*
Staph. carnosus - *Staphylococcus carnosus*
Staph. caseolyticus - *Staphylococcus caseolyticus*
Staph. chromogenes - *Staphylococcus chromogenes*
Staph. epidermidis - *Staphylococcus epidermidis*
Staph. haemoliticus - *Staphylococcus haemoliticus*
Staph. hominis - *Staphylococcus hominis*
Staph. hyicus - *Staphylococcus hyicus*
Staph. intermedius - *Staphylococcus intermedius*
Staph. saprophyticus - *Staphylococcus saprophyticus*
Staph. warneri - *Staphylococcus warneri*
Staph. xylosus - *Staphylococcus xylosus*
Strep. agalactiae - *Streptococcus agalactiae* ,
Strep. bovis - *Streptococcus bovis*
Strep. dysgalactiae - *Streptococcus dysgalactiae*
Strep. equi - *Streptococcus equi*
Strep. gordonii - *Streptococcus gordonii*
Strep. infantarius - *Streptococcus infantarius* ,
Strep. mutans - *Streptococcus mutans*
Strep. salivarius - *Streptococcus salivarius*

Strep. suis - *Streptococcus suis*

Strep. uberis - *Streptococcus uberis*

TCA - Ácido tricloroacético

TFA - Ácido trifluoroacético

U – Unidades

RESUMO

FABRES, Mary Hellen Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Identificação de proteínas imunoreativas de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: Maria Cristina Baracat-Pereira e Sérgio Oliveira de Paula.

A mastite estafilocócica é uma infecção comum que pode evoluir para a forma crônica. O diagnóstico precoce é de grande importância devido ao elevado custo da mastite, além dos riscos para a saúde humana. Essa pesquisa visou à identificação de proteínas imunogênicas para fins de diagnóstico da mastite causada por *Staphylococcus aureus*. Dentro deste propósito foi utilizada a técnica de Western blotting para seleção de imunógenos específicos expressos durante a infecção. Para isso foram preparados extratos protéicos de *Staph. aureus* ATCC 33591, *Staph. aureus* 3993, 4124 e 4163, além de outros patógenos relacionados à mastite como *Staph. epidermidis*, *Staph. intermedius*, *Staph. chromogenes*, *Staph. hyicus* coagulase positivo e *Strep. agalactiae*. As proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE 14% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. A imunodeteção foi realizada com antisoro produzido a partir de extrato de proteínas totais preparadas de culturas na fase estacionária (FE) ou logarítmica (FL). Na imunodeteção das proteínas secretadas e das proteínas de parede celular com extrato obtido na FE foram observadas duas e cinco bandas específicas, respectivamente, que foram excisadas do gel e submetidas à digestão trípica para o sequenciamento por espectrometria de massa. Outra estratégia para seleção de proteínas imunogênicas foi a construção uma biblioteca genômica de *Staph. aureus* em vetor pUC18 usando fragmentos de DNA entre 0,5 e 8 kb. Para o *screening* da biblioteca, foi utilizado antisoro produzido a partir de extrato de proteínas totais do patógeno. Essa metodologia possibilitou a identificação de 74 clones positivos, entre os quais 20 foram selecionados para sequenciamento. As sequências de nucleotídeos foram alinhadas com o genoma de *Staph. aureus* RF122 de origem bovina, possibilitando a identificação de 18 diferentes *loci* que incluem proteínas relacionadas ao metabolismo, adesão, parede celular, toxinas, proteínas regulatórias, adesinas, proteínas de parede celular e proteínas hipotéticas. A proteína de ligação ao fibrinogênio (Efb) codificada pelo gene *fib* mostrou-se específica de *Staph. aureus* sendo, dessa forma, candidata promissora para o desenvolvimento de sorodiagnóstico para a mastite estafilocócica. As proteínas identificadas neste trabalho serão expressas e novamente ensaiadas por métodos imunológicos.

ABSTRACT

FABRES, Mary Hellen Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Identification of immunogenic proteins expressed by *Staphylococcus aureus* of bovine origin.** Advisor: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-advisors: Maria Cristina Baracat-Pereira and Sérgio Oliveira de Paula.

Staphylococcal mastitis is a highly prevalent pathogen of the mammary gland that may progress to a chronic state. The earlier diagnosis is very important due to the high cost of mastitis and risks to human health. This work aimed the identification of immunogenic proteins as target antigens for specific diagnosis of mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Within this purpose we used the Western Blotting method for the selection of specific immunogens expressed during infection. Protein extracts were prepared from cultures of the mastitis isolates *Staph. aureus* 3993, 4124, 4163, *Staph. epidermidis*, *Staph. intermedius*, *Staph. chromogens*, *Staph. hyicus* coagulase positive, and *Streptococcus agalactiae*. Proteins were resolved by SDS-PAGE 14% and electrotransferred on nitrocellulose membrane. The detection was performed with antisera raised against total protein extracts obtained from cultures grown until exponential or stationary phase. Two and five bands, respectively, were immunorevealed with extracts produced from secreted and cell-wall proteins obtained from stationary cultures. These bands, found only in *Staph aureus* strains, were excised from the gel, digested with trypsin and analyzed by mass spectrometry. Another approach for selection immunogens was constructed a genomic library of *Staph. aureus* was constructed in vector pUC18 using DNA fragments between 0.5 and 8 kb. Antiserum produced using bacterial protein extract was employed for library screening. This methodology enabled the identification of 74 positive clones and 20 were chosen for sequencing. Nucleotide sequences were aligned to the genome of *Staph. aureus* strain RF122, a causative agent of contagious bovine mastitis, and identified 18 different loci that included proteins related to metabolism, toxins, adhesion, bacterial cell-wall, as well as regulatory and hypothetical proteins. Analysis revealed that the fibrinogen-binding protein (Efb) encoded by the *fib* gene is unique to *Staph. aureus* and thus a promising candidate for the development of specific serodiagnostic assays. Further work is needed to sequence the eluted proteins and to express those identified from the genomic library.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque na pecuária leiteira mundial, possuindo um dos maiores rebanhos comerciais do planeta. No entanto, a produtividade de leite é baixa quando comparada aos países de maior desenvolvimento sócio-econômico. Parte do problema se deve à ocorrência endêmica e recorrente da mastite bovina, uma inflamação da glândula mamária, causada principalmente por micro-organismos, que pode se manifestar na forma clínica ou subclínica. Estima-se que as perdas decorrentes da mastite sejam duas vezes mais elevadas do que às relativas à infertilidade e as doenças reprodutivas (Cunha *et al.*, 2006). As estimativas no Brasil mostram que a queda na produção leiteira relacionadas à mastite varia de 12 a 15%, representando uma perda de 2,4 bilhões de litros de leite/ano (Dias, 2007). A doença também traz prejuízos para a indústria de laticínios e afeta diretamente a saúde pública.

Os principais agentes infecciosos causadores de mastite são as bactérias, sendo *Staphylococcus aureus* um dos patógenos de maior incidência. Estudos mostram que *Staph. aureus* está presente na maioria dos rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais (Brito *et al.*, 1999; Arcuri *et al.*, 2006). A mastite estafilocócica é um exemplo de infecção contagiosa, difícil de ser tratada e que, frequentemente, evolui para uma forma crônica (Barkema *et al.*, 2006). *Staph. aureus* isolados de animais com mastite são representados por clones especializados que possuem grande disseminação, o que dificulta o tratamento, pois a susceptibilidade antimicrobiana entre as cepas é diferente (Joo *et al.*, 2001).

A doença causada por *Staph. aureus* manifesta-se principalmente na forma subclínica onde o diagnóstico pode ser feito pela medição direta da contagem de células somáticas (CCS), ou indireta, pelo *California Mastitis Test* (CMT). O CMT é um teste muito usado por ser rápido e acessível aos produtores, além de poder ser realizado em campo. Não se recomenda, porém, que os resultados do teste CMT sejam usados na definição do tratamento, necessitando anteriormente a identificação do agente etiológico. Essa identificação auxilia na definição da estratégia de manejo a ser adotada para reduzir novos casos e influênciam as decisões de terapia e escolha de antibióticos (Sears e McCarthy, 2003). Por ser mais demorado, dificilmente o tratamento veterinário é subsidiado pelo resultado de uma cultura microbiológica.

A crescente exigência pela segurança alimentar e alta qualidade de produtos lácteos, juntamente com a pressão do mercado internacional por produtos de qualidade certificada, além dos custos associados a perdas, prevenção e tratamento da doença, são os principais fatores que direcionam para o desenvolvimento de estratégias mais efetivas de diagnóstico e controle da mastite estafilocócica em rebanhos leiteiros.

O desenvolvimento de ensaios rápidos, sensíveis e específicos para a detecção de organismos causadores de doenças se tornou uma prioridade entre as iniciativas voltadas para a saúde animal. Novas técnicas têm entrado no campo do diagnóstico precoce que têm por premissa a identificação de marcadores sorológicos da resposta inflamatória sistêmica (Bhatia e Basu, 2007) por meio da identificação de proteínas imunogênicas usando *immunoscreening* de bibliotecas genômicas e a análise sorológica de subproteomas (SERPA). A identificação de componentes imunogênicos tem se revelado uma estratégia promissora para a criação de novas metodologias de diagnóstico e fabricação de vacinas mais eficientes para a detecção e prevenção de infecções causadas por patógenos de animais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a identificação de proteínas imunogênicas para o diagnóstico de mastite bovina causada por *Staph. aureus*. As estratégias adotadas para atingir este objetivo foram a construção e o *screening* de uma biblioteca genômica com antisoro obtido de animal imunizado com extrato bruto de *S. aureus* e a seleção de imunógenos secretados e associados à parede celular bacteriana por meio de *Western Blotting*. Considerando a importância sócio-econômica da cadeia produtiva do leite para Minas Gerais, temos convicção do impacto que a pesquisa poderá representar para o agronegócio mineiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A América do Sul é responsável por 9,5% da produção mundial de leite, o que correspondeu a cerca de 52 milhões de toneladas em 2007 (FAO, 2007). Entre 1998 e 2007 a produção sul-americana aumentou 20% devido, em parte, ao crescimento significativo do rebanho bovino leiteiro. Brasil, Argentina e Colômbia são responsáveis por 80,5% da produção de leite da América do Sul (FAO, 2007). O Brasil contribui com 48% deste montante, o que o torna o maior produtor sul-americano e o sexto maior produtor mundial, ultrapassando a marca de 26 bilhões de litros de leite em 2007 (FAO, 2007). A região Sudeste é a grande responsável pela produção leiteira do país, sendo o estado de Minas Gerais o principal produtor com 7,3 bilhões de litros de leite (IBGE, 2007). Minas Gerais também ocupa a posição de estado com o maior rebanho de vacas em lactação, aproximadamente 5 milhões (IBGE, 2007).

O Brasil é um forte candidato a se tornar um grande exportador de lácteos, pois existe disponibilidade de terra, água e tecnologia, além do custo de produção ser competitivo. Porém, contrariando as expectativas, a produtividade brasileira está bem aquém da média mundial (Embrapa, 2009). Um dos fatores que contribuem para a baixa produtividade é a mastite bovina, doença caracterizada pela inflamação do parênquima da glândula mamária que promove uma série de alterações físicas e químicas do leite, bem como modificações patológicas no tecido glandular (Burton e Erskine, 2003).

O prejuízo devido à mastite bovina é de, aproximadamente, US\$ 35 bilhões em todo o mundo (Ruegg, 2005). Nos Estados Unidos, os custos anuais chegam a US\$ 2 bilhões (Rainard, 2005). Estima-se que o prejuízo brasileiro seja ainda maior que o alcançado nos EUA e na União Européia (Costa, 2009). As estimativas mostram que a redução na produção leiteira brasileira devido a mastite varia de 12 a 15%, o que representa uma perda de 2,4 bilhões de litros de leite/ano (Dias, 2007). Além das perdas em função da redução na produção, há gastos com medicamentos e assistência veterinária, dificuldade no controle do rebanho, descarte de leite contaminado após tratamento e descarte precoce de animais doentes (Cunha *et al.*, 2006).

A mastite também tem impacto negativo na saúde pública pela possibilidade de veiculação de micro-organismos, toxinas e resíduos de antimicrobianos no leite. Os riscos à saúde do consumidor são representados principalmente pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos,

por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores (Oliveira *et al.*, 1999).

A mastite é classificada, quanto à forma de apresentação, em clínica ou subclínica. A forma clínica é diagnosticada pelos sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, e/ou aparecimento de grumos, pus ou qualquer alteração das características visíveis do leite (Bradley *et al.*, 2002). Na forma subclínica, ao contrário da forma clínica, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere (Persson-Waller *et al.*, 2003). Nessa forma silenciosa, o animal infectado torna-se reservatório e pode espalhar a doença para todo o rebanho. O diagnóstico da infecção subclínica é mais difícil, uma vez que o leite tem aparência normal, e por isso é adicionado ao tanque de resfriamento localizado na propriedade (LeJeune e Rajala-Schultz, 2009). Na mastite subclínica registra-se elevada contagem de células somáticas (CCS), um indicador de infecção intramamária que vem sendo utilizado desde a década de 60 (Pyörälä, 2003).

A mastite pode ser causada por uma grande variedade de agentes, incluindo bactérias, leveduras, fungos e algas. Entretanto, a origem bacteriana é a mais frequente, sendo as espécies mais prevalentes são *Staph. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococci* coagulase negativo (CNS) e outras espécies de *Streptococcus* (Holtenius *et al.*, 2004). Dos agentes da mastite, *Staph. aureus* é o de maior incidência em diversos países (Bramley *et al.*, 1996; Barkema *et al.*, 2006). *Staph. aureus* é um patógeno Gram-positivo, não formador de esporos, produtor de enterotoxinas, imóvel, que forma agrupamentos em forma de cacho de uva e que pertence à classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* e família *Staphylococcaceae*. É uma bactéria anaeróbia facultativa, que se encontra amplamente distribuída na natureza, sendo homens e outros mamíferos seus principais reservatórios (Zschöck *et al.*, 2005).

A incidência de *Staph. aureus* pode variar de 27% a 69% de todos os casos de infecções intramamárias (IMI) em diversos países (Wilson *et al.*, 1997; Myllys *et al.*, 1998; Edinger *et al.*, 1999; Giannechini *et al.*, 2002; Makovec e Ruegg, 2003; Pitkala *et al.*, 2004; Osteras *et al.*, 2006; Reksen *et al.*, 2006; Bradley *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2007; Ericsson-Unnerstad *et al.*, 2008).

A prevalência de *Staph. aureus* na mastite clínica é de 3,3% a 40% (Elbers *et al.*, 1998; Bradley *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2007; Ericsson-Unnerstad *et al.*, 2008; Olde Riekerink *et al.*, 2008), e na mastite subclínica, pode chegar a 62% (Giannechini *et al.*, 2002; Pitkala *et al.*, 2004; Tenhagen *et al.*, 2006; Bradley *et al.*, 2007). No Brasil,

relatos de isolamento de *Staph. aureus* de mastite subclínica são conhecidos desde o início da década de 50 (Lacerda Jr. *et al.*, 1954). Desde então, trabalhos realizados nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do País mostraram a predominância de *Staph. aureus* sobre os demais agentes da doença (Brito e Brito, 1996).

A mastite estafilocócica é um exemplo de infecção difícil de ser tratada e que pode evoluir para uma forma crônica (Barkema *et al.*, 2006). Para iniciar a infecção, *Staph. aureus* penetra no canal do teto mamário, principalmente após a ordenha. Após a penetração, ocorre a expressão de moléculas associadas à superfície bacteriana, que se ligam às proteínas da matriz extracelular para a colonização do tecido hospedeiro, considerada etapa fundamental para a patogenicidade (Hauck e Ohlsen, 2006). Segue-se a liberação de toxinas e exoproteínas que favorecem a disseminação para os tecidos adjacentes (Hauck e Ohlsen, 2006). Estes produtos também são prejudiciais para as células produtoras de leite da glândula mamária e para os mecanismos de defesa imunológica da glândula, levando ao desenvolvimento da mastite (Sears e McCarthy, 2003).

A redução na prevalência da mastite estafilocócica é conseguida pela implementação de um Programa Básico de Controle de Mastite, usualmente conhecido por Programa de Cinco Pontos, onde são adotadas medidas preventivas e de higiene, que vão desde a limpeza dos equipamentos de ordenha até o descarte de animais com manifestação crônica (National Mastitis Council, 2001). O sucesso deste programa requer a rápida identificação dos animais infectados com *Staph. aureus* para impedir a disseminação do patógeno no rebanho. Já foi demonstrado que a detecção precoce da mastite pode aumentar em 60% a taxa de cura e reduzir o tempo necessário para recuperar a produção de leite normal quando combinada com terapêutica antimicrobiana adequada (Milner *et al.*, 1997).

O tratamento ideal para a mastite seria aquele que pudesse controlar a infecção sem deixar resíduos no leite. Porém, a antibioticoterapia é a prática mais adotada. Existe uma preocupação por parte das indústrias de laticínios com a persistência de resíduos de antibióticos no leite, decorrentes do uso extensivo de antimicrobianos nas propriedades leiteiras (Sawant *et al.*, 2005). A presença de resíduos, além de contribuir para a seleção de micro-organismos patogênicos resistentes, interfere na produção de derivados do leite, inviabilizando muitas vezes a produção e aumentando os prejuízos econômicos (Constable e Morin, 2003). Estudos demonstraram que ocorre persistência de antibióticos por um período maior que o estabelecido pelas indústrias farmacêuticas,

não só nos quartos tratados por via intramamária, como também nos quartos mamários não-tratados, o que demonstra a absorção do medicamento e a passagem para a corrente sanguínea (Gillespie *et al.*, 2002).

O diagnóstico precoce da doença é de grande importância em função dos prejuízos econômicos causados pela mastite e do risco para a saúde humana. Atualmente, os testes mais usados para a detecção da mastite incluem a contagem de células somáticas, análise enzimática do leite, e o teste *California Mastitis test* (CMT) (Viguié *et al.*, 2009). O CMT é um teste indireto de contagem de células somáticas no leite, que é amplamente utilizado pelos produtores por ser rápido e realizado em campo. O teste consiste na coleta de leite de cada quarto mamário em uma bandeja apropriada, onde é adicionado um detergente aniônico neutro que atua rompendo a membrana das células para liberação dos ácidos nucleicos. De acordo com a intensidade da reação, medida pelo nível de polimerização, ela pode ser classificada em negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (Fonseca e Santos, 2000). Entretanto, não se recomenda que os resultados do teste CMT sejam usados na definição do tratamento, uma vez que o agente etiológico não é identificado. A identificação do patógeno não é só importante para determinar a eficácia do tratamento antimicrobiano, mas também para monitorar e controlar a taxa de infecção do rebanho (Sears e McCarthy, 2003).

Métodos microbiológicos convencionais são os mais utilizados para a detecção de patógenos no leite, apesar da demora na obtenção dos resultados. Os métodos que envolvem a cultura bacteriana em meios não seletivos e seletivos como ágar-sangue, ágar-TKT (tálio, cristal violeta, toxina estafilocócica, 5% sangue de carneiro com 1% esculina) e ágar MacConkey são empregados para isolar os agentes da mastite, seguidos por ensaios bioquímicos para identificar bactérias e de testes para avaliar a suscetibilidade aos antibióticos. Estafilococos crescem bem em ágar-sangue, mas o crescimento é inibido em ágar-MacConkey e ágar-TKT (Sears e McCarthy, 2003). *Staph. aureus* pode produzir halos de hemólise incompleta ou completa em ágar-sangue, que o diferencia de outros *Staphylococcus*, sendo a confirmação final em nível de espécie feita pelo teste de coagulase e acetoina (Sears e McCarthy, 2003). Porém, resultados falso-negativo podem ser obtidos quando a mastite é induzida por bactérias capazes de sobreviver intracelularmente, como *Staph. aureus* (Phuektes *et al.*, 2003). Assim, dificilmente o tratamento veterinário é subsidiado pelo resultado de cultura microbiológica.

Alternativamente o diagnóstico da mastite pode ser feito pela avaliação de sinais que indicam os níveis de inflamação. A medição da temperatura corporal do animal pode ser realizada utilizando uma câmera térmica capaz de detectar mudanças de temperatura de 1 a 1,5°C (Colak *et al.*, 2008; Hovinen *et al.*, 2008). No entanto, esta abordagem não-invasiva pode ser afetada pela temperatura ambiente e, além disso, nem todos os casos de mastite levam ao aumento na temperatura (Viguier *et al.*, 2009). Testes que avaliam o pH e a condutividade elétrica do leite também podem ser utilizados para diagnosticar uma inflamação no úbere, mas não são sensíveis o suficiente para o diagnóstico conclusivo (Viguier *et al.*, 2009). Existem ainda ensaios colorimétricos e fluorimétricos que medem a concentração de enzimas que se encontram em níveis elevados durante a mastite, como as enzimas N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAGase) e a lactato desidrogenase (LDH) (Pemberton *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2005; Hiss *et al.*, 2007). Esses ensaios, além de não identificarem o patógeno, necessitam de pessoas treinadas e de laboratórios especializados (Viguier *et al.*, 2009).

Um esforço considerável vem sendo dedicado ao desenvolvimento de ensaios rápidos, sensíveis e específicos para a detecção de organismos causadores da doença. Os avanços tecnológicos, juntamente com o aumento da informação proteômica e genômica, resultaram em melhorias na sensibilidade dos testes utilizados para a detecção da mastite (Viguier *et al.*, 2009). Imunoensaios, como ELISA (enzyme-linked immunosorbent), foram desenvolvidos para a identificação de *Staph. aureus* e outras bactérias como, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Arora *et al.*, 2006). Mas, os autores concluíram que ainda, a cultura microbiológica dos resultados positivos é necessária para a confirmação do patógeno. Testes para identificação do micro-organismo baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), como PCR quantitativo e PCR *multiplex*, também foram desenvolvidos para diagnóstico e embora sejam sensíveis e específicos, o alto custo associado e a necessidade de pessoal capacitado inviabiliza o uso rotineiro (Phuektes *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2005; Cremonesi *et al.*, 2005; Gillespie e Oliver, 2005; Viguier *et al.*, 2009).

Novas tecnologias de diagnóstico utilizando dispositivos com microfluidos, os chamados *biochips* (também chamados de "*lab-on-a-chip*") (Garcia-Cordero e Ricco, 2008), vêm sendo testadas na detecção da mastite. Choi e colaboradores (2006) desenvolveram um *chip* para monitorar simultaneamente patógenos, células somáticas e o pH em amostras de leite cru. Anticorpos contra o patógeno e contra células somáticas

foram imobilizados no *chip* e os complexos antígeno-anticorpo formados foram detectados por de microscopia de fluorescência. Um *biochip* capaz de detectar sete espécies comuns na mastite incluindo *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strep. bovis*, *Strep. dysgalactiae*, e *Strep. uberis* foi desenvolvido por Lee e colaboradores (2008). Testes preliminares foram realizados utilizando 82 amostras de leite e comparados com métodos microbiológicos convencionais, das quais apenas um não ratificou a análise bacteriológica. Na teoria estes testes poderiam ser realizados em campo, mas ainda é necessário reduzir os custos para disponibilizá-los comercialmente e torná-los acessível aos produtores (Viguier *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, novas técnicas têm entrado no campo do diagnóstico precoce das infecções bacterianas que se baseiam na identificação de marcadores sorológicos da resposta inflamatória sistêmica (Bhatia e Basu, 2007). Trabalhos recentes em busca de marcadores sorológicos e de candidatos a componentes de vacinas vêm sendo realizados pela identificação de proteínas imunogênicas expressas pelo patógeno (Okwumabua e Chinnapakkagari, 2005; Sellman *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2006; Pourmand *et al.*, 2006; Iwashita *et al.*, 2008). Zhang e colaboradores (2005) comparando polipeptídeos antigênicos de *Coxiella burnetti* identificaram uma proteína imunodominante (*adaA*) no grupo de isolados que causa febre aguda, mas ausente nos isolados da doença crônica. A técnica de *immunoblotting* foi usada para verificar que *adaA* recombinante reage com soro derivado de animais infectados com grupo de febre aguda mas não reage com soro de animais infectados com isolados do grupo crônico. Estes resultados confirmam que a identificação de componentes imunogênicos pode ser útil para o desenvolvimento de novos métodos de sorodiagnóstico.

Recentemente, pesquisadores usaram anticorpos policlonais produzidos contra um extrato de proteínas totais de *Strep. suis* para o *screening* de uma biblioteca de expressão (Okwumabua e Chinnapakkagari, 2005). Um clone foi identificado e sequenciado revelando um gene que codifica um polipeptídeo com 446 resíduos de aminoácidos. Essa proteína recombinante mostrou-se reativa ao antisoro de animais infectados experimentalmente, demonstrando a utilidade para diagnóstico. A mesma proteína foi usada na imunização de suínos que foram em seguida desafiados com diferentes cepas de *Strep. suis*. Os animais montaram uma resposta imunológica eficiente e foram completamente protegidos contra o desafio, revelando o potencial vacinal da proteína.

Iwashita e colaboradores (2008) identificaram uma das principais proteínas antigênicas de *Helicobacter cinaedi* por meio da construção e *screening* de uma biblioteca genômica usando antisoro de coelho imunizado com extrato de *H. cinaedi* comparado com antisoro de paciente infectados com o mesmo micro-organismo. A proteína de membrana, de 30 KDa, foi capaz de ativar fortemente a resposta imune do hospedeiro de *H. cinaedi*, podendo, dessa forma, ser utilizado em formulações vacinais e *kits* de diagnóstico.

Pourmand e colaboradores (2006) para a identificação de antígenos expressos *in vivo* durante a infecção construíram uma biblioteca de *Staph. epidermidis* e utilizaram antisoro de pacientes infectados e não infectados para o *screening*. Esse estudo resultou na identificação de 53 *loci* que codificam antígenos, dos quais, seis polipeptídeos foram expressos, purificados e utilizados na proteção de camundongos infectados com *Staph. epidermidis*. A vacinação dos camundongos com os antígenos estimulou a resposta imune e o soro dos animais tratados foi capaz de opsonizar *Staph. epidermidis in vitro*. Esses resultados indicam a potencialidade da metodologia na identificação de antígenos candidatos para imunoterapias ou profilaxia para o controle de determinadas doenças.

Alternativamente, a identificação de antígenos pode também ser realizada por meio de *Western blotting* (Jeavons *et al.*, 1998; Lasri *et al.*, 2003; Meshgi e Hosseini, 2007). Utilizando essa metodologia Meshgi e Hosseini (2007) identificaram antígenos órgão-específicos expressos pelo parasita *Haemonchus contortus* durante a parasitose em ovelhas. Os antígenos de 35 e 40 kDa só foram expressos quando o parasita foi encontrado no intestino e no útero, respectivamente, e os autores concluíram que a especificidade dos antígenos poderia ser explorada para o desenvolvimento de diagnósticos sorológicos confiáveis para haemoncose em ovelhas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificação de proteínas imunogênicas para o diagnóstico de mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos específicos

1. Construir biblioteca genômica de *Staph. aureus* em vetor plasmidial;
2. Realizar o *screening* da biblioteca com antisoro obtido de animal imunizado com extrato bruto de *Staph. aureus*;
3. Identificar os clones positivos por meio de sequenciamento de DNA;
4. Selecionar imunógenos secretados e associados à parede celular bacteriana por meio de *Western Blotting*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos utilizados e condições de cultivo

Staph. aureus 3993, 4124 e 4163, isolados de animais com manifestação de mastite subclínica, e também *Staph. epidermidis*, *Staph. intermedius*, *Staph. chromogenes*, *Staph. hyicus coagulase positivo*, *Strep. agalactiae* e a cepa-referência *Staph. aureus* ATCC 33591 foram utilizados neste estudo. Todas as cepas foram identificadas por testes microbiológicos rotineiros (Brito *et al.*, 2002) e foram gentilmente cedidas pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. As bactérias foram cultivadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI, Himedia), por 16 h, a 37 °C, sob agitação. Culturas-estoque foram mantidas em caldo BHI acrescido de 20 % de glicerol, a -80 °C.

4.2. Produção de anticorpos policlonais anti-*Staphylococcus aureus*

Para preparo do antisoro, culturas de *Staph. aureus* 3993 cultivadas em BHI por 8 (fase logarítmica-FL) ou 16 h (fase estacionária-FE) foram lavadas, ressuspensas em 10 mM tampão salina-fosfato, pH 7,4 (PBS) e sonicadas utilizando três pulsos (60 Hz) no aparelho Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole-Parmer) para obtenção do lisado celular. Quatro coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia, com peso entre 2-3 kg, foram imunizados subcutaneamente, com i) extrato contendo 170 µg de proteínas totais obtidos de cultura na FL ou ii) 350 µg de proteínas totais de cultura na FE, adicionados ao adjuvante completo de Freund (1:1). A injeção foi repetida duas vezes, com intervalo de duas semanas, utilizando i) 85 µg do extrato protéico FL ou ii) 175 µg do extrato protéico FE e adjuvante incompleto de Freund (1:1). Os antisoros foram coletados seis semanas após a imunização inicial e ensaiados para a presença de anticorpos (Sambrook e Russell, 2001). Como controle do ensaio, antes da primeira inoculação, foi realizada uma coleta do soro pré-imune. Os soros obtidos foram armazenados a -80°C para uso posterior.

4.3. Preparo de *Escherichia coli* DH5 α eletrocompetentes

Uma colônia de *Escherichia coli* DH5 α foi inoculada em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) e incubada *overnight* a 37°C. Foram transferidos 2 mL do pré-inóculo para 250 mL de LB fresco seguido por incubação a 37°C com agitação de 250 rpm. Quando a cultura atingiu densidade ótica (D.O.₆₀₀) entre 0,4-0,5, o material foi transferido para tubos Falcon e resfriado em gelo durante 30 min. A cultura foi centrifugada por 15 min a 3300 *g* a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas delicadamente em 150 mL de água MilliQ estéril e gelada e novamente centrifugadas, passo repetido por mais duas vezes. Seguiram-se duas lavagens com 50 mL e com 10 mL de água MilliQ estéril e gelada. Finalmente o material foi lavado com 10 mL de glicerol 10% gelado, centrifugado e ressuspensado em 1 mL de glicerol 10%. Aliquotas de 40 μ L foram armazenadas a -80°C para uso posterior.

4.4. Construção e *screening* da biblioteca genômica

DNA total de *Staph. aureus* 3993 foi extraído (Pospiech e Neumann, 1995) e clivado com 0,5U da enzima de restrição *Sau*3AI (Promega) a 37°C durante uma hora. O DNA resultante da reação de restrição foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e fragmentos com tamanho entre 0,5 e 8 Kb foram excisados do gel e purificados utilizando o *DNA Gel Extraction Kit* (Fermentas). Os fragmentos de DNA foram ligados ao vetor pUC18 previamente digerido com *Bam*HI (Fermentas) e tratado com fosfatase alcalina (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. *E. coli* DH5 α foi transformada com os plasmídios recombinantes por eletroporação realizada no aparelho Gene Pulser (BIO-RAD), ajustado para 2,5 kV, 25 μ F e 200 Ω . As células transformadas foram plaqueadas em ágar LB contendo 100 μ g/mL ampicilina.

O *screening* da biblioteca foi realizado com anticorpos policlonais produzidos contra proteínas totais de *Staph. aureus* na FL conforme descrito anteriormente. Após 16 h de crescimento, as colônias transformadas foram submetidas ao contato com membrana de nitrocelulose por alguns segundos. Com a região de contato voltada para cima, as membranas foram novamente incubadas por 16 h em meio LB contendo 100 μ g/mL ampicilina. As membranas foram expostas a vapor de clorofórmio durante 15 min e, então, colocadas em tampão de lise (100 mM Tris-Cl pH 7,8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1,5% (w/v) soro albumina bovina (BSA), 1 μ g/mL DNase e 40 μ g/mL

lisozima) a temperatura ambiente por 12 h, sob leve agitação. Em seguida as membranas foram lavadas por duas vezes em tampão TNT (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 150 mM NaCl e 0,05% (v/v) Tween-20) durante 30 min. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado por 30 min com tampão TNT contendo 5% de leite em pó desnatado. A lavagem das membranas foi feita pela transferência sequencial para os seguintes tampões: i) TNT contendo 0,1% de BSA, ii) TNT contendo 0,1% de BSA e 0,1% Triton X-100 e iii) TNT contendo 0,1% de BSA. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 2 h com antisoro (diluição 1:100 em TNT contendo 3% de leite em pó desnatado), novamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:3000 em TNT contendo 3% de leite em pó desnatado). As membranas foram lavadas seguindo-se a etapa de revelação com tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (D8001-Sigma), 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 3% de peróxido de hidrogênio. Os clones positivos foram recuperados das placas *master*, cultivados em LB contendo 100 µg/mL ampicilina e usados para a extração de DNA plasmidial segundo informações do fabricante (Promega). Para confirmação da presença do inserto, os plasmídios foram clivados com 0,1U *Xba*I e *Sac*I (Fermentas) por 16 h e os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % contendo 0,1 µg/mL de brometo de etídio. As imagens foram obtidas com auxílio do sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (Loccus Biotecnologia).

4.6. Sequenciamento do DNA plasmidial e análises de bioinformática

O DNA plasmidial dos diferentes clones foi sequenciado em sequenciador ABI3730XL (Applied Biosystems) utilizando *primers* M13 *forward* e *reverse*. As sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas de alinhamento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponíveis na página do National Center for Biotechnology Information (NCBI-www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.7. Preparo de extratos protéicos

O extrato de proteínas de parede celular foi obtido em condições isotônicas como descrito por Nandakumar e colaboradores (2004), com algumas modificações. Após o crescimento por 16 h em BHI, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas por duas vezes em PBS gelado. As células foram ressuspensas em 500 µL de

tampão de digestão (10 mM Tris HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ e 30% de sacarose) e adicionado de inibidores de proteases (50 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 2,5 µL de PMSF 100 mM, 10 µL de Aprotinina 2 mg/mL, 2 µL de Pepstatina 2 mg/mL) e 1U de Lisostafina (L7386-Sigma). Após 40 min de incubação a 37°C, o sobrenadante foi removido por centrifugação a 3300 g por 30 min. O sobrenadante foi tratado com 10% (v/v) de TCA em gelo por 30 min e os protoplastos utilizados para extração de proteínas intracelulares. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas por centrifugação a 29.000 por 30 min. O *pellet* foi lavado em 5% TCA e acetona gelada por duas vezes. As proteínas foram ressuspensas em 50 µL de 25 mM Tris-HCl pH 7,5 e armazenadas a -80°C. Foi adicionado aos protoplastos 500µl de tampão de extração (125 mM Tris-HCl pH 7.4 e 2% de SDS) com os inibidores de protease e fervidos por 5 min. Após uma centrifugação a 3300 g, o sobrenadante foi tratado com 3µl DNase (50 mg/mL) e 3µl RNase (30 mg/mL) e incubado por 30 min em gelo. Seguiu-se a precipitação das proteínas conforme descrito anteriormente.

O extrato de proteínas secretadas foi preparado utilizando uma cultura crescida por 16 h em BHI a 37°C. O sobrenadante foi removido por centrifugação a 13.000 g por 5 min e tratado com 10% de TCA em gelo por 30 min. As proteínas foram precipitadas por centrifugação a 29.000 rpm por 30 min. O *pellet* foi lavado com 5% TCA e com acetona gelada por duas vezes e seco a temperatura ambiente. As proteínas foram ressuspensas em 50 µL de 25 mM Tris-HCl pH 7,5 e armazenadas a -80°C.

4.9. Western Blotting

As proteínas secretadas e de parede foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 14% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o aparelho *mini Trans Blot Cell* (BIO-RAD). Após a transferência a membrana foi bloqueada em solução de bloqueio (TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado) por 1 h sob leve agitação. A membrana foi lavada três vezes com TBS-T 1x e incubada com o anticorpo primário FE ou FL (diluição 1:500) por 2 h. A membrana foi novamente lavada com TBS-T e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (A0545, Sigma diluição 1:3000) por 2 h. Após a lavagem da membrana, a revelação foi feita utilizando 10 mL de 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mg/mL de DAB e 3% de H₂O₂.

4.10. Digestão *In-gel* e seqüenciamento em MALDI-TOF/TOF

As bandas observadas na etapa anterior foram excisadas do gel SDS-PAGE, cortadas em pequenos pedaços e incubadas a temperatura ambiente por 16 h com 200 μ L de solução de lavagem (50% Metanol e 5% Ácido acético). A solução de lavagem foi removida e mais 200 μ L de uma solução fresca foram adicionados, seguido de nova incubação por 3 h. A solução foi descartada e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min e secos a vácuo. As proteínas foram reduzidas com a adição de 30 μ L de 10 mM DTT por 30 min. A solução de DTT foi removida e 30 μ L de 100 mM iodoacetamida foram adicionados para alquilação das proteínas. Os pedaços de géis foram novamente desidratados com acetonitrila e, então, reidratados com 200 μ L de 100 mM bicarbonato de amônio. Seguiu-se mais uma etapa de desidratação com acetonitrila e secagem. Os pedaços de gel foram reidratados por 10 min com a adição de 30 μ L de 20 ng/mL tripsina em gelo. O excesso de tripsina foi retirado e adicionados 5 μ L de 50 mM bicarbonato de amônio. As amostras foram finalmente incubadas a 37°C para a digestão *overnight*. Os peptídeos produzidos foram recuperados adicionando-se mais 30 μ L de bicarbonato de amônio e seguido de sonicação em banho de gelo e transferência para um novo microtubo. O volume foi reduzido e ajustado com ácido acético 1% para 20 μ L.

A mistura de peptídeos da digestão tríptica foi misturada com a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinamico em ACN 50% / TFA 0,3% em água na proporção de 1:1 (v/v). Alíquotas de 1 μ L da mistura foram aplicadas na placa de MALDI e seco a temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraflexII (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Os mapas de peptídeos foram adquiridos no modo refletivo utilizando-se, aproximadamente, 500 tiros de laser (200Hz). O equipamento foi previamente calibrado com uma mistura de peptídeos sintéticos de massa conhecida.

5. RESULTADOS

Para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico da mastite estafilocócica baseadas no reconhecimento antígeno-anticorpo é necessário a identificação de imunógenos específicos expressos por *Staph. aureus* durante a infecção. Dentro deste propósito, foi construída uma biblioteca genômica de *Staph. aureus* 3993 em vetor pUC18 usando fragmentos de DNA entre 0,5 e 8 kb. Para o *screening* da biblioteca foi utilizado antisoro produzido a partir de extrato de proteína total preparado de cultura bacteriana na fase logarítmica. A reatividade do antisoro produzido foi testada por meio de *Western blotting* utilizando diferentes extratos protéicos de *Staph. aureus* e extrato de proteínas secretadas de *Streptococcus agalactiae*. A Figura 1 mostra a reação do soro pré-imune (Fig. 1A) e soro imune (Fig. 1B).

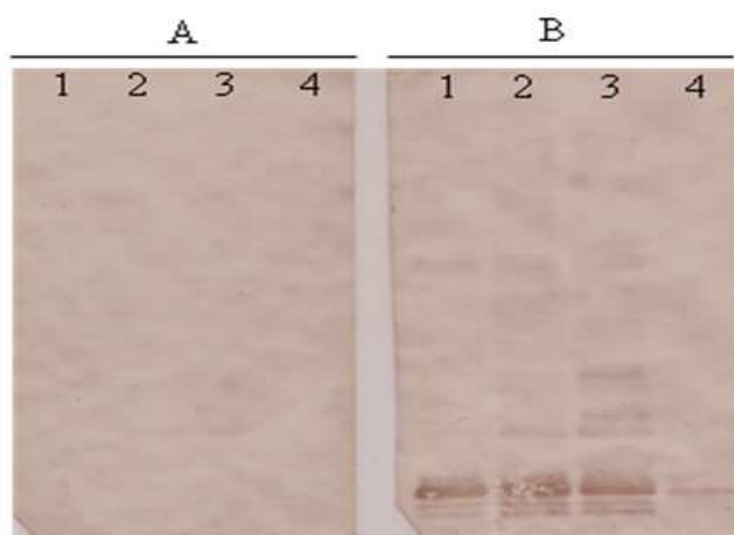


Figura 3. *Western blotting* utilizando soro pré-imune (A) ou imune (B). Extrato de proteínas intracelular (1), de parede celular (2) e secretada (3) de *Staphylococcus aureus* e extrato de proteínas secretadas de *Streptococcus agalactiae* (4).

A estratégia de construção e *screening* da biblioteca possibilitou a identificação de 74 clones positivos, alguns dos quais estão mostrados na Figura 2A. Desses, 20 clones foram selecionados para análise posterior, sendo suas reatividades previamente confirmadas por um novo *immunoblotting* (Fig. 2B).

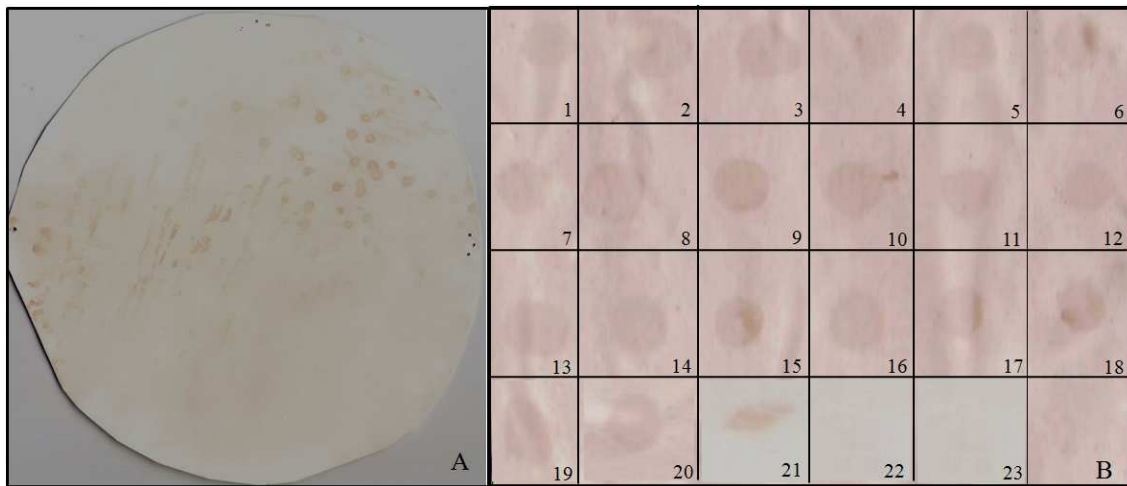


Figura 4. *Screening* imunológico de biblioteca genômica de *Staphylococcus aureus* com antisoro de animal imunizado com extrato de proteínas estafilocócicas totais. Primeira identificação de clones positivos (A) e confirmação dos clones positivos (B). pLBM1 (1), pLBM2 (2), pLBM3 (3), pLBM4 (4), pLBM5 (5), pLBM6 (6), pLBM7 (7), pLBM8 (8), pLBM9 (9), pLBM10 (10), pLBM11 (11), pLBM12 (12), pLBM13 (13), pLBM14 (14), pLBM15 (15), pLBM16 (16), pLBM17 (17), pLBM18 (18), pLBM19 (19), pLBM20 (20) *Staph. aureus* 3993 (21), *Escherichia coli* DH5 α (22) e *E. coli* contendo pUC18 (23).

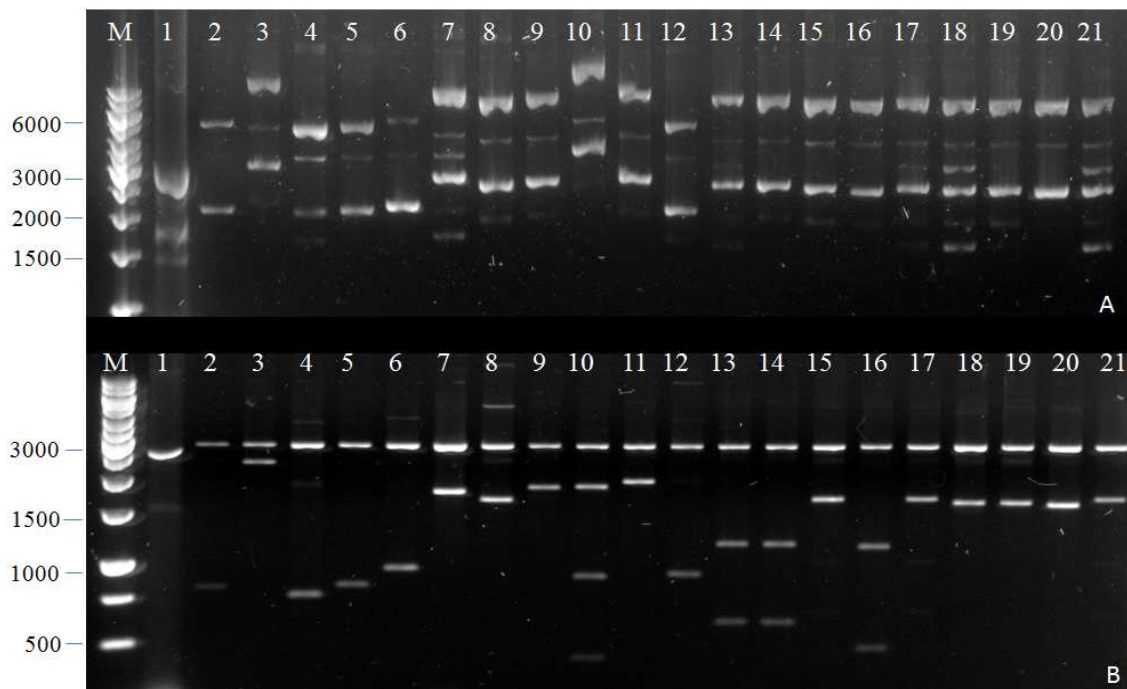


Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial extraído dos clones positivos. Os clones pLBM1 (2), pLBM2 (3), pLBM3 (4), pLBM4 (5), pLBM5 (6), pLBM6 (7), pLBM7 (8), pLBM8 (9), pLBM9 (10), pLBM10 (11), pLBM11 (12), pLBM12 (13), pLBM13 (14), pLBM14 (15), pLBM15 (16), pLBM16 (17), pLBM17 (18), pLBM18 (19), pLBM19 (20) e pLBM20 (21) foram obtidos de *screening* imunológico de biblioteca genômica de *Staphylococcus aureus* (A). Clivagem do DNA plasmidial com *Xba*I e *Sac*I (B). Marcador GeneRuler 1kb Fermentas (M) e Vetor pUC18 (1).

O DNA plasmidial de cada clone foi extraído e clivado com as enzimas de restrição *Xba*I e *Sac*I (Fig. 3). Como esperado, a análise eletroforética mostrou a migração diferencial do vetor vazio (pUC18) quando comparados aos vetores transformados (Fig. 3A), como esperado. Os insertos liberados após a digestão dupla apresentaram tamanhos que variaram entre 750 e 3500 pb (Fig.3B).

O DNA plasmidial dos 20 clones imunoselecionados foi sequenciado e as sequências alinhadas com o genoma de *Staph. aureus* RF122 de origem bovina para identificação dos *loci* clonados. A análise revelou 18 diferentes *loci* que incluem proteínas relacionadas ao metabolismo, toxinas, proteínas regulatórias, adesinas, proteínas de parede celular e proteínas hipotéticas (Tab.1). Com o sequenciamento também foi possível observar que os clones pLBM2/pLBM3, pLBM14/ pLBM20, pLBM17/ pLBM18 continham a mesma região. Foi possível a formação de *contigs* para quase todos os clones, exceto para pLBM9 pLBM10 e pLBM20, o que pode ser explicado pelo tamanho da sequência clonada. Para os clones pLBM2, pLBM6, pLBM8 e pLBM12 só foi possível obter o sequenciamento apenas com o *primer forward* dada a má qualidade da sequência obtida com o outro *primer*. Com isso não é possível afirmar que, nesse caso, as proteínas identificadas na tabela 1 sejam aquelas que reagem com os anticorpos.

Tabela 3. Alinhamento das sequências dos clones imunoselecionados com o genoma de *Staphylococcus aureus* RF122

Clone	Tamanho sequenciado*	Locus clonado	Produto gênico	e-value
pLBM1	791 (790)	SAB2095c - gene <i>cbiO</i>	Transportador ABC ligado a ATP	0,0
pLBM2	900 (2500)	SAB0512 – gene <i>sdrC</i>	Proteína de ligação ao fibrinogênio rica em Ser-Asp	9e-117
pLBM3	737 (740)	SAB0512– gene <i>sdrC</i>	Proteína de ligação ao fibrinogênio rica em Ser-Asp	0,0
pLBM4	809 (810)	SAB1776c	Proteína hipotética conservada	0,0
pLBM5	989 (1000)	SAB1553c – gene <i>citC</i> SAB1554c – gene <i>citZ</i>	Isocitrato desidrogenase Citrato sintase II	0,0
pLBM6	632 (1900)	SAB2469	Proteína hipotética conservada	0,0
pLBM7	1638 (1650)	SAB2486c- gene <i>cudB</i> SAB2487c– gene <i>cudA</i>	Colina desidrogenase Glicina betaína aldeído desidrogenase	0,0

Tabela 1. Continuação

pLBM8	950 (2000)	SAB1499c – gene <i>aspS</i>	Aspartil-tRNA sintetase	0,0
pLBM9	1785 (3500)	SAB0460 – gene <i>ftsH</i>	Proteína de divisão celular	0,0
		SAB0458	Proteína hipotética conservada	0,0
pLBM10	1829 (2100)	SAB2149c- gene <i>modC</i>	Proteína transportadora de molibdênio ligada a ATP	0,0
		SAB2147c- gene <i>moaB</i>	Proteína de biossíntese do cofator molibdênio	0,0
		SAB2148c- gene <i>moeB</i>	Proteína de biossíntese molibdopterina	
pLBM11	895 (900)	SAB1037c	Provável toxina exfoliativa	0,0
pLBM12	936 (1850)	SAB1022	Provável precursor da proteína de ligação ao fibrinogênio	0,0
pLBM13	1805 (1850)	SAB1021 - gene <i>fib</i>	Proteína de ligação ao fibrinogênio	0,0
pLBM14	1646 (1650)	SAB0014	Proteína hipotética conservada	0,0
		SAB0015 - gene <i>rpII</i>	Proteína ribossomal 50S L9	
pLBM415	1538 (1600)	SAB2444c	Provável proteína regulatória embebida na membrana	0,0
		SAB2445 – gene <i>TetR</i>	Proteína regulatória da Família TetR	
pLBM16	1655 (1650)	SAB0014	Proteína hipotética conservada	0,0
		SAB0015 - gene <i>rpII</i>	Proteína ribossomal 50S L9	
pLBM17	1635 (1650)	SAB2569	Proteína hipotética	0,0
		SAB2568c	Proteína hipotética conservada	
pLBM18	1678 (1650)	SAB2569	Proteína hipotética	0,0
		SAB2568c	Proteína hipotética conservada	
pLBM19	1625 (1600)	SAB0100 – gene <i>capL</i>	Enzima de síntese do polissacarídeo capsular	0,0
pLBM20	1833 (1850)	SAB0016 – gene <i>dnaC</i>	DNA helicase	0,0
		SAB0015 - gene <i>rpII</i>	Proteína ribossomal 50S L9	0,0
		SAB0014	Proteína hipotética conservada	

*Entre parênteses – tamanho esperado em pares de base para o gene.

Após identificação das proteínas, foi realizada uma busca de homologia em banco de dados não redundante disponível no site do NCBI (Genbank) para avaliar a distribuição de proteínas similares às encontradas neste estudo em micro-organismos relacionados à mastite bovina. As proteínas hipotéticas conservadas e as proteínas relacionadas ao metabolismo foram as mais frequentemente encontradas em diversas espécies, sendo que a maior identidade (95-80%) foi encontrada entre espécies do gênero *Staphylococcus* (Tab. 2). Apenas a proteína de ligação ao fibrinogênio

codificada pelo gene *fib* foi específica para *Staph. aureus*, demonstrando potencial para utilização em novas metodologias para diagnóstico da mastite estafilocócica bovina.

Tabela 4. Distribuição das proteínas identificadas entre micro-organismos causadores de mastite bovina.

Proteína	Micro-organismos
Aspartil-tRNA sintetase	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> .
Citrato sintase II	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Streptococcus sp</i>
Colina desidrogenase	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Staph. xylosus</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Serratia odorifera</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .
DNA helicase	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Clostridium papyrosolvens</i> .
Enzima de síntese do polissacarídeo capsular	<i>Staph. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Strep. pneumoniae</i>
Glicina betaína aldeído desidrogenase	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. xylosus</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> , <i>C. kroppenstedtii</i> .
Isocitrato desidrogenase	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>L. monocytogenes</i> .
Proteína de biossíntese do cofator molibdênio	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Bacillus sp.</i>

Tabela 2. Continuação

Proteína de biossíntese molibdopterina	<i>Staph. aureus, Staph. haemolyticus, Staph. capitis, Staph. epidermidis, Staph. carnosus, Staph. hominis, Staph. saprophyticus, Staph. warneri, Bacillus sp., B. thuringiensis.</i>
Proteína de divisão celular	<i>Staph. aureus, Staph. epidermidis, Staph. capitis, Staph. hominis, Staph. warneri, Staph. haemolyticus, Staph. saprophyticus, Staph. carnosus, Staph. caseolyticus, Bacillus sp.</i>
Proteína de ligação ao fibrinogênio	<i>Staph. aureus</i>
Proteína de ligação ao fibrinogênio rica em Ser-Asp	<i>Staph. aureus, Staph. epidermidis, Staph. Warneri</i>
Proteína hipotética conservada SAB0014	<i>Staph. aureus, Staph. warneri, Staph. capitis, Staph. epidermidis, Staph. haemolyticus, Staph. hominis, Staph. carnosus, Staph. saprophyticus, Bacillus sp., L. monocytogenes</i>
Proteína hipotética conservada SAB0458	<i>Staph. aureus, Staph. epidermidis, Staph. capitis, Staph. warneri, Staph. hominis, Staph. saprophyticus, Staph. haemolyticus, Staph. carnosus, L. monocytogenes, E. faecalis, Bacillus sp.</i>
Proteína hipotética conservada SAB1776c	<i>Staph. aureus, Staph. warneri, Staph. epidermidis, Staph. capitis, Staph. saprophyticus, Staph. haemolyticus, Staph. hominis, Staph. carnosus, L. monocytogenes, Bacillus sp.</i>
Proteína hipotética conservada SAB2469	<i>Staph. aureus, Staph. warneri, Staph. epidermidis, Staph. capitis, Staph. carnosus, L. monocytogenes</i>
Proteína hipotética conservada SAB2568c	<i>Staph. aureus, Staph. hominis, Staph. carnosus, Staph. warneri, Staph. haemolyticus, Staph. saprophyticus, Bacillus sp., Strep. agalactiae.</i>
Proteína hipotética SAB2567c	<i>Staph. aureus, Staph. haemolyticus, Staph. hominis, Staph. capitis, Staph. epidermidis, Staph. saprophyticus, Staph. warneri, Bacillus sp.</i>
Proteína ribossomal 50S L9	<i>Staph. aureus, Staph. warneri, Staph. epidermidis, Staph. capitis, Staph. haemolyticus, Staph. saprophyticus, Staph. hominis, Staph. carnosus, E. faecium, Bacillus sp., L. monocytogenes.</i>
Proteína regulatória da família TetR	<i>Staph. aureus, Staph. epidermidis, Staph. haemolyticus, Staph. warneri, Staph. hominis, Staph. saprophyticus, Bacillus sp, Strep. infantarius, E. faecalis.</i>

Tabela 2. Continuação

Proteína transportadora de molibdênio ligada a ATP	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>L. monocytogenes</i> .
Provável precursor da proteína de ligação ao fibrinogênio	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. carnosus</i> .
Provável proteína regulatória embebida na membrana	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Strep. agalactiae</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Strep. equi</i> , <i>Strep. uberis</i> , <i>Strep. pyogenes</i> , <i>Strep. dysgalactiae</i> .
Provável toxina exfoliativa	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. hyicus</i> , <i>Strep. agalactiae</i> , <i>Strep. pyogenes</i> , <i>Strep. dysgalactiae</i> , <i>Strep. uberis</i> , <i>Strep. gordonii</i> , <i>Strep. mutans</i> , <i>Strep. pneumoniae</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> .
Transportador ABC ligado a ATP	<i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. capitis</i> , <i>Staph. hominis</i> , <i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. carnosus</i> , <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Strep. salivarius</i> , <i>L. innocua</i> , <i>B. subtilis</i>

A técnica de *Western blotting* foi outra estratégia utilizada para a seleção de imunógenos específicos expressos durante a infecção. Para isso, foram preparados extratos protéicos de *Staph. aureus* ATCC 33591, *Staph. aureus* 3993, 4124 e 4163, além de patógenos relacionados à mastite como *Staph. epidermidis*, *Staph. intermedius*, *Staph. chromogenes*, *Staph. hyicus coagulase positivo* e *Strep. agalactiae*. As proteínas foram resolvidas por eletroforese em SDS-PAGE 14% (Fig. 4) e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose.

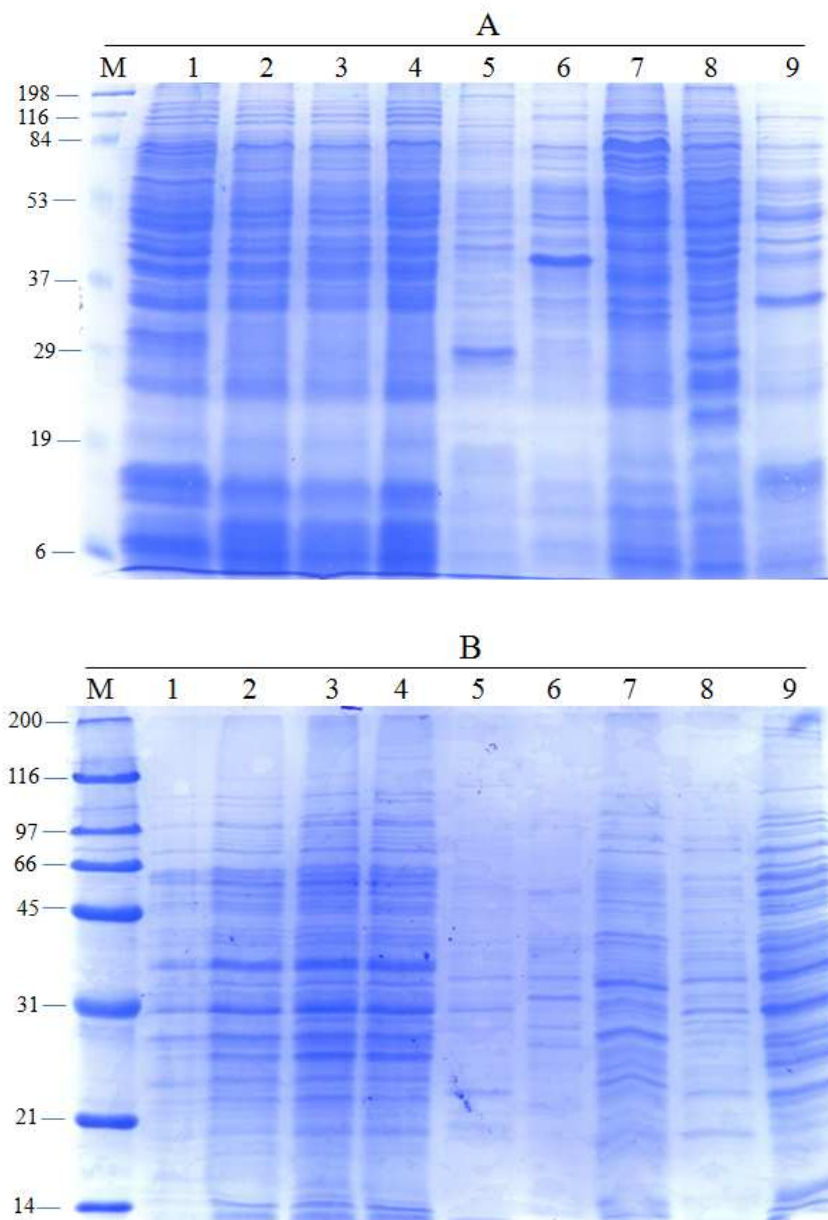


Figura 4. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 14% contendo dodecil sulfato de sódio de extratos de proteínas secretadas (A) e de parede celular (B) obtidos de culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC (1), 3993 (2), 4124 (3), 4163 (4), *Streptococcus agalactiae* (5), *Staph. chromogenes* (6), *Staph. intermedius* (7), *Staph. epidermidis* (8) e *Staph. hyicus* coagulase positivo (9). Marcador molecular *broad range* BIO-RAD (M).

A imunodeteção foi realizada com antisoro produzido a partir de extrato de proteínas totais FL (Figs. 5A e 5C) ou FE (Figs. 5B e 5D). Na imunodeteção das proteínas secretadas com antisoro FL não foi identificada nenhuma banda específica (Fig. 5A), mas utilizando o antisoro FE foi possível a identificação de duas bandas

específicas para os isolados de *Staph. aureus* (Fig. 5B) com massa molecular correspondente a 37 kDa e 32 kDa . Já pelo *Western blotting* das proteínas de parede foram observadas cinco proteínas específicas com massas moleculares de 42 kDa, 37 kDa, 32 kDa, 24 kDa e 15 kDa independente do antisoro utilizado (Fig. 5C e D). As bandas específicas foram excisadas do gel e submetidas à digestão triptica para o sequenciamento por espectrometria de massa. Os primeiros resultados do sequenciamento não foram satisfatórios, pois não foi possível a visualização de picos relativos à peptídeos nos espectros obtidos. Novos experimentos serão realizados para identificação das proteínas.

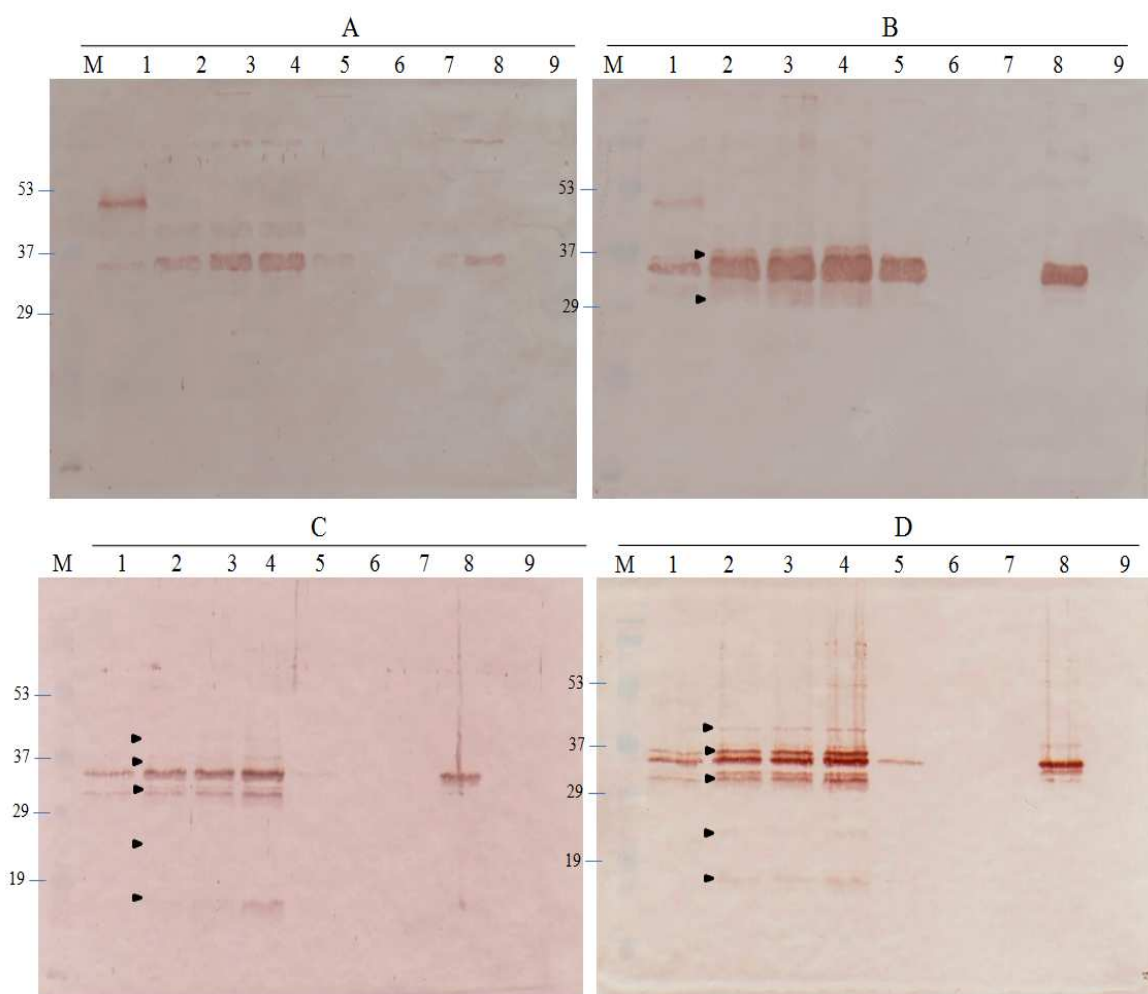


Figura 5. *Western blotting* utilizando antisoro FL (A e C) ou antisoro FE (B e D) de extrato de proteínas secretadas (A e B) e de proteínas parede celular (C e D). *Staphylococcus aureus* ATCC (1), 3993 (2), 4124 (3), 4163 (4), *Streptococcus agalactiae* (5), *Staph. chromogenes* (6), *Staph. intermedius* (7), *Staph. epidermidis* (8) e *Staph. hyicus* coagulase positivo (9). Marcador molecular *broad range* BIO-RAD (M). Bandas identificadas apenas em *Staph. aureus* (►).

6. DISCUSSÃO

Entre as doenças que afetam o rebanho leiteiro, a mastite é considerada a de maior impacto econômico em decorrência da diminuição da secreção de leite e dos gastos com o tratamento. Outro agravante é o número de agentes etiológicos associados à mastite o que dificulta o controle e diagnóstico baseado apenas na sintomatologia. Isso vem motivando a busca por métodos de diagnóstico mais precisos e sensíveis, e novas formulações vacinais mais efetivas para a prevenção da doença.

Métodos de imunoenaios são utilizados para o desenvolvimento de diversos testes de diagnósticos e de vacinas na medicina humana, mas são incomuns na medicina veterinária. Etz e colaboradores (2002) desenvolveram uma metodologia de imunoenasão para identificar antígenos expressos por *Staph. aureus* metilina resistente com potencial uso em vacinas. Peptídeos foram exibidos na superfície de *Escherichia coli* através da fusão com duas proteínas de membrana externa (*LamB* e *FhuA*), o que permitiu a identificação de 60 proteínas antigênicas, sendo a maioria secretadas ou de superfície. Vários trabalhos, porém, têm descrito as diferenças genotípicas entre *Staph. aureus* isolados de humanos e bovinos (Kapur *et al.*, 1995; Zadoks *et al.*, 2000; Reinoso *et al.*, 2008). O sequenciamento do genoma de cepas de origens humana e bovina identificou diferenças notáveis nos dois genomas, fornecendo indícios para existência de fatores associados com a especificidade do hospedeiro deste importante patógeno (Herron *et al.*, 2002). Assim, o desenvolvimento de sorodiagnósticos específicos voltados para cepas veterinárias é de grande importância e requer a identificação de proteínas imunogênicas estafilocócicas ou de anticorpos contra proteínas espécie-específicas presentes no soro do animal infectado (Connaughton *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm empregado a imunoproteômica como estratégia para identificar imunógenos, quando proteínas bacterianas são submetidas à eletroforese bidimensional e imunodetectadas com antisoro de pacientes doentes (Sellman *et al.*, 2005; Chitlaru *et al.*, 2007; Janovská *et al.*, 2007). O *screening* de bibliotecas genômicas também é uma poderosa ferramenta para a identificação de antígenos, pois permite potencialmente o *screening* do genoma inteiro de um patógeno.

Em busca de polipeptídeos imunogênicos, foi construída neste trabalho uma biblioteca genômica contendo fragmentos de DNA de *Staphylococcus aureus* 3993. Esta cepa, isolada de animal com manifestação de mastite bovina, foi escolhida dentre

várias outras por apresentar diversos fatores de virulência (R.C. Klein, comunicação pessoal). À semelhança de outros trabalhos (Etz *et al.*, 2002; Okwumabua e Chinnapakkagari, 2005; Pourmand *et al.*, 2006; Iwashita *et al.*, 2008; Kügler *et al.*, 2008), a biblioteca foi construída em vetor plasmidial e o *screening* realizado com antisoro obtido de animais imunizados com extrato bacteriano, possibilitando a identificação de 74 clones positivos (Fig. 2A). Destes, 28, foram seqüenciados, porém sequência de nucleotídeos de boa qualidade só foi conseguida para apenas 20 clones, que equivaleram a 18 diferentes *loci* quando analisados.

A maioria das proteínas identificadas neste estudo são citoplasmáticas e hipotéticas devido ao uso de antisoro produzido com extrato de proteínas totais de *S. aureus*. A resposta imunológica contra proteínas citoplasmáticas envolvidas no metabolismo de energia, metabolismo intermediário, biossíntese de aminoácidos, transcrição, replicação e metabolismo de nucleotídeos já foi observada em trabalhos anteriores (Vytvyska *et al.*, 2002; Weichhart *et al.*, 2003; Burlak *et al.*, 2007; Tedeschi *et al.*, 2009) e pode ser explorada para fins de diagnóstico (Baldi *et al.*, 1997). A exposição de proteínas citoplasmáticas ao sistema imune é devida principalmente à lise celular, além disso, algumas proteínas podem não estar restritas no citoplasma, por ser expostas transientemente na superfície celular (Galtin *et al.*, 2006).

Em infecções intramamárias, os componentes de superfície têm papel fundamental na adesão e evasão do sistema imune e virulência. A importância da identificação de antígenos expostos na parede estafilocócica se deve à busca de novas formulações vacinais e diagnóstico (Etz *et al.*, 2002, Vytvyska *et al.*, 2002; Weichhart *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2006; Tedeschi *et al.*, 2009). Um total de 6 proteínas secretadas ou de superfície bacteriana (adesinas, transportadores ABC e toxinas) foram identificadas pelo *screening* imunológico da biblioteca genômica. A imunodominância de antígenos extracelulares ou expostos na parede bacteriana têm sido observada em bibliotecas de expressão (Etz *et al.*, 2002), *ribosome display* (Weichhart *et al.*, 2003) e eletroforese bidimensional (Tedeschi *et al.*, 2009), mas a imunoreatividade de proteínas citoplasmáticas não pode ser descartada.

A mastite pode ser causada por mais de 80 diferentes espécies de micro-organismos. No entanto, para o desenvolvimento de sorodiagnóstico para a mastite estafilocócica bovina é necessário a identificação de um polipeptídeo imunogênico específico para *Staph. aureus*. Para isso, foi realizada uma busca de homologia em

banco de dados para avaliar a distribuição de proteínas similares as encontradas neste trabalho em outros micro-organismos associados à mastite bovina.

As proteínas hipotéticas conservadas e as proteínas relacionadas ao metabolismo foram as mais frequentemente encontradas em diversas espécies, sendo que a maior identidade foi encontrada entre espécies do gênero *Staphylococcus* (Tab. 2). Apenas a proteína de ligação ao fibrinogênio (Efb) codificada pelo gene *fib* foi específica de *Staph. aureus*, indicando um grande potencial para a utilização em novas metodologias para detecção de doença causada por este patógeno. Efb é uma proteína secretada de 15,6 kDa, constitutivamente expressa por *Staph. aureus* e que interage com a cadeia A α do fibrinogênio, inibindo a agregação plaquetária (Boden e Flock, 1994). Além disso, Efb é um fator de virulência envolvido na inibição da fagocitose mediada pelo complemento por meio da interação com C3b (Hammel *et al.*, 2007). Zecconi e colaboradores (2006) detectaram o gene *fib* em todos os 50 *Staph. aureus* isolados de infecções intramamárias. Estudos recentes demonstraram que Efb é capaz de estimular o sistema imune em modelos animais e proteger contra infecção (Shannon *et al.*, 2006). Mais estudos devem ser conduzidos para avaliar a imunogenicidade e a distribuição da proteína Efb em diferentes cepas de *Staph. aureus* e em outros *Staphylococcus* para confirmar sua utilidade para fins de diagnóstico.

Vários trabalhos descrevem a utilização da eletroforese bidimensional combinada com *Immunoblotting* para a identificação de novos antígenos em *Staph. aureus* (Vytvyska *et al.*, 2002; Tedeschi *et al.*, 2009), mas o uso do *Western blotting* é uma abordagem mais barata e que permite a comparação simultânea de extratos protéicos de diferentes patógenos relacionados à mastite e à detecção de frações subcelulares de proteínas imunogênicas que pode permitir a identificação de novos antígenos.

Utilizando a técnica de *Western blotting* para identificação de imunógenos específicos expressos por *Staph. aureus* durante a infecção (Fig 4 e 5), foi possível a detecção de duas bandas obtidas de extrato de proteínas secretadas quando antisoro produzido com cultura bacteriana na fase estacionária foi utilizado. Já no *Western blotting* das proteínas de parede foram identificadas cinco proteínas específicas, para cada do antisoro utilizado. Entretanto nas análises preliminares da espectrometria de massa não foi possível a identificação das proteínas presentes nas frações imunogênicas.

A construção e o *screening* de uma biblioteca genômica e a análise sorológica por *Western Blotting* se mostraram estratégias promissoras para a identificação de antígenos produzidos por *Staph. aureus* isolado de mastite bovina. Entretanto estudos futuros deverão ser realizados para a caracterização das proteínas hipotéticas encontradas e expressão das proteínas para verificar o papel na patogênese da mastite estafilocócica, além da análise dos outros clones positivos

A terapêutica antimicrobiana para o tratamento da mastite continua a ser limitada e muitas vezes se revela sub-ótima e o diagnóstico ainda é demorado. O desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção e/ou tratamento da mastite deve continuar a ser uma prioridade entre as iniciativas de saúde animal, principalmente quando se considera a relevância da pecuária leiteira para o cenário econômico de Minas Gerais. Dessa forma a identificação de componentes imunogênicos é uma estratégia promissora para a criação de novas metodologias de diagnóstico e fabricação de vacinas mais eficientes para o combate da mastite estafilocócica.

7. CONCLUSÕES

Com esse trabalho foi possível a:

- Identificação, por meio de *screening* imunológico de uma biblioteca genômica de *Staphylococcus aureus*, 74 clones que mostraram reatividade com antisoro produzido com extrato protéico bacteriano;
- Identificação 20 clones através de seqüenciamento, que corresponderam a proteínas relacionadas ao metabolismo, toxinas, proteínas regulatórias, adesinas, proteínas de parede celular e proteínas hipotéticas;
- Identificação de uma proteína específica de *Staph. aureus*, a proteína de ligação ao fibrinogênio (Efb) que será futuramente investigada para fins de diagnóstico;
- Detecção por métodos imunológicos de duas bandas de proteínas secretadas e cinco bandas de proteínas de parede celular específicas em *Staph. aureus*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcuri, E.F.; Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Pinto, S.M.; Ângelo, F.F.; Souza, G.N. 2006. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58, 440-446.
- Arora, S.; Agarwal, R.K.; Bist, B. 2006. Comparison of ELISA and PCR vis-à-vis cultural methods for detecting *Aeromonas spp.* in foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol., 106, 177–183.
- Baldi, P.C.; Wanke, M.M.; Loza, M.E.; Monachesi, N.; Fossati, C.A. 1997. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella spp.* Vet. Microbiol., 51, 273–281.
- Barkema, H. W.; Schukken, Y. H.; Zadoks, R. N. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. Am. Dairy Sci. Assoc., 89:1877–1895.
- Bhatia, B.D.; Basu, S. 2007. Newer diagnostic tests for bacterial diseases. Indian J Pediatr., 74, 673-677.
- Boden, M.K; Flock, J.I. 1994. Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol., 12, 599-606.
- Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J., 164, 116-128.
- Bradley, A.J.; Leach, K.A.; Breen, J.E.; Green, L.E.; Green, M.J. 2007. Survey of the incidence and a etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Res., 160, 253-7.
- Bramley, A.J.; Cullor, J.S.; Erskine, R.J. 1996. Current concepts of bovine mastitis. National Mastitis Council, 64.
- Brito M.A.V.P., Carvalho, M.G.M., Brito, J.R.F. 2002. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. Cien. Rural, 32, 1-8.
- Brito, M.A.; Brito, J.R.F. 1996. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. in: Brito, J.R.F., Bressan, M. (ed.) Controle integrado da mastite bovina. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 68-96.
- [Brito, M.A.V.P.](#); [Brito, J.R.F.](#); [Ribeiro, M.T.](#); [Veiga, V.M.O.](#) 1999. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das

vacas em lactação. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 51, 129-135.

- Burlak, C.; Hammer, C.H.; Robinson, M.A.; Whitney, A.R.; McGavin, M.J.; Kreiswirth, B.N.; Deleo, F.R. 2007. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. Cell. Microbiol., 9, 1172–1190.
- Burton, J.L.; Erskine, R.J. 2003. Immunity and mastitis: Some new ideas for an old disease. Vet. Clin. Food Anim., 19, 1–45.
- Cai, H.Y.; Bell-Rogers, P.; Parker, L.; Prescott, J.F. 2005. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. J. Vet. Diagn. Invest., 17, 537–545.
- Chitlaru, P.; Gat, O.; Grosfeld, H.; Inbar, I.; Gozlan, Y.; Shafferman, A. 2007. Identification of *in vivo*-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. Infect. Immun., 75, 2841–2852.
- Choi, J.W.; Choi, J.W.; Kim, Y.K.; Kim, H.J.; Lee, W.; Seong, G. H. 2006. Lab-on-a-chip for monitoring the quality of raw milk. J. Microbiol. Biotechnol., 16, 1229–1235.
- Clarke, S.R.; Brummell, K.J.; Horsburgh, M.J.; McDowell, P.W.; Mohamad, S.A.; Stapleton, M.R.; Acevedo, J.; Read, R.C.; Day, N.P.; Peacock, S.J.; Mond, J.J.; Kokai-Kun, J.F.; Foster, S.J. 2006. Identification of *in vivo*-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. J. Infect. Dis., 193, 1098–1108.
- Colak, A.; Polat, B.; Okumus, Z.; Kaya, M.; Yanmaz, L.E.; Hayirli, A. 2008. Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. J. Dairy Sci., 91, 4244–4248.
- Connaughton, M.; Lang, S.; Tebbs, S. E.; Littler, W.A.; Lambert, P.A.; Elliott, T.S.J. 2001. Rapid serodiagnosis of Gram-positive bacterial endocarditis, J. Infect., 42, 140–144.
- Constable, P.D.; Morin, D.E. 2003. Treatment of clinical mastitis: Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. Vet. Clin. Food Anim., 19, 139–155.
- Costa, E. 2009. Mastite: os seus prejuízos em números. Revista Balde Branco. <http://www.bichoonline.com.br/artigo>. Acessado março/2009.

- Cremonesi, P.; Luzzana, M.; Brasca, M.; Morandi, S.; Lodi, R.; Vimercati, C.; Agnellini, D.; Caramenti, G.; Moroni, P.; Castiglioni, B. 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cell. Probes*, 19, 299–305.
- Cunha, A.P.; Silva, L.B.; Pinheiro Júnior, J.W.; Silva, D.R.; Oliveira, A.A.; Silva, K.P.; Mota, R.A. 2006. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq. Inst. Biol.*, 73, 17-21.
- Day, W. 2005. Engineering precision into variable biological systems. *Ann. Appl. Biol.*, 146, 155–162.
- Delbe's, C.; Ali-Mandjee, L.; Montel, M.C. 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16s rRNA gene-based analyses. *App. Environ. Microbiol.*, 73, 1882–1891.
- Dias, R.V.C. 2007. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Vet. Bras.*, 1, 23-27.
- Diaz, D.; Döbeli, H.; Yeboah-Manu, D.; Mensah-Quainoo, E.; Friedlein, A.; Soder, N.; Rondini, S.; Bodmer, T.; Pluschke, G. 2006. Use of the immunodominant 18-kilodalton small heat shock protein as a serological marker for exposure to *Mycobacterium ulcerans*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13, 1314-1321.
- Edinger, D.; Tenhagen, B.A.; Heuwieser, W.; Kalbe, P.; Klunder, G.; Baumgartner, B. 1999. Effect of puerperal mastitis in primiparous cows on milk production, cell count and culling. *Deut. Tierärz. Woch.*, 106, 470-4.
- Elbers, A.R.; Miltenburg, J.D.; De Lange, D.; Crauwels, A.P.; Barkema, H.W.; Schukken, Y.H. 1998. Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of the Netherlands. *J. Dairy Sci.*, 81, 420-6.
- Embrapa. 2009. Produção de Leite na América do Sul, nº 26, Panorama do Leite.
- Ericsson-Unnerstad, H.; Lindberg, A.; Persson Waller, K.; Ekman, T.; Artursson, K.; Nilsson Öst, M.; Bengtsson, B. 2009. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet. Microbiol.*, 137, 90–97
- Etz, H.; Minh, D.B.; Henics, T.; Dryla, A.; Winkler, B.; Triska, C.; Boyd, A. P.; Sollner, J.; Schmidt, W.; von Ahsen, U.; Buschle, M.; Gill, S.; Kolonay, J.; Khalak, H.; Fraser, C.; von Gabain, A.; Nagy, E.; Meinke, A. 2002.

- Identification of *in vivo* expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. PNAS, 99, 6573–6578.
- Ferguson, J.D.; Azzaro, G.; Gambina, M.; Licitra, G. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. J. Dairy Sci.; 90, 5798-813.
- Fonseca, L.; Santos, M.V. 2000. Qualidade do leite e controle de mastite. Lemos Editorial, p. 176.
- Garcia-Cordero, J.L.; Ricco, A.J. 2008. A milk analysis microfluidic apparatus for detecting mastitis in a milk sample by isolating somatic cells suspended therein in the form of pellets of cells using centrifugal sedimentation, British Patent Application No. GB0801991.1.
- Gatlin, C.L.; Pieper, R.; Huang, S.T.; Mongodin, E.; Gebregeorgis, E.; Parmar, P.P.; Clark, D.J.; Alami, H.; Papazisi, L.; Fleischmann, R.D.; Gill, S.R.; Perterson, S.N. 2006. Proteomic profiling of cell envelope-associated proteins from *Staphylococcus aureus*. Proteomics, 6,1530–1549.
- Giannechini, R.; Concha, C.; Rivero, R.; Delucci, I.; Moreno Lopez, J. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. Acta Vet. Scand., 43, 221-30.
- Gillespie, B.E.; Moorehead, H.; Lunn, P.; Dowlen, H.H.; Johnson, D.L.; Lamar, K.C.; Lewis, M.J.; Ivey, S.J.; Hallberg, J.W.; Chester, S.T.; Oliver, S.P. 2002. Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows. Vet. Ther., 3, 373-80.
- Gillespie, B.E.; Oliver, S.P. 2005. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. J. Dairy Sci, 88, 3510–3518.
- Hammel, M.; Sfyroera, G.; Pyrpassopoulos, S.; Ricklin, D.; Ramyar, K. X.; Pop, M.; Jin, Z.; Lambris, J. D.; Geisbrecht, B. V. 2007. Characterization of Ehp, a secreted complement inhibitory protein from *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., 282, 30051–30061.
- Hauck, C.R.; Ohlsen, K. 2006. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. Curr. Opin. Microbiol., 9, 5-11.
- Herron, L.; Chakravarty, R.; Dwan, C., Fitzgerald, J.; Musser, J.; Retzel, E.; Kapur, V.

2002. Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 70, 3978–3981.
- Hiss, S.; Mueller, U.; Neu-Zahren, A.; Sauerwein, A. 2007. Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of sub-clinically diseased udder quarters. *Vet. Med.*, 52, 245–252.
- Holtenius, K.; Persson Waller, K.; Essen-Gustavsson, B.; Holtenius, P.; Hallen Sandgren, C. 2004. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *Vet. J.*, 168, 65-73.
- Holtfreter, S.; Kolata, J.; Bröker, B.M. 2010. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* – the anti-*S. aureus* antibody response. *Inter. J. Med. Microbiol.*, 300, 176–192.
- Hovinen, M.; Aisla, A.M.; Pyörälä, S. 2006. Accuracy and reliability of mastitis detection with electrical conductivity and milk colour measurement in automatic milking. *Acta Agric. Scand. A-An.*, 56, 121–127.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2007. Produção da Pecuária Municipal. <http://www.ibge.gov.br/estadosat>.
- Iwashita, H.; Fujii, S.; Kawamura, Y.; Okamoto, T.; Sawa, T.; Masaki, T.; Nishizono, A.; Higashi, S.; Kitamura, T.; Tamura, F.; Sasaki, Y.; Akaike, T. 2008. Identification of the major antigenic protein of *Helicobacter cinaedi* and its immunogenicity in humans with *H. cinaedi* infections. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15, 513-521.
- Janovská, S.; Pávková, I.; Reichelová, M.; Hubálek, M.; Stulík, J.; Macela, A. 2007. Proteomic analysis of antibody response in a case of laboratory-acquired infection with *Francisella tularensis* subsp. *Tularensis*. *Folia Microbiol.*, 52, 194-198.
- Jeavons, L.; Hamilton, A.J.; Vanittanakom, N.; Ungpakorn, R.; Evans, E.G.V.; Sirisanthana, T.; Hay, R.J. 1998. Identification and purification of specific *Penicillium marneffe* antigens and their recognition by human immune sera. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 949-954.
- Joo, Y.S.; Fox, L.K.; Davis, W.C.; Bohach, G.A.; Park, Y.H. 2001. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet. Microbiol.*, 80, 131-8.

- Kapur, V.; Sischo, W.; Greer, R.; Whittam, T.; Musser, J. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 376–380.
- Kügler, J.; Nieswandt, S.; Gerlach, G.F.; Meens, J.; Schirrmann, T.; Hust, M. 2008. Identification of immunogenic polypeptides from a *Mycoplasma hyopneumoniae* genome library by phage display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80, 447-458.
- Lacerda Jr., P.M.; Zani Neto, L.; Freitas, D.C. 1954. Estudos sobre as mastites bovinas. Contribuição ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas. *Rev. Fac. Med. Vet. USP*, 5, 55-64.
- Lasri, S.; Sahibi, H.; Natami, A.; Rhalem, A. 2003. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 91, 13-18.
- Lee, K.H.; Lee, J.W.; Wang, S.W.; Liu, L.Y.; Lee, M.F.; Chuang, S.T.; Shy, Y.M.; Chang, C.L.; Wu, M.C.; Chi, C.H. 2008. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 463–471.
- LeJeune, J.T; Rajala-Schultz, P. 2009. Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clin. Infec. Dis.*, 48, 93–100.
- Makovec, J.A.; Ruegg, P.L. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.*, 86, 3466-72.
- Milner, P.; Page, K.L.; Hillerton, J.E. 1997. The effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk. *J. Dairy Sci.*, 80, 859-63.
- Myllys, V.; Asplund, K.; Brofeldt, E.; Hirvela-Koski, V.; Honkanen-Buzalski, T.; Junttila, J.; Kulkas, L.; Myllykangas, O.; Niskanen, M.; Saloniemi, H.; Sandholm, M.; Saranpaa, T. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.*, 39, 119-126.
- Nandakumar, R.; Nandakumar, M.P.; Marten, M.R.; Ross, J.M. 2005. Proteome analysis of membrane and cell wall associated proteins from *Staphylococcus aureus*. *J. Proteome Res.*, 4, 250–257.
- National Mastitis Council. 2001. National Mastitis Council recommended mastitis

- control program. <http://www.nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf>. Acessado Mar. 28, 2006.
- Okwumabua, O.; Chinnapakkagari, S. 2005. Identification of the gene encoding a 38-kilodalton immunogenic and protective antigen of *Streptococcus suis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 12, 484-490.
- Olde Riekerink, R.G.; Barkema, H.W.; Kelton, D.F.; Scholl, D.T. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. J. Dairy Sci., 91, 1366-77.
- Oliveira, C.A.F.; Fonseca, L.F.L.; Germano, P.M.L. 1999. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. Higiene Alimentar, 13, 10-16.
- Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). 2007. Previsões para o mercado mundial de leite e produtos lácteos.
- Osteras, O.; Solverod, L.; Reksen, O. 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. J. Dairy Sci., 89, 1010-23.
- Pemberton, R.M.; Hart, J.P.; Mottran, T.T. 2001. An assay for the enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) based on electrochemical detection using screen-printed carbon electrodes (SPCEs). Analyst, 126, 1866-1871.
- Persson-Waller, K.; Colditz, I.G.; Lun, S.; Ostensson, K. 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin induced bovine mastitis. Res. Vet. Sci., 75, 247-155.
- Phuektes, P.; Browning, G.F.; Anderson, G.; Mansell, P.D. 2003. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. J. Dairy Res., 70, 149-155.
- Pitkala, A.; Haveri, M.; Pyörälä, S.; Myllys, V.; Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci., 87, 2433-41.
- Pospiech, A.; Neumann, B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trends Genet., 11, 217-218.
- Pourmand, M.R.; Clarke, S.R.; Schuman, R.F.; Mond, J.J.; Foster, S.J. 2006. Identification of antigenic components of *Staphylococcus epidermidis* expressed during human infection. Infect. Immun., 74, 4644-4654.
- Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet. Res., 34,

565–578.

- Rainard, P. 2005. Tackling mastitis in dairy cows. *Nature Biotech.*, 23,430-432.
- Reinoso, E.B.; El-Sayed, A.; Lammler, C.; Bogni, C.; Zschock, M. 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol. Res.*, 163, 314—322.
- Reksen, O.; Solverod, L.; Branscum, A.J.; Osteras, O. 2006. Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 89, 2928-37.
- Ruegg, P. 2005. Premiums, production and pails of discarded milk how much money does mastitis cost you? *Resources Milk Money*, 3, 50-56.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sawant, A.; Sordillo, L.M.; Jayarao, B.M. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.*, 88, 2991–2999.
- Sears, P.M.; McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 19, 171–185.
- Sellman, B.R.; Howell, A.P.; Kelly-Boyd, C.; Baker, S.M. 2005. Identification of Immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*, 73, 6591-6600.
- Shannon, O.; Uekotter, A.; Flock, J.I. 2006. The neutralizing effects of hyperimmune antibodies against extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus*. *Scand. J. Immunol.*, 63, 184-190.
- Tedeschi, G.; Taverna, F.; Negri, A.; Piccinini, R.; Nonnis, S.; Ronchi, S.; Zecconi, A. 2009. Serological proteome analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from sub-clinical mastitis. *Vet. Microbiol.*, 134, 388-391.
- Tenhagen, B.A.; Koster, G.; Wallmann, J.; Heuwieser, W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.*, 89, 2542-51.
- Viguiet, C.; Arora, S.; Gilmartin, N.; Welbeck, K.; O’Kennedy, R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotech.*, 27, 486-493.
- Vytvytska, O.; Nagy, E.; Bluggel, M.; Meyer, H.; Kurzbauer, R.; Huber, L.; Klade, C. 2002. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics*, 2,580–590.

- Weichhart, T.; Horky, M.; Sollner, J.; Gangl, S.; Henics, T.; Nagy, E.; Meinke, A.; von Gabain, A.; Fraser, C.M.; Gill, S.R.; Hafner, M.; vonAhsen, U. 2003. Functional selection of vaccine candidate peptides from *Staphylococcus aureus* whole-genome expression libraries *in vitro*. *Infect. Immun.*, 71, 4633–4641.
- Wilson, D.J.; Gonzalez, R.N.; Das, H.H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.*, 80, 2592-8.
- Zadoks, R.; van Leeuwen, W.; Barkema, H.; Sampimon, O.; Verbrugh, H.; Schukken, Y.; van Belkum, A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1931–1939.
- Zecconi, A.; Cesaris, L.; Liandris, E.; Dapra, V.; Piccinini, R. 2006b. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.*, 40, 177–183.
- Zhang, G.; To, H.; Russell, K.E.; Hendrix, L.R.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H.; Hirai, K.; Samuel, J.E. 2005. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect. Immun.*, 73, 1561-1567.
- Zschöck, M.; Kloppert, B.; Wolter, W.; Hamann, H.P.; Lammler, C. 2005 Pattern of enterotoxin genes *seg*, *she*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 108, 243-249.