

VAGNER MIRANDA PORTES

**TIPIFICAÇÃO CAPSULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* SP. ISOLADOS
DE MASTITE BOVINA E BUBALINA NO BRASIL**

LAGES, SANTA CATARINA

2007

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-
CONTAGIOSAS - DOIC**

VAGNER MIRANDA PORTES

**TIPIFICAÇÃO CAPSULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* SP. ISOLADOS
DE MASTITE BOVINA E BUBALINA NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Dr. Adil Knackfuss Vaz

LAGES, SANTA CATARINA

2007

VAGNER MIRANDA PORTES

**TIPIFICAÇÃO CAPSULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* SP. ISOLADOS
DE MASTITE BOVINA E BUBALINA NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dr. Adil Knackfuss Vaz
CAV – UDESC

Membro: _____
Pesq. Dr. Guilherme Nunes de Souza
Embrapa Gado de Leite

Membro: _____
Prof. Dra. Marisa Itapema Cardoso
FAVET – UFRGS

Lages, 05 de Fevereiro de 2007.

Aos meus pais,

**João Francisco Miranda Portes e
Claudete Miranda Portes**

Por me educarem com amor...

Por entenderem e apoiarem minhas decisões,
cuidando para que estas fossem as melhores em
minha vida...

Por vislumbrarem na educação uma forma de
mudar o futuro de seus filhos...

Acreditaram no meu sonho e possibilitaram sua
realização.

A estes, meu sincero reconhecimento e gratidão.

E para os quais, peço licença aos demais, para
dedicar este trabalho...

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível devido à vontade deste pesquisador de vir a ser tudo que deseja ser, além da contribuição de várias pessoas que por ocasião da apresentação desta dissertação, faz-se imprescindível externar publicamente sinceros agradecimentos. Desta forma:

Ao Prof. Dr. Adil Knackfuss Vaz, meu orientador, pela oportunidade, confiança, compreensão, paciência e colaboração na minha vida profissional e acadêmica. E por seu apoio, tão importante e decisivo no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais João e Claudete pelo constante incentivo, confiança e apoio.

A Vanessa Miranda Porte pelo apoio e amizade... Minha irmã, a nossa família somos nós...

Ao amor que encontrei nesta caminhada, Roberta Farias Veiga, pela compreensão, amor e apoio.

Ao Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa, o Bira ou Chefe Sênior, pela amizade, auxílio em todas as horas e pela colaboração no engrandecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Thaler Neto, pela colaboração e disposição para esclarecimentos sobre estatística, mas acima de tudo obrigada pela amizade.

Ao Dr. Daniel O. Sordelli, diretor do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Buenos Aires, por abrir as portas de seu Laboratório propiciando a tipificação capsular das amostras de *Staphylococcus*.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Doenças Infecto-Contagiosas, Willian, Lain, Camila e Roberta pelo auxílio na identificação e caracterização das amostras.

A todas as instituições que gentilmente nos cederam algumas amostras, possibilitando uma maior abrangência deste estudo o meu muito obrigado.

Ao amigo, colega de graduação, pós-graduação e de república (a famosa Rep. MTT dos esquemas da Festa da Nona) e irmão de coração Álvaro Menin pela convivência alegre e descontraída e acima de tudo obrigada pela sua amizade e por sua companhia.

Aos amigos de pós-graduação: Fabiano e Silvério pelo companheirismo e pela convivência harmônica e descontraída.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, através do Centro de Ciências Agroveterinárias, por proporcionar a oportunidade de realizar esta pesquisa e pela contribuição na minha formação.

A coordenação, professores e funcionários do programa de Mestrado em Ciências Veterinárias do CAV/UDESC.

A todos os meus amigos e familiares que torceram e colaboraram para que este dia chegasse.

E a todos, que de alguma maneira participaram da construção deste caminho, ficam os versos de um grande amigo: *“Tudo que nós vividamente imaginamos, sinceramente acreditamos, ardentemente desejamos e entusiasmadamente colocamos em ação, inevitavelmente tornar-se-á realidade”*.

RESUMO

A mastite estafilocócica ocasiona prejuízos consideráveis aos produtores, à indústria leiteira e aos consumidores. O *Staphylococcus aureus* é a mais importante causa de mastite bovina em todo o mundo, e inexistem alternativas preventivas e terapêuticas efetivamente eficientes para seu controle. A predominância de polissacarídeos capsulares estafilocócicos tipos 5 e 8 em amostras humanas isoladas de diversas origens geográficas é bem documentada, porém, em relação a isso parece existir uma grande variação na distribuição de sorotipos capsulares entre as amostras isoladas de bovinos. Esta informação é importante num projeto racional de uma vacina para prevenção da mastite estafilocócica, pois antígenos polissacarídeos de superfície do *S. aureus* são imunógenos sorotipo-específicos e, anticorpos para estes antígenos, devem estar presentes para que ocorra a opsonofagocitose. Das 256 amostras de estafilococos bovinas e 56 amostras bubalinas incluídas neste estudo, isoladas de leite mastítico no Brasil, entre 1995 e 2006, foram identificados como *S. aureus* 164 isolados de bovinos e 27 de bubalinos, as demais amostras foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase-negativos. Foram sorotipificadas as 164 amostras de *S. aureus* isoladas de bovino e 27 de bubalinos pela técnica de *colony immunoblot*. Cápsulas tipo 5 e 8 foram encontradas em aproximadamente 70% dos isolados de bovino e 85% dos isolados bubalinos. O tipo 8 foi significativamente mais freqüente (51,83%), o tipo 5 foi o menos freqüente, encontrado 17,07% dos isolados e o restante foram não-tipificáveis (31,1%). O sorotipo 5 foi predominante nas cepas de origem bubalina (62,96%), entre as quais a freqüência do sorotipo 8 foi de 22,22% e a menor ocorrência foi de não-tipificáveis (14,81%). Os resultados ressaltam a variabilidade na produção de cápsula por isolados de *S. aureus* bovinos de diferentes regiões geográficas. Portanto, observou-se uma prevalência antigênica de CP5 e CP8 e isso deve ser considerado quando do desenvolvimento de vacinas-capsulares contra mastite bovina e bubalina por *S. aureus*, a ser utilizada a nível nacional, pois tem influência direta sobre a eficiência das mesmas.

PALAVRAS-CHAVE: Sorotipo capsular. *Staphylococcus aureus*. Mastite bovina.

Mastite bubalina. Brasil.

ABSTRACT

Staphylococcal mastitis causes considerable economic losses to the producer, the milk industry and to the consumers. *Staphylococcus aureus* is an important cause of bovine mastitis worldwide, and effective preventive or therapeutic alternatives are lacking. The predominance of staphylococcal capsular polysaccharide types 5 and 8 among human isolates from many sources is well documented, but there seems to be a greater variation in the distribution of capsular serotypes among isolates from cattle. This information is important for the rational design of a vaccine for the prevention of staphylococcal mastitis, because surface antigens capsular polysaccharides of *S. aureus* are sorotype-specific immunogens and antibodies to these antigens should be present so that it happens the opsonophagocytic. Of the 256 samples of bovine staphylococci and 56 samples bubaline included in this study, isolated of mastitis milk in Brazil, between 1995 and 2006. They were identified as *S. aureus* 164 strains of bovine and 27 of bubaline, the other samples were identified as *Staphylococcus* coagulase-negatives. Sorotyping of the 164 samples of *S. aureus* isolated of bovine and 27 of bubalino for the technique of colony immunoblot. Capsular types 5 and 8 accounted approximately 70% of the bovine isolates and 85% of the bubaline isolates. Type 8 was significantly more frequent (51,83%), type 5 was less frequent, accounting for 17,07% of the isolates and rest were non-typeables (31,1%). Sorotype 5 was predominant in strains from bubaline sources (62,96%), among which the frequency of the sorotype 8 was of 22,22% and the smallest occurrence it was of non-typeables (14,81%). These results underscore the variability in capsule production by bovine isolates of *S. aureus* from different geographic regions. Therefore, was observed prevalence antigenic of CP5 and CP8 and that should be considered when of the development of capsular-vaccines for bovine and bubaline mastitis for *S. aureus*, to be used at national level, because it has direct influence on the efficiency of the same ones.

KEY WORDS: Capsular serotypes. *Staphylococcus aureus*. Bovine mastitis. Bubaline mastitis. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Comportamento da Balança Comercial de Lácteos de 1997 até 2005.16
- Figura 2** – Cultura de uma amostra de *S. aureus* hemolítica em ágar sangue.28
- Figura 3** – *Staphylococcus aureus* envolto por uma camada de exopolissacarídeo extracelular, chamada de cápsula. B: bactéria; E: exopolissacarídeo.....29
- Figura 4** – Estrutura esquemática de um biofilme, ou seja, bactérias (*Staphylococcus*) englobadas numa matriz de exopolissacarídeos.30
- Figura 5** – Ilustração do processo imunológico de opsonização e fagocitose na glândula mamária...35
- Figura 6** – Processo de opsonização e fagocitose. Esquerda: em *Staphylococcus* não capsulado, Direita: em *Staphylococcus* capsulado.....39
- Figura 7** – Visualização em microscópio eletrônico de *Staphylococcus aureus* CP5 (A), CP8 (B) e não capsulado (C).....44
- Figura 8** – Teste de DNase positivo a direita, com uma zona clara em torno da linha de crescimento e a esquerda DNase negativo.52
- Figura 9** – Diferença entre fermentação do manitol (ágar amarelo) e não fermentação (ágar vermelho) em Ágar Sal Manitol.....53
- Figura 10** – Inoculação das amostras em SSA.54
- Figura 11** – Colônias de *Staphylococcus* sp. em SSA. A esquerda: colônias difusas, SSA positivos; a direita: colônias compactas, SSA negativos.....54

- Figura 12** – Reação de *colony immunoblot* com cepas de *S. aureus* controle (tipo 5, 8, 1, e 2 e NT) e isolados clínicos. Os filtros de membrana interagiram com soro de coelho (diluído 1:8,000) reagindo com tipo 5, cepa Reynolds (A) ou soro de coelho (diluído 1:5,000) reagindo com tipo 8, cepa Becker (B).55
- Figura 13** – Prevalência de sorotipos capsulares de 164 isolados de *S. aureus* de leite mastítico bovino no Brasil.65
- Figura 14** – Prevalência de sorotipos capsulares de 27 isolados de *S. aureus* de leite mastítico bubalino no Brasil.67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Prevalência de sorotipos de *S. aureus*, baseados em polissacarídeos capsulares, de isolados de leite em diferentes países.....46
- Tabela 2** – Amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite mastítico, incluídas neste estudo.50
- Tabela 3** – Prevalência dos tipos capsulares dentre as cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina e bubalina no Brasil.58
- Tabela 4** – Prevalência de espécies de *Staphylococcus* nos 312 isolados de mastite bovina e bubalina no Brasil.58
- Tabela 5** – Sensibilidade e especificidade dos testes para identificação de *S. aureus*, em isolados de origem bovina.59
- Tabela 6** – Sensibilidade e especificidade dos testes para identificação de *S. aureus*, em isolados de origem bubalina.60
- Tabela 7** – Morfologia das colônias de *Staphylococcus*, de 312 amostras de mastite bovina e bubalina em SSA.61
- Tabela 8** – Ocorrência de colônias difusas em SSA, nos diferentes tipos capsulares de *S. aureus* isolados de bovinos.62
- Tabela 9** – Prevalência de sorotipos de *S. aureus*, baseado em polissacarídeos capsulares e celulares, de isolados em diferentes países.....68
- Tabela 10** – Caracterização fenotípica de 12 amostras bovinas e 2 bubalinas de *S. aureus* isolados de mastite.73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 MASTITE	16
1.2 CÁPSULA	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 MASTITE	21
2.1.1 Mastite Bovina	21
2.1.2 Mastite Bubalina	24
2.2 CARACTERIZAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE DOS ESTAFILOCOCCOS CAUSADORES DE MASTITE	26
2.3 MECANISMOS DE DEFESA DA GLANDULA MAMÁRIA	31
2.4 PAPEL DA CÁPSULA NA PATOGÊNESE DA MASTITE	37
2.5 USO DE VACINAS CONTRA MASTITE ESTAFILOCÓCICA	39
2.6 DEFINIÇÃO DE ENCAPSULAÇÃO EM <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	42
2.7 TIPIFICAÇÃO CAPSULAR DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLADOS DE LEITE MASTÍTICO	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	49
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS SP</i>	50

3.2.1 Identificação do Gênero	50
3.2.2 Identificação de Espécie.....	50
3.2.2.1 Teste de Coagulase em Tubo	51
3.2.2.2 Teste de DNase	51
3.2.2.3 Fermentação de manitol em Ágar Sal Manitol.....	52
3.2.2.4 Teste de Hemólise.....	53
3.3 TÉCNICA DO SERUM-SOFT AGAR – SSA	53
3.4 TIPIFICAÇÃO CAPSULAR.....	55
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4 RESULTADOS.....	57
4.1 RESULTADOS DA TIPIFICAÇÃO CAPSULAR	57
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	58
4.3 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS EM SSA.....	61
5 DISCUSSÃO	63
5.1 TIPIFICAÇÃO CAPSULAR DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	63
5.1.1 Tipificação capsular de isolados bovinos	64
5.1.2 Tipificação capsular de isolados bubalinos	66
5.1.3 Sorotipo 336 de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
5.1.4 Sorotipos capsulares e vacinas.....	69
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS SP</i>	70
5.2.1 Isolados de Bovinos	70
5.2.2 Isolados de Bubalinos	70
5.2.3 Caracterização fenotípica das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i>	71
5.2.4 Sensibilidade e especificidade dos testes	73
5.3 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS EM SSA.....	75
6 CONCLUSÕES	78
7 REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

Grandes desafios são propostos para a humanidade neste século XXI, entre eles o de produzir alimentos para uma população em constante crescimento, sem degradar os recursos naturais e o meio ambiente.

O setor leiteiro no Brasil vem passando por significativas mudanças nos últimos anos, partindo de um patamar de 15 bilhões de litros produzidos por ano no início dos anos 90 para alcançar os 25 bilhões de litros em 2005. Isso permitiu inclusive um superávit inédito na balança comercial em 2004, onde foram exportados US\$ 11,5 milhões a mais que os valores importados (Figura 1). Porém uma questão que vem preocupando autoridades, lideranças e pesquisadores é a qualidade do leite produzido no país. Leite de baixa qualidade causa grandes perdas econômicas ao setor, representa um risco à saúde pública, inviabiliza a conquista de mercados mais lucrativos e compromete a credibilidade da cadeia como um todo (DÜRR, 2005).

Na atual conjuntura da cadeia láctea nacional, visando a qualidade do leite, a mastite surge como um grande problema a ser enfrentado, pois promove também elevadas perdas de produtividade, devido à sua alta incidência.

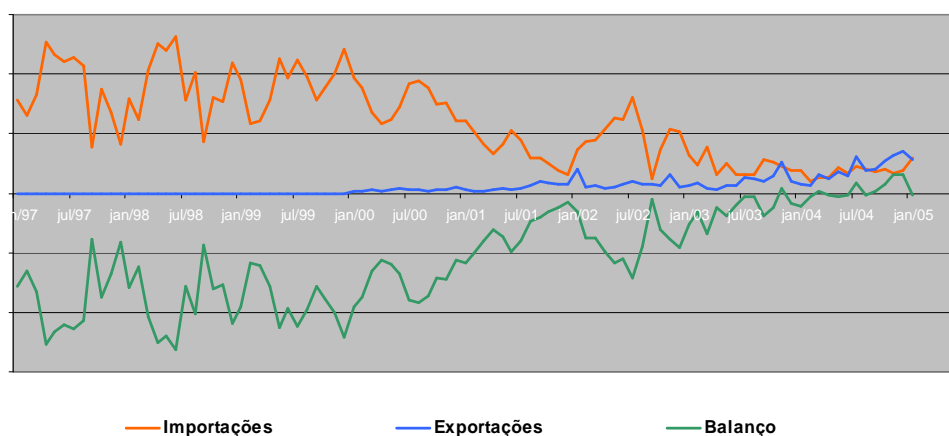


Figura 1 – Comportamento da Balança Comercial de Lácteos de 1997 até 2005.

Fonte: MDIC elaborado por CNA, MilkPoint.

1.1 MASTITE

Definida como inflamação da glândula mamária, a mastite é reconhecida mundialmente como a doença que mais causa prejuízos à atividade leiteira, afetando diretamente o produtor, a indústria processadora e o consumidor final (RISTOW, et al., 2006; SANTOS, 2000).

Esta enfermidade é a patologia de ocorrência mais comum em vacas leiteiras adultas, respondendo por 38% de toda a morbidade (ESSLEMONT e KOSSAIBATI, 1997), sendo que três em cada dez vacas apresentam inflamação clinicamente aparente da glândula mamária. Entre os animais afetados, 7% são descartados e 1% morre em consequência desta doença. Mais de 25% de todas as perdas econômicas na bovinocultura leiteira, relacionadas às doenças, podem ser atribuídas à mastite (CULLOR, et al., 1994).

Nos Estados Unidos e Inglaterra, estimam-se prejuízos da ordem de 2 bilhões e 300 milhões de dólares, respectivamente, somente em decorrência da doença. No Brasil, as perdas atingem um patamar de 12 a 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos. Deste total, 70% são atribuídos à mastite subclínica, enquanto o restante é relativo à mastite clínica (FONSECA e SANTOS, 2000).

As mastites subclínicas são normalmente causadas (70 a 90% dos casos) por bactérias Gram-positivas em forma de cocos, que são transmitidas de um animal para outro durante a ordenha. Os estafilococos são causadores da maioria das infecções subclínicas da glândula mamária, e tendem a permanecer por longo tempo causando estas infecções (VAZ, 2004). Os estafilococos coagulase positivos e coagulase-negativos são responsáveis pela maioria dos casos de mastite em bovinos em todo o mundo. A literatura brasileira aponta o *Staphylococcus* sp. como agente mais prevalente em casos de mastite no país.

1.2 CÁPSULA

Os *Staphylococcus aureus* envolvidos em mastite bovina são em sua maioria encapsulados. A cápsula é uma camada polissacarídea que protege as bactérias contra a fagocitose e outras defesas do organismo. Para fagocitar uma bactéria possuidora de envoltório capsular é necessário que o organismo tenha anticorpos específicos contra os polissacarídeos capsulares (BASELGA e ALBIZU, 2004; BASELGA, et al., 1994).

Segundo Yoshida et al. (1984) a cápsula possui relevante papel na infecção e imunidade de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, e a produção de vacinas

utilizando polissacarídeos capsulares extraídos destes é importante no controle da mastite bovina.

O conhecimento dos tipos capsulares existentes é necessário para que possam ser produzidas vacinas efetivamente eficientes contra a mastite bovina, minimizando as perdas econômicas, que chegam a 15% da produção nacional anual.

Estudos mostram a existência de apenas 11 tipos capsulares polissacarídeos para *Staphylococcus* sp. (SOMPOLINSKY, et al., 1985). Avaliações epidemiológicas nos Estados Unidos e Europa indicam a prevalência dos tipos capsulares polissacarídeos 5 e 8 de *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos (KARAKAWA, 1992; NAIDU, et al., 1991; POUTREL, et al., 1988), porém na Argentina os mesmos não prevalecem (SORDELLI, et al., 2000).

Não há estudos no país indicando quais os tipos capsulares polissacarídeos de *Staphylococcus* sp. envolvidos em processos infecciosos da glândula mamária de bovinos e bubalinos. Isso apresenta influência epidemiológica e importância relevante na produção de vacinas contra mastite estafilocócica, pois estas devem conter os antígenos capsulares específicos para as cápsulas existentes, tendo influência direta quanto à eficiência das mesmas.

A tipificação de amostras isoladas de mastite bovina tem sido utilizada como subsídio ao conhecimento da epidemiologia e à identificação de elementos que auxiliem no controle da doença (JARAMILLO, 1996).

Considerando a importância do conhecimento epidemiológico para um controle mais eficiente, das infecções intramamárias estafilocócicas, destacam-se os objetivos deste estudo:

- Identificar quais são os tipos específicos de *Staphylococcus* sp., isolados de amostras de leite mastítico bovino e bubalino, existentes no Brasil, quanto à cápsula polissacarídea.

- Determinar a prevalência dos tipos capsulares polissacarídeos de *Staphylococcus aureus* encontrados no país, para as referidas espécies.

- Definir quais os tipos capsulares polissacarídeos devem ser utilizados na produção de vacinas, devido a sua maior frequência antigênica em nível nacional, no intuito de elevar a eficiência das mesmas.

- Caracterizar as cepas de *Staphylococcus* envolvidos em casos de mastite bovina e bubalina, quanto à expressão dos principais fatores de patogenicidade.

Desta forma este é o primeiro estudo desenvolvido no Brasil a fim de investigar a ocorrência e a prevalência de sorotipos capsulares polissacarídeos de *Staphylococcus* sp. isolados de casos naturais de mastite em bovinos e bubalinos.

Hipóteses:

Os sorotipos capsulares polissacarídeos, de *Staphylococcus* sp. envolvidos em casos de mastite bovina e bubalina no Brasil, diferem em tipo capsular e prevalência antigênica, em relação aos sorotipos relatados em outros países.

Existe diferença de prevalência entre os sorotipos capsulares polissacarídeos de *Staphylococcus aureus* encontrados no Brasil.

As espécies estudadas (bovinos e bubalinos) diferem quanto à prevalência dos sorotipos capsulares polissacarídeos.

Há diferença quanto à ocorrência dos principais fatores de patogenicidade expressados, entre as cepas de *Staphylococcus* sp., isoladas de infecções da

glândula mamária de bovinos e bubalinos, ou seja, as cepas apresentam variabilidade quanto à expressão de fatores de patogenicidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MASTITE

2.1.1 Mastite Bovina

Mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária independentemente da causa, caracterizando-se por uma série de alterações físicas, químicas e organolépticas no leite bem como modificações patológicas do tecido glandular (LADEIRA, 1998; RADOSTITS, et al., 2000). É conhecida como a doença que mais prejuízos causa à cadeia láctea mundial (BRADLEY, 2002; BRAMLEY, et al., 1996; RISTOW, et al., 2006; SANTOS, 2000; SANTOS e FONSECA, 2007). As perdas causadas pela mastite se devem à redução da produção de leite e à interferência com a qualidade e a redução da vida de prateleira do leite processado e seus derivados (AMARAL, et al., 2003). Esta enfermidade surge também como um dos grandes entraves na busca por qualidade do leite, processo este atualmente em curso na cadeia produtiva nacional. No Brasil, há estimativas que apontam uma variação de 20% a 38% na prevalência da doença (FONSECA e SANTOS, 2000).

A mastite pode ser causada por microorganismos e sua toxinas, traumas físicos e agentes químicos irritantes, mas na maioria dos casos, é resultante da invasão de microorganismos patogênicos pelo canal do teto (PIRES, et al., 2004). Cerca de, 95% dos casos são provocados por algum agente bacteriano (DODD e

BOOTH, 2000), embora muitos microorganismos, incluindo fungos, algas, micoplasmas e vírus, possam causar a doença (HILLERTON, 1996).

Watts (1988) cita que existem na literatura 137 citações de agentes envolvidos na etiologia da mastite, ao passo que Philpot (2002) já relata a identificação de mais de 140 microorganismos relacionados à mesma. Apesar da grande variedades de agentes infecciosos, observa-se predominância de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (MENDONÇA, et al., 1999; SCHOCKEN-ITURRINO, et al., 1996).

As mastites são classificadas em clínicas e subclínicas, quanto à forma de manifestação (FONSECA e SANTOS, 2000; RADOSTITS, et al., 2000). Mastites clínicas apresentam sintomatologias (edema, hiperemia e hipertermia), além de alterações na composição do leite, portanto é a mais evidente e que maior preocupações traz aos produtores. Entretanto, a forma mais comum e responsável pelos maiores prejuízos, é a subclínica, a qual causa queda na produção e alteração na composição do leite, porém, geralmente passa despercebida por ser assintomática. No país 70% dos danos são devidos a mastite subclínica e os 30% restantes refletem a mastite clínica (FONSECA e SANTOS, 2000).

Cabe ressaltar que a mastite subclínica apresenta prevalência muito maior que a mastite clínica, sendo responsável por 90 a 95% dos casos da doença (FONSECA e SANTOS, 2000; SANTOS e FONSECA, 2007).

No Brasil, pode-se afirmar que a mastite subclínica ocorre em todos os rebanhos leiteiros, pois vários levantamentos realizados a partir de 1970 indicam alta incidência, com índices variando de 11,9% a 72,3% de vacas infectadas por rebanho (COLDEBELLA, 2003). Em outro estudo no país, encontrou-se índices variando de

44,88% a 97,0%, e a redução na produção de leite situada entre 25,4% e 43,0% (BRANT e FIGUEIREDO, 1994).

As mastites subclínicas são normalmente causadas (70 a 90% dos casos) por bactérias Gram-positivas em forma de cocos, que são transmitidas de um animal para outro durante a ordenha. Os estafilococos são causadores da maioria das infecções subclínicas da glândula mamária, e tendem a permanecer por longo tempo nas vacas infectadas (VAZ, 2004).

O *Staphylococcus aureus* é considerado o mais importante agente etiológico de mastite em diferentes países (BRAMLEY, et al., 1996; DODD e BOOTH, 2000; ENEVOLDSEN, et al., 1995; LONGO, et al., 1994; RADOSTITS, et al., 2000), sendo causa predominante de mastite subclínica e também freqüentemente isolado de mastite clínica (BRAMLEY e DODD, 1984). Devido a sua grande permanência na glândula mamária é de difícil erradicação (LAMMERS, et al., 2001).

Estudos recentes mostram uma crescente importância na infecção da glândula mamária de bovinos por *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) (SOLTYS e QUINN, 1999; YOUNIS, et al., 2003; ZHANG e MADDOX, 2000), causando elevadas contagens celulares (2 a 3 vezes acima dos valores normais dos quartos sadios) e diminuição na produção de leite, como verificado por Timms e Shultz (1987) e Mendonça et al. (1999).

Designados como microbiota oportunista da pele do teto, estima-se que os SCN sejam a causa de infecções intramamárias em cerca de 10 – 20% dos quartos infectados, apresentando elevadas prevalências após o parto com rápido declínio dos casos após a segunda semana de lactação. Os SCN são agentes de baixa

patogenicidade, uma vez que as infecções se manifestam de forma subclínica, sendo sua transmissão entre animais bastante rara (SANTOS e FONSECA, 2007).

Com relação ao perfil microbiológico dos rebanhos, os estudos são unânimes em apontar o *Staphylococcus* sp. como principal agente causador de mastites no Brasil (BARBALHO e MOTA, 2001; BRITO e BRITO, 1996; BRITO, et al., 1999; COSTA, 1995; FELIPPSEN, 1999; LARANJA e MACHADO, 1994; RIBEIRO, et al., 2003; SOUTO, et al., 2006; VIANNI, et al., 1992).

Domingues (1993), comparando produção de leite de 162 quartos mamários com mastite subclínica com seus homólogos negativos, verificou que quartos afetados com *Staphylococcus aureus* apresentaram perdas na produção de 22,6% e com *Staphylococcus epidermidis* de 19,1%.

A mastite ainda é uma doença não passível de erradicação e sendo assim, todos os esforços devem ser concentrados no sentido de manter a sua prevalência a mais baixa possível. Para tal, o controle periódico dos fatores predisponentes da doença é indispensável. E a vacinação é um importante artifício no auxílio da prevenção.

2.1.2 Mastite Bubalina

Os bubalinos apresentam os mesmos problemas sanitários que os bovinos e, entre as doenças, a mastite é considerada a que mais afeta a lucratividade das fazendas leiteiras causando perdas na produção e elevação dos custos anuais de prevenção e tratamento, além de atuar negativamente sobre a qualidade do leite e derivados (AMARAL, et al., 2003).

As búfalas são consideradas menos susceptíveis à mastite do que as vacas (LAU, 1994; SHUKLA e SUPEKAR, 1987; SILVA e SILVA, 1994) embora os microrganismos envolvidos na infecção sejam semelhantes (NAG, 1995).

Segundo Silva e Silva (1994), os búfalos são mais resistentes as infecções mamárias que os bovinos apresentando diferenças qualitativa e quantitativa na celularidade do leite.

O leite de búfala possui uma atividade bactericida maior que o bovino, uma vez que contem níveis mais elevados de lactoferrina (DE FRANCISCIS e DI PALO, 1994), além de possuir uma atividade da lactoperoxidase 23% maior do que o leite bovino (KUMAR e BATHIA, 1994).

Os bubalinos apresentam os tetos relativamente mais pendulosos e longos, portanto mais sujeitos às injúrias do que os dos bovinos; contudo, nos bubalinos o *ductus papilaris* é mais musculoso, com maior quantidade de fibras e vasos sanguíneos, funcionando como uma barreira mais eficiente contra as infecções (LAU, 1994; UPPAL, et al., 1994).

Assim como em bovinos, a mastite subclínica nos bubalinos ocorre com maior frequência que a forma clínica (AMARAL, et al., 2003), sendo geralmente o *Staphylococcus* sp. o agente de maior ocorrência (COSTA, et al., 1997; EL SAGHEER AHMED, et al., 1992; LANGONI, et al., 2001; TIJARE, et al., 1999).

As mastites bubalinas causadas por estafilococos são consideradas um sério problema para as fazendas produtoras de leite, ocupando papel importante na patologia da doença e aumentando progressivamente sua incidência (RAHMAN e BAXI, 1983).

Em um estudo realizado no Estado de São Paulo, em 29,6% das amostras de leite bubalino foram isolados microrganismos, sendo que em 77% delas foi isolado

Staphylococcus spp. (GUIDO, et al., 1994). Neste mesmo estado, Kapronezai et al. (2005) encontraram dentre as amostras positivas 57,8% de *Staphylococcus* spp. Neste estudo foram avaliados 162 quartos mamários de búfalas de uma propriedade, encontrando isolamento microbiológico positivo em 24,4% destes.

A existência de animais que apresentam resultados positivos ao exame microbiológico do leite, sem contudo apresentarem sinais de processo inflamatório evidencia a importância dos cuidados preventivos relacionados à transmissão de agentes potencialmente patogênicos no leite de bubalinos visando assegurar a qualidade e inocuidade do produto e de seus derivados (KAPRONEZAI, et al., 2005).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE DOS ESTÁFILOCOCOS CAUSADORES DE MASTITE

Os componentes bacterianos e os produtos secretados que afetam a patogênese de infecções por *S. aureus* são numerosos (NAGASE, et al., 2002; PROJAN e NOVICK, 1997) e incluem adesinas de associação a superfície, cápsula polissacarídea, exoenzimas e exotoxinas. Esta constelação de produtos bacterianos permite ao *Staphylococcus* se aderir à membrana eucariótica, resistir à opsonofagocitose, lisar células eucarióticas e provocar a produção de uma cascata de moléculas imunomoduladoras no hospedeiro (O'RIORDAN e LEE, 2004).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são as que provavelmente produzem o maior número de toxinas extracelulares, hemolisinas e componentes celulares, sendo que a coagulase tem sido apontada como a primeira linha de defesa destas bactérias e principal responsável pela virulência (MARTINEZ, et al., 2001; MERCHANT e PACKER, 1970; QUINN, et al., 1994; SHULTZ, 1988). Esta enzima

converte o fibrinogênio em fibrina, e a deposição desta pode proteger os estafilococos das células fagocíticas (QUINN, et al., 2005). A coagulase provoca coagulação do plasma *in vitro*, identificando espécies patogênicas (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003). As espécies coagulase negativas, comumente isoladas de leite bovino, são consideradas patógenos secundários e, em geral, causam reações inflamatórias moderadas na glândula mamária (BRAMLEY, et al., 1996; HARMON e LANGLOIS, 1989).

Dentre as enzimas extracelulares excretadas pelo *Staphylococcus aureus*, que contribuem com a patogênese da mastite, encontra-se lipase, estearase, catalase, hialuronidase, fosfolipase, desoxirribonuclease (DNase) e estafiloquinase (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003; QUINN, et al., 2005; SUTRA e POUTREL, 1994).

A presença de atividade de DNase é muitas vezes usada como um marcador substituto, para a identificação de estafilococos coagulase positivos e particularmente de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite (BOERLIN, et al., 2003). Segundo Washington (1985), o teste de DNase é utilizado para detectar a degradação do ácido desoxirribonucléico (BRITO, et al.), sendo um diferencial entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo.

Os estafilococos também apresentam toxinas hemolíticas (hemolisinas) verificadas pela destruição de eritrócitos (hemólise) em placas de ágar sangue (Figura 2). Dentre os coagulase positivos, o *S.aureus* é o único com atividade de hemólise regularmente encontrada em amostras de leite mastítico. Portanto a presença de hemólise, apesar de não ser um método muito sensível, serve como um critério opcional para a identificação de *S. aureus* em culturas de leite (LAM, et al., 1995). As cepas incapazes de produzir toxinas hemolíticas são menos virulentas que

as parenterais que as sintetizam (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003), causando menos danos teciduais a glândula mamária.



Figura 2 – Cultura de uma amostra de *S. aureus* hemolítica em ágar sangue.

Muitas cepas de estafilococos (coagulase positiva e negativa) são capazes de produzir, em adição a outros fatores de virulência, uma camada exopolissacarídea extracelular, circundando a parede celular (Figura 3). Esta estrutura está diretamente associada com a virulência contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (BASELGA, et al., 1994).

Cepas de *Staphylococcus aureus* podem produzir camada exopolissacarídea (cápsula) estável, a qual é completamente associada à bactéria, não sendo possível removê-la por consecutivas lavagens e é preservada completamente em sub-cultivos celulares *in vitro*, independentemente do meio usado (BASELGA, et al., 1994; DASSY, et al., 1991). Conforme Yoshida e Minegishi (1976), estas cepas de *S. aureus* encapsuladas produzem colônias com morfologia difusa (CMD) em Serum-Soft ágar (meio semi-sólido contendo soro, livre de antígenos capsulares), enquanto cepas não encapsuladas apresentam colônias compactas. Esta morfologia compacta

é devido a presença de fatores de agregação no soro, que ligam as células bacterianas de uma mesma origem (filhas) através de proteínas específicas da parede celular. Entretanto, em cepas encapsuladas, esta ligação não ocorre, porque a cápsula atua como uma barreira impedindo a interação dos fatores de agregação do soro com a parede celular bacteriana (WILKINSON, 1983). Com este critério de encapsulação, verifica-se uma excepcional identificação das cepas realmente encapsuladas em mastites bovina (YOKOMIZO, et al., 1977).

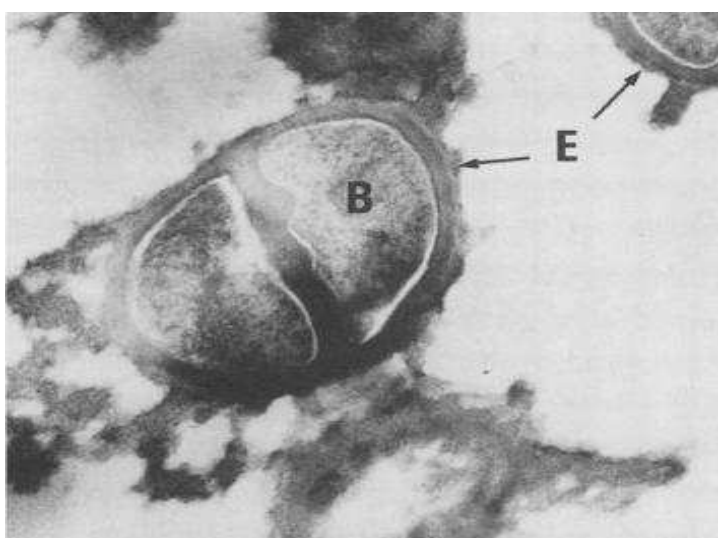


Figura 3 – *Staphylococcus aureus* envolto por uma camada de exopolissacarídeo extracelular, chamada de cápsula. B: bactéria; E: exopolissacarídeo.

Sutra et al. (1990), observou que cepas sorotipificadas através de anticorpos capsulares não apresentavam CMD em Serum-Soft Agar, indicando a presença de uma fina e/ou descontínua cápsula (também chamada limo), incapaz de impedir a aglutinação de bactérias em Serum-Soft Agar.

Watson e Watson (1989) diferenciaram limo de cápsula, porque eles apresentam características diferentes: o limo não reage com anticorpos específicos para cápsula, em teste de imunodifusão; aparece abundantemente após crescimento em meio específico; e desaparece facilmente durante lavagem. Outros

autores apontaram a existência de diferenças imunológicas e químicas, entre cápsula e limo (CAPUTY e COSTERTON, 1982; YOSHIDA e EKSTEDT, 1968)

Em outro estudo foi verificado que a produção de limo tem maior importância dentre os *Staphylococcus* coagulase-negativos, o que determina a capacidade da bactéria em produzir biofilme (CHRISTENSEN, et al., 1985).

Biofilme é uma estrutura comunitária de bactérias englobadas numa matriz de exopolissacarídeos produzida pelas bactérias e aderida a uma superfície viva ou inerte (Figura 4) (COSTERTON, et al., 1999). A capacidade de produzir biofilme é um fator de virulência relacionado à mastite bovina (AGUILAR, et al., 2001; MELCHIOR, et al., 2006), estando comumente associado à infecções crônicas e dificuldade de tratamento.

Saa e Kruze (1995), investigaram fatores de virulência em 190 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de mastite bovina, encontrando presença de cápsula em 7,9% das cepas e produção de limo em 10,5% das amostras.

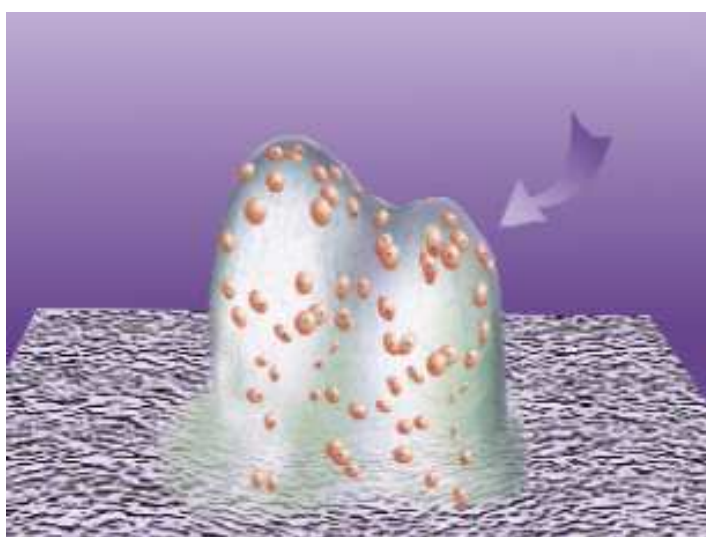


Figura 4 – Estrutura esquemática de um biofilme, ou seja, bactérias (*Staphylococcus*) englobadas numa matriz de exopolissacarídeos.

Fonte: EXOPOL - (BASELGA e ALBIZU, 2004).

2.3 MECANISMOS DE DEFESA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária está envolvida em dois tipos de imunidade: a transferência da imunidade ao recém-nascido e a sua própria proteção contra infecções. Iremos tratar apenas do segundo aspecto, que está relacionado à ocorrência, frequência e desenlace das infecções intramamárias nos bovinos leiteiros.

A imunidade na glândula mamária pode ser, como em outros sistemas, classificada em dois tipos: a imunidade inata ou inespecífica, e a imunidade adquirida ou específica. Os próprios nomes são auto-explicativos: a imunidade inata independe de um contato prévio com o agente patogênico, pois é pré-existente, e age da mesma maneira qualquer que seja este agente patogênico. Por outro lado, a imunidade adquirida é um processo de aprendizagem do sistema imune, voltado ao combate de um agente patogênico único. Por isso, requer um contato prévio com este agente, de forma a desencadear no organismo o processo de reconhecimento e eliminação do patógeno. Este contato pode ser uma infecção anterior, a presença do agente em outros pontos do organismo, ou a vacinação contra o agente (VAZ, 2004).

A imunidade inata compreende os mecanismos intrínsecos da glândula mamária, os quais, com exceção de um pequeno número de células “residentes”, são não fagocíticos: defesa do ducto do teto; defesa humoral não específica de secreções mamárias; atividade linfocítica e imunoglobulinas da glândula mamária. A imunidade adquirida compreende a resposta polimorfonuclear e os eventos a ela associados: células fagocíticas na glândula mamária; resposta inflamatória e recrutamento de células polimorfonucleares (PMN); opsonização e fagocitose; atividade microbicida dos fagócitos (CRAVEN e WILLIAMS, 1985).

Kehrli e Harp (2001) analisaram o papel do teto e do canal, concluindo que eles constituem a “primeira linha de defesa” da glândula mamária. A queratina presente contém fatores bacteriostáticos e a roseta de Furstenberg – na entrada do canal – tem uma população de leucócitos protetores e proteínas catiônicas bactericidas, além de funcionar como uma barreira física.

A descamação de células queratinizadas da superfície epitelial do canal do teto pode contribuir ao mecanismo de remoção de bactéria neste local, além dos ácidos graxos presentes na camada queratinizada exercerem efeito bacteriostático. A ação do fluxo do leite ao longo da glândula mamária também age como um mecanismo de defesa natural (QUINN, et al., 2005). Lesões do orifício, em casos mais graves necrose da abertura, com rachaduras que se irradiam dela, podem servir de abrigo para agentes patogênicos como o *Staphylococcus* sp (KEHRLI e HARP, 2001), aumentando os riscos da infecção.

Uma vez que o agente patogênico atravessou o canal do teto e alcançou a cisterna mamária, passam a atuar especialmente os fatores solúveis, chamados lacteninas (sistema lactoperoxidase, sistema complemento, lisozima e lactoferrina) e as células fagocíticas da imunidade inespecífica (macrófagos, neutrófilos e células semelhantes às células assassinas naturais ou “natural killer-like cells”) (SORDILLO, et al., 1997; TIZARD, 2002; VAZ, 2004).

Dentre os fatores solúveis a enzima lactoperoxidase (sintetizada pelo epitélio mamário) é um dos mais importantes (QUINN, et al., 2005; VAZ, 2004)). Ela tem uma ação bactericida ampla, sem afetar as células do organismo (YE e YOSHIDA, 1995).

O complemento, é considerado um fator quimiotático para o recrutamento de células fagocíticas para o local da infecção (VAZ, 2004). Sua concentração é alta no

colostro e leite proveniente de vacas com mastite, porém baixa em leite normal (OLIVER e SORDILLO, 1989). Um de seus componentes, C5a, apresenta uma grande variabilidade entre vacas, o que pode ser um dos fatores da maior suscetibilidade dos animais que produzem menos C5a (KEHRLI e HARP, 2001), podendo ser uma das explicações para a maior capacidade genéticas de resistência a mastites por parte de alguns animais (RAINARD e POUTREL, 2000).

A lisozima é uma proteína bactericida ativa contra bactéria Gram-positivas e Gram-negativas, mas como esta presente em baixa concentração no leite bovino, sua importância é incerta em comparação com outros mecanismos de defesa (QUINN, et al., 2005)

A lactoferrina ocorre em maior concentração na glândula mamária seca, mas também é encontrada no leite. Seu papel é o de competir com as bactérias pelo íon Fe⁺, essencial ao metabolismo bacteriano, tornando-o indisponível, assim impedindo o crescimento bacteriano e conseqüentemente potencializando a explosão respiratória neutrofílica (TIZARD, 2002; VAZ, 2004). A maioria das bactérias necessita de ferro livre para seu metabolismo, a lactoferrina interfere neste, impedindo a formação de enzimas necessárias à sobrevivência bacteriana (HAGIWARA e KAWAI, 2003). No entanto, algumas bactéria são capazes de competir com a lactoferrina para obter o ferro necessário para o seu metabolismo, e desta forma sobreviverem (VAZ e LUZ, 1996), como é o caso de algumas cepas de *Staphylococcus*.

As defesas celulares inespecíficas na glândula mamária normal são representadas principalmente pelos macrófagos, que são células fagocíticas profissionais, além de células dendríticas, que são potentes apresentadoras de antígenos presentes em ruminantes (COUGHLAN, et al., 1996) e demais células

brancas (neutrófilos e linfócitos), em menor proporção. Estas células são capazes de reconhecer estruturas na superfície das bactérias que são bastante conservadas dentro de uma classe de patógenos (VAZ, 2004), ou seja, frente a uma infecção são responsáveis por uma resposta imunológica defensiva centralizada na glândula afetada, desencadeando uma inflamação. O processo inflamatório induz aumento do fluxo sangüíneo e migração de células de defesa (células somáticas), em grande quantidade, do sangue para o leite por meio de um processo denominado de quimiotaxia (PERSSON, et al., 1992). Os mecanismos desta atração são muitos e complexos, dentre eles estão o complemento (fragmento C5a), interleucina - 1b, Fator de Ativação de Plaquetas, Fator de Necrose Tumoral - α e selectinas (VAZ, 2004).

Na glândula mamária sadia, a Contagem de Células Somáticas (CCS) é geralmente menor que 100.000 cel/mL de leite. Essa contagem eleva-se rapidamente com a presença de bactérias no interior da glândula podendo chegar a 1.000.000 cel/mL dentro de poucas horas (SANTOS e FONSECA, 2007).

O acúmulo destas células somáticas, se dá principalmente pelo aumento do número de neutrófilos (cerca de 90% do aumento celular), capazes de fixar, ingerir e destruir substâncias estranhas mediante o processo de fagocitose (BASCUNÁN, 2004). No entanto estas células apresentam uma eficácia limitada frente a microorganismos estranhos, pois a atividade fagocitária é inibida pela fagocitose dos componentes do leite, como a caseína e a gordura (SANTOS e FONSECA, 2007).

As células fagocíticas inespecíficas são responsáveis também por apresentar antígenos, estimulando ou ativando a imunidade específica. De acordo com Tizard (2002), a imunidade adquirida ou específica constitui um sistema que não somente reconhece e destrói os antígenos invasores, mas também retém “memória” do

episódio. Se o mesmo microorganismo invadir pela segunda vez o sistema imunológico, a reação ocorre com maior prontidão e eficácia. O sistema imunológico adquirido consiste em duas porções principais que proporcionam resistência aos invasores: uma através de anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) denominada imunidade humoral e a outra como imunidade mediada por célula ou imunidade celular, através de células fagocíticas ativadas.

Sendo a atuação conjunta de ambos através de opsonização e posterior fagocitose (Figura 5), a responsável pela maior eficiência da resposta imune específica na glândula mamária, ou seja, a função dos anticorpos no leite é marcar (opsonizar) os microorganismos estranhos, facilitando, assim, o reconhecimento destes para a fagocitose e conseqüente destruição intracelular por células do sistema imune.

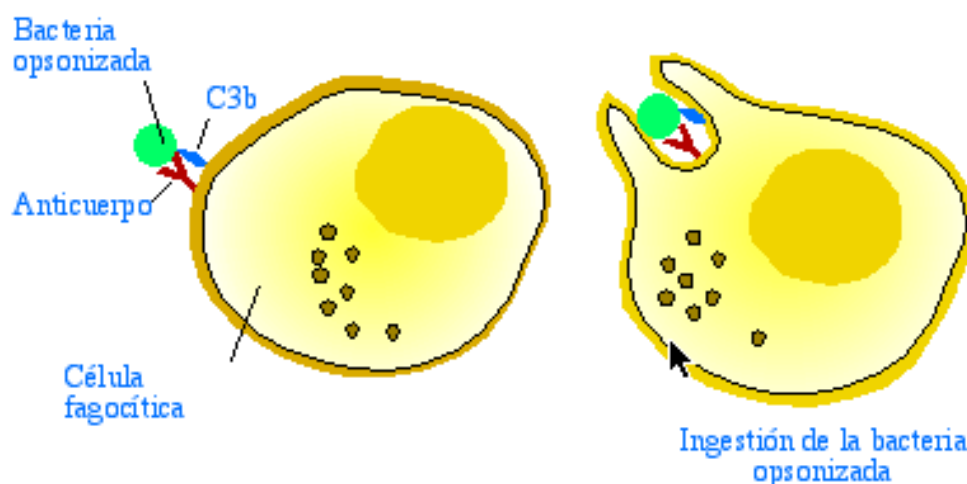


Figura 5 – Ilustração do processo imunológico de opsonização e fagocitose na glândula mamária.

Fonte: EXOPOL - (BASELGA e ALBIZU, 2004)

A imunidade específica na glândula mamária dos ruminantes apresenta algumas particularidades relevantes. Primeiramente, embora a imunidade celular

tenha um papel importante no desencadeamento e manutenção da resposta imune através de linfocinas (SHUSTER, et al., 1993), a fagocitose em si encontra-se muito prejudicada pela saturação das células fagocíticas com micelas de caseína e glóbulos de gordura (RUSSELL, et al., 1976). Além disso, a população local de células produtoras de anticorpos é reduzida na glândula mamária (NONNECKE, et al., 1988). Por isto, a maior parte das células imunitárias presentes neste órgão tem origem sistêmica, chegando à glândula como consequência de uma agressão infecciosa, e são constituídas principalmente por neutrófilos. Esta população celular constitui a maior parte das células somáticas (VAZ, 2004). Nos ruminantes estas células apresentam receptores para IgG2 e não para IgG1 (BURTON e ERSKINE, 2003; CRAVEN e WILLIAMS, 1985; GARCIA, et al., 1996; NORDHAUG, et al., 1994; O'BRIEN, et al., 2000; QUIROGA, 1993), o que dificulta uma eficiente opsonização dos antígenos bacterianos, uma vez que normalmente a IgG1 é a imunoglobulina predominante na glândula mamária (TIZARD, 2002) e estimulada por vacinas (VAZ, 2004), no entanto, este isótopo de imunoglobulina opsoniza a fagocitose por macrófagos (QUINN, et al., 2005).

Há muito se sabe que a imunidade na glândula mamária é baseada na combinação anticorpos/fagocitose por neutrófilos (VAZ, 2006). A associação é necessária pois os neutrófilos mamários apresentam menor eficácia em relação a fagocitose, pois esgotam sua capacidade fagocítica ao englobarem micelas de caseína e partículas lipídicas, ao invés de fagocitar patógenos (PAAPE, et al., 2002; QUINN, et al., 2005; RUSSELL, et al., 1976). A opsonização dos antígenos direciona a fagocitose contra eles, aumentando sua eficácia (GUIDRY, et al., 1993; HOGAN, et al., 1992). Isso deve acontecer preferencialmente por opsoninas IgG2, pois os

receptores presentes na superfície de neutrófilos mamários são para este isótopo de imunoglobulina (BURTON e ERSKINE, 2003).

Paralelamente, os agentes patogênicos procuram evitar a fagocitose, produzindo cápsulas anti-fagocíticas, como no caso do *Staphylococcus* sp. (O'RIORDAN e LEE, 2004).

Conseqüentemente, a imunidade contra mastite por *Staphylococcus* sp. está relacionada a tipos sorológicos capsulares, que são específicos e com limitada imunidade cruzada.

2.4 PAPEL DA CÁPSULA NA PATOGÊNESE DA MASTITE

As bactérias, ao longo de sua evolução, tem-se adaptado aos mecanismos de defesa do hospedeiro, por exemplo, criando um envoltório pouco denso de exopolissacarídeos capsulares que recobrem a parede bacteriana (QUESSY, et al., 1994).

Os polissacarídeos capsulares expressados pelo *S. aureus* são claramente importantes na patogênese das infecções estafilocócicas (O'RIORDAN e LEE, 2004). Kampen, et al. (2005) demonstraram que a expressão de cápsula polissacarídea, protege *S. aureus* da morte por neutrófilos bovinos.

Isto é assaz relevante para mastite bovina, uma vez que 94 – 100% dos *S. aureus* isolados de vacas com mastite apresentam cápsula (NORCROSS e OPBEDEECK, 1983; RATHER, et al., 1985). No Brasil, foi verificada a presença de cápsula, em 52,7% dos *Staphylococcus* sp. isolados de mastite (VAZ, et al., 1996).

A virulência dos estafilococos é determinada pela produção de toxinas e pela presença de antígenos superficiais de ação antifagocítica (BIER, 1975), ou seja, cápsula polissacarídea (SUTRA e POUTREL, 1994).

A cápsula é uma camada polissacarídea que protege as bactérias contra a fagocitose e outras defesas do organismo. A capa de polissacarídeos capsulares é muito grossa e está muito pouco compactada, e por isso os nutrientes, os antibióticos e inclusive proteínas grandes podem atravessá-la (BASELGA e ALBIZU, 2004). Assim, os anticorpos a atravessam sem dificuldade, alcançando a parede bacteriana e unindo-se a ela através de sua região Fab. Devido à espessura da camada de polissacarídeos os anticorpos ficam mascarados e a região Fc não pode entrar em contato com os receptores dos fagócitos (Figura 6) (BASELGA e ALBIZU, 2004; PETERSON, et al., 1978; WILKINSON, 1983).

Por esta razão, em muitas ocasiões os anticorpos dirigidos frente a parede bacteriana não podem eliminar as bactérias produtoras de polissacarídeos capsulares e a infecção continua apesar da presença de imunidade (ROITT, et al., 1996).

Portanto, para fagocitar uma bactéria rodeada por uma cápsula polissacarídea necessita-se produzir anticorpos contra o polissacarídeo e não contra a parede bacteriana (BASELGA e ALBIZU, 2004; BASELGA, et al., 1994; LEE, et al., 1987). A presença de anticorpos específicos para antígenos polissacarídeo de superfície é requisito para opsonização e fagocitose eficiente de estafilococos encapsulados (PETERSON, et al., 1978), por isso é interessante que anticorpos específicos para antígenos exopolissacarídeos estafilocócicos estejam presentes na glândula mamária de vacas com mastite (LOEFFLER, et al., 1987).

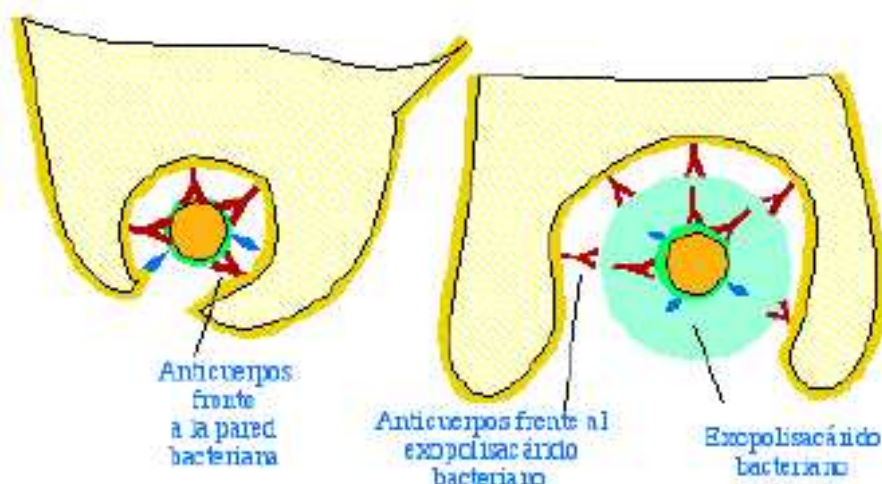


Figura 6 – Processo de opsonização e fagocitose. Esquerda: em *Staphylococcus* não capsulado, Direita: em *Staphylococcus* capsulado.

Fonte: EXOPOL - (BASELGA e ALBIZU, 2004)

Segundo Yoshida et al. (1984) a cápsula possui relevante papel na infecção e imunidade de *Staphylococcus aureus*, e a produção de vacinas utilizando polissacarídeos capsulares extraídos destes é importante no controle da mastite bovina. Geralmente são apenas uns poucos sorotipos os responsáveis pela maioria dos processos clínicos e estes são os sorotipos que devem ser introduzidos nas vacinas comerciais (BASELGA e ALBIZU, 2004).

2.5 USO DE VACINAS CONTRA MASTITE ESTAFILOCÓCICA

Há concordância que o controle da mastite depende mais da prevenção do que de tratamentos, sendo o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir a enfermidade, imprescindível para a produção leiteira do futuro (BASCUÑÁN, 2004; PEORALA, 2002; SORDILLO e SCOTT, 1995).

Segundo Santos e Fonseca (2007), uma das formas mais eficientes de aumentar a capacidade de resposta imune da vaca contra um agente patogênico, é a vacinação. A imunização contra agentes causadores de mastite aumenta a migração de neutrófilos para a glândula mamária e a produção de anticorpos, cuja função é facilitar a fagocitose, neutralizar toxinas bacterianas, interferir nos mecanismos de adesão das bactérias e estimular a lise da célula bacteriana.

O imuno-potencial dos polissacarídeos capsulares foi comprovado (CAPUTY e COSTERTON, 1982). Vacinas contendo estes foram usadas eficientemente na profilaxia contra infecções bacterianas (JENNINGS, 1990). Um grande passo foi dado com a obtenção de proteção, contra desafio experimental, com vacinas contra cápsula polissacarídea tipos 5 e 8 de *S. aureus* em ratos (FATTOM, et al., 1990).. Outros trabalhos com vacinas a partir de exopolissacarídeos foram descritos (FOSTER, 1991; WATSON, 1992a, , 1992b). Lee, et al (2005) relatam a eficiência de uma vacina trivalente baseada em antígenos polissacarídeos capsular e celular na proteção contra mastite por *S. aureus*.

Diversas tentativas de desenvolvimento de vacinas contra *S. aureus* tem sido feitas em função da importância deste agente. O polissacarídeo da cápsula parece ser, atualmente o antígeno mais promissor para o desenvolvimento de vacinas contra o *S. aureus*, podendo, desta forma, compor uma importante ferramenta para o seu controle (FOSTER, 1991; SANTOS e FONSECA, 2007).

Antígeno cápsular associado a um adjuvante estimulam a formação de opsoninas do tipo IgG2, que facilita a destruição fagocítica dos estafilococos (MAYER, et al., 1989; WATSON, 1989).

Anticorpos para cápsula maximizam a fagocitose (GUIDRY, et al., 1993; GUIDRY, et al., 1994; GUIDRY, et al., 1991; KARAKAWA, et al., 1988; LEE, et al.,

1987), mas os polissacarídeos capsulares são de baixa imunogenicidade e são antígenos T independentes (sorotipo-específicos) assim sendo, não estimulam memória imunológica (POOLMAN, 1990). Ambos os fatores dificultam a produção de anticorpos opsonizantes para cápsula.

Sabe-se que os antígenos polissacarídeos de superfície do *S. aureus* são imunógenos sorotipo-específicos, e anticorpos para estes antígenos devem estar presentes para ocorrer a opsonização (KAMPEN, et al., 2005; MA, et al., 2004; O'BRIEN, et al., 2000), pois o processo de fagocitose mediado por anticorpos é considerado o mais importante mecanismo de defesa da glândula mamária de bovinos contra infecções bacterianas (PAAPE, et al., 2002; VAZ, 2006).

Uma vacina para apresentar efetividade a campo deve conferir proteção contra a maioria dos sorotipos capsulares patogênicos ou os mais prevalentes (BASELGA e ALBIZU, 2004; MA, et al., 2004). A epidemiologia dos sorotipos capsulares difere geograficamente, e isso tem importância relevante na produção de vacinas contra mastite estafilocócica, devendo estas conter antígenos capsulares específicos para as cápsulas existentes, pois isto, tem influência direta sobre sua eficiência.

Santos e Fonseca (2007) após vários relatos de estudos com vacinas contra *Staphylococcus aureus* em diversos países, apontam os seguintes benefícios:

- redução do custo de tratamento com antibiótico e com descartes de leite;
- redução da prevalência de mastites clínicas e subclínicas causadas por *S. aureus*;
- aumento da taxa de cura espontânea de infecções causadas por *S. aureus*, reduzindo assim o descarte de animais;

- diminuição da gravidade e duração dos casos de mastite causados por *S. aureus*.

Vaz et al. (2001) em um estudo realizado no Brasil, testando uma vacina baseada em antígenos da pseudocápsula e de uma proteína dependente de ferro da parede celular, obtiveram um efeito sinérgico entre vacinação e tratamento com antibiótico.

Vacinas estafilocócicas tem mostrado sucesso para prevenir infecções quando da utilização de amostras altamente capsuladas, elevando os índices de cura espontânea, mas não impedem a penetração de agentes pelo canal do teto e nem tem sucesso na eliminação de infecções pré-existentes (CALZOLARI, et al., 1997; SANTOS e FONSECA, 2007).

Guidry, et al. (1997), com relação a produção de vacina contra infecções estafilocócicas da glândula mamária bovina, sugerem que, devem ser consideradas as variações regionais dos sorotipos capsulares de *S. aureus*.

2.6 DEFINIÇÃO DE ENCAPSULAÇÃO EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Microorganismos que causam doenças evasivas comumente produzem cápsula polissacarídea extracelular (ROBBINS, et al., 1980). A cápsula aumenta a virulência bacteriana por promover a resistência bacteriana à fagocitose. A produção de cápsula por *S. aureus* foi descrita primeiramente por Gilbert (1931). Porém, os métodos utilizados para detecção de cápsula eram grosseiros, sendo assim subestimado o real número de *Staphylococcus aureus* positivos para cápsula. Identificavam-se somente cepas altamente encapsuladas (tipificadas por cepa M e Smith difusa), as quais produziam colônias mucóides, resistência a fagocitose e

apresentaram-se virulentas para camundongos (COHN, 1962; KOENIG, 1962; MELLY, et al., 1974; WILEY e MAVERAKIS, 1974; WILKINSON, 1983).

Karakawa e Vann (1982), propuseram um novo método para tipificação capsular de *S. aureus*, baseado na preparação de um adsorvente anti-soro de coelho para tipo específico de *S. aureus*. Esta investigação foi a primeira a relatar um maior número de cepas de *S. aureus* encapsuladas. Foram por eles descritos oito sorotipos capsulares. As cepas M e Smith difusa foram designadas como sorotipos 1 e 2, respectivamente. Cepas destes dois sorotipos produzem colônias mucóides em meio sólido, e são raramente encontradas em isolados clínicos (ARBEIT, et al., 1984; HOCHKEPPEL, et al., 1987; KARAKAWA e VANN, 1982; LEE, et al., 1990; SOMPOLINSKY, et al., 1985). Amostras dos demais sorotipos não produzem colônias mucóides em meio sólido, e a morfologia destas colônias é indistinguível à das cepas que não expressam cápsula (O'RIORDAN e LEE, 2004).

Estudos de sorotipos de *Staphylococcus* isolados de diversas coleções de cepas, representando numerosas regiões geográficas tem revelado que 75 – 80% dos isolados de humanos produzem CP tipo 5 (CP5) ou 8 (CP8) (ARBEIT, et al., 1984; HOCHKEPPEL, et al., 1987; KARAKAWA e VANN, 1982; LEE, et al., 1990; ROGHMANN, et al., 2005; SOMPOLINSKY, et al., 1985). Estes dois sorotipos são prevalentes entre amostras isoladas de infecções clínicas. Sorotipos capsulares 5 e 8 são também produzidos por cepas de *S. aureus* isoladas de vacas, cabras, ovelhas, coelhos, aves domésticas, suínos e eqüinos (DAUM, et al., 1994; GUIDRY, et al., 1997; POUTREL e SUTRA, 1993; SORDELLI, et al., 2000; TOLLERSRUD, et al., 2000b). Os tipos capsulares 5 e 8 foram localizados na superfície de isolados clínicos por microscópio imunoeletrônico com anticorpos monoclonais tipo específico

para estabilizar e visualizar os polissacarídeos (Figura 7) (HOCHKEPPEL, et al., 1987; SOMPOLINSKY, et al., 1985).

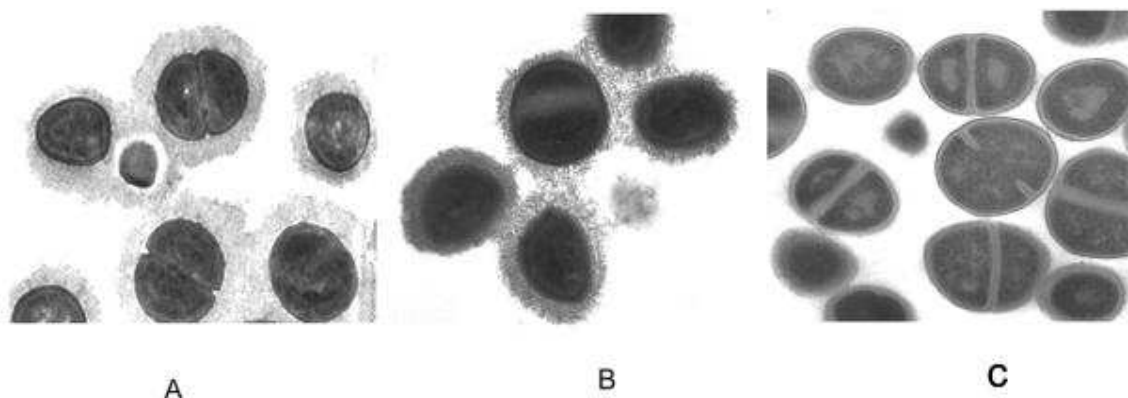


Figura 7 – Visualização em microscópio eletrônico de *Staphylococcus aureus* CP5 (A), CP8 (B) e não capsulado (C).

Fonte: Sompolinsky, et al. (1985).

Sompolinsky, et al. (1985) sorotipando uma grande coleção de *S. aureus* isolados de diferentes origens, encontrou três novos sorotipos, aumentando o número de possíveis sorotipos capsulares para onze.

Cepas que não reagem com anticorpos para cápsulas tipos 1, 2, 5, ou 8 são correntemente denominadas de não tipificáveis (NT) (ALBUS, et al., 1988; ARBEIT, et al., 1984; COCCHIARO, et al., 2006; HOCHKEPPEL, et al., 1987; SOMPOLINSKY, et al., 1985), desde que nenhum outro sorotipo seja avaliado (O'RIORDAN e LEE, 2004). Cepas NT, tem importância no desenvolvimento de vacinas, pois vacinas produzidas a partir de polissacarídeos capsulares de *S. aureus*, não irão promover proteção contra as mesmas (COCCHIARO, et al., 2006).

2.7 TIPIFICAÇÃO CAPSULAR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE LEITE MASTÍTICO

A tipificação de amostras isoladas de mastite bovina tem sido investigada como subsídio ao conhecimento da epidemiologia e à identificação de elementos que auxiliem no controle da doença (JARAMILLO, 1996).

A expressão de cápsula polissacarídea foi bem demonstrada *in situ* em mastite bovina experimental (HENSEN, et al., 2000). O material da cápsula polissacarídea foi detectado *in vivo* em *S. aureus* envolvido em mastite bovina e no leite de uma glândula mamária infectada (JOHNE, et al., 1989; SUTRA e POUTREL, 1990).

Watts, et al. (2005) demonstraram que as cepas que expressam CP5 são mais virulentas que cepas produtoras de CP8, num modelo com ratos. As cepas produtoras de CP5 apresentaram maior resistência *in vitro* a opsonofagocitose e morte por neutrófilos.

Atualmente, dos onze sorotipos baseados em polissacarídeos capsulares (CPs) de *Staphylococcus aureus*, quatro (CP1, CP2, CP5 e CP8) são quimicamente conhecidos e utilizados nos estudos de tipificação capsular (KAMPEN, et al., 2005; LEE, 2001; O'RIORDAN e LEE, 2004).

Até o momento, avaliações realizadas, mostram uma grande variação geográfica na prevalência epidemiológica dos diferentes tipos capsulares em isolados de bovinos (Tabela 1). Os sorotipos capsulares 5 e 8 representam 95% dos isolados de vacas na Noruega (TOLLERSRUD, et al., 2000a), mas somente 14% das amostras isoladas na Argentina (SORDELLI, et al., 2000). Entretanto, aproximadamente, 70% dos isolados bovinos da Europa (GUIDRY, et al., 1998; POUTREL, et al., 1988; TOLLERSRUD, et al., 2000b) e dos Estado Unidos (GUIDRY, et al., 1997; TOLLERSRUD, et al., 2000b) produzem CP5 ou CP8.

Investigando tipos de cápsula, Naidu, et al. (1991) relataram que 72% em 100 *S. aureus* isolados de bovinos com mastite produziam CP5 ou CP8. Esta investigação, entretanto, não dispõe da origem geográfica dos isolados.

Tabela 1 – Prevalência de sorotipos de *S. aureus*, baseados em polissacarídeos capsulares, de isolados de leite em diferentes países.

Local	N	CP5 (%)	CP8 (%)	NT (%)	(Autor, Ano)
Israel	17	5,9	11,8	82,3	(SOMPOLINSKY, et al., 1985)
França	212	51	18	30,6	(POUTREL, et al., 1988)
(*)	100	46	26	28	(NAIDU, et al., 1991)
EUA	273	18	23	59	(GUIDRY, et al., 1997)
Europa ¹	94	34	34	32	(GUIDRY, et al., 1998)
EUA	362	15	27	58	(TOLLERSRUD, et al., 2000b)
Europa ²	274	12	51	37	(TOLLERSRUD, et al., 2000b)
Dinamarca	39	5	59	36	(TOLLERSRUD, et al., 2000b)
Suécia	38	11	76	13	(TOLLERSRUD, et al., 2000b)
Finlândia	62	27	21	52	(TOLLERSRUD, et al., 2000b)
Islândia	34	29	38	33	(TOLLERSRUD, et al., 2000b)
Irlanda	101	1	61	38	(TOLLERSRUD, et al., 2000b)
Coréia	107	30	18,6	51,4	(HAN, et al., 2000)
Argentina	195	7,1	6,6	86,3	(SORDELLI, et al., 2000)
Noruega	68	-	95	-	(TOLLERSRUD, et al., 2000a)
Japão	231	24,2	65,4	10,4	(HATA, et al., 2006)

¹ França (n= 22), Países Baixos (n= 36), Alemanha (n= 21) e Reino Unido (n= 15).

² Dinamarca (n= 36), Suécia (n= 38), Finlândia (n= 62), Islândia (n= 34), Irlanda (n= 101).

(*) – Não há informações sobre a origem geográfica dos isolados.

Poutrel, et al. (1988) em um levantamento sobre a presença de sorotipos 5 e 8 em leite mastítico de vacas, cabras e ovelhas de várias regiões da França, verificou um predomínio de tipo 8 em cabras e ovelhas. Já em 212 isolados de vacas oriundos de 96 rebanhos, o tipo 5 (n = 109; 51%) foi mais prevalente que tipo 8 (n = 38; 18%) e 65 (31%) foram NT.

Guidry, et al. (1997) estudando a prevalência de sorotipos capsulares de *S. aureus* nos Estados Unidos, em 273 amostras isoladas de leite mastítico de 178 rebanhos bovinos, observaram que a incidência de CP5 (n = 50; 18%) apresentou-se inferior a de CP8 (n = 63; 23%), sendo o restante NT (n = 160; 59%).

Os resultados de sorotipificação capsular de 274 *S. aureus* isolados de mastite bovina na Europa (Dinamarca, Suécia, Finlândia, Islândia e Irlanda), apontam prevalência de CP8 (n = 140; 51%) em relação a CP5 (n = 33; 12%) e NT representando 37% (101 amostras). Tendência semelhante foi obtida, no mesmo estudo, com 362 isolados de vacas com mastite de sete diferentes estados nos Estados Unidos, apresentando uma prevalência de 27% (98 amostras) de CP8, 15% (54) de CP5 e NT 58% (210). (TOLLERSRUD, et al., 2000b).

No Japão, num estudo com 231 *S. aureus* isolados de vacas com mastite clínica e subclínicas, oriundos de 214 propriedades, foi obtida uma elevada prevalência de tipos capsulares 5 e 8 (aproximadamente 90%). 56 isolados (24,24%) expressaram cápsula sorotipo 5, e 151 isolados (65,37%) expressaram cápsula tipo 8. Nenhum dos isolados expressou cápsula sorotipos 1 ou 2 e a frequência de NT obtida foi de 10,39% (24 isolados) (HATA, et al., 2006).

Han, et al. (2000) estudando a incidência de cápsula polissacarídea em 107 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina na Coreia, encontraram sorotipo

capsular 5 em 32 (29,9%) amostras, sorotipo capsular 8 em 20 amostras (18,6%) e uma prevalência mais elevada de não tipificáveis, 55 amostras (51,4%).

Na Argentina, as NT apresentam maior prevalência, 86,3%, com níveis semelhantes de CP5 e CP8 (7,1% e 6,6%, respectivamente). Conforme a sorotipificação de 195 cepas de *S. aureus* isoladas entre 1989 e 1997 de leite de vacas com mastite, neste país (SORDELLI, et al., 2000). Estes dados, sugerem que os antígenos capsulares 5 e 8, não são bons candidatos a comporem vacinas contra mastite bovina na Argentina (SORDELLI, et al., 2000).

Com base nestes estudos, ressalta-se a importância do conhecimento epidemiológico regional sobre a ocorrência e a prevalência dos sorotipos capsulares, para que, possam ser produzidas vacinas capsulares efetivamente eficientes contra a mastite estafilocócica bovina, auxiliando no controle desta doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram utilizadas neste estudo 312 cepas de *Staphylococcus* sp. (Tabela 2), obtidas entre 1995 e 2006, de leite mastítico oriundo de propriedades produtoras de leite de diferentes estados do Brasil.

As amostras foram isoladas de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina e bubalina. Os isolados incluídos neste estudo são representativos dentre os que causam mastite estafilocócica em bovinos e bubalinos no Brasil.

Estas cepas provieram de coleções de laboratórios de microbiologia do leite de diferentes regiões do país, assim como do laboratório onde fora realizado este estudo (Laboratório de Imunologia e Doenças Infecto-Contagiosas – DOIC CAV/UEDESC). As amostras foram estocadas em meio Caldo Trípico de Soja (Difco, 211825) com 15% de glicerol e 5% de sangue desfibrinado ovino (Caldo Glicerol Sangue), a -20°C . Posteriormente, as mesmas foram cultivadas, identificadas, caracterizadas em relação aos principais fatores de patogenicidade e tipificadas quanto à cápsula polissacarídea (CP).

Tabela 2 – Amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite mastítico, incluídas neste estudo.

Origem Animal	Nº de cepas isoladas do leite: Úbere
Bovinos	256
Bubalinos	56
Total	312

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SP.

3.2.1 Identificação do Gênero

As amostras mantidas em Caldo Glicerol Sangue foram repicadas em placas de Petri contendo meio ágar-sangue (5% de sangue desfibrinado de carneiro), incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, e a leitura realizada após 24 horas de incubação. Foram observadas as características morfológicas das colônias formadas, como tamanho, tipo, coloração e presença de hemólise. Ao microscópio óptico (1000x) foram observados a morfologia, a disposição das células e características tintoriais através da coloração de Gram, conforme Carter, (1988). Posteriormente foram submetidas a provas de identificação bioquímicas (catalase e oxidase) e culturais peculiares ao gênero em questão, segundo Bier, (1975) e Oliveira, (2000).

3.2.2 Identificação de Espécie

Os testes usados para caracterização das amostras de *Staphylococcus* sp. em *S. aureus* e SCN, foram os de produção de coagulase, atividade de DNase, redução do manitol e presença de hemólise (BOERLIN, et al., 2003). O método padrão utilizado para a identificação dos *S. aureus* foi o teste de coagulase.

Também, foi considerada nesta diferenciação a presença de cápsula tipo 5 ou 8 pelo método de *colony immunoblot*, pois estas, somente podem estar presentes em cepas de *S. aureus*.

3.2.2.1 Teste de Coagulase em Tubo

Para verificação da coagulase livre ou estafilocagulase, que é secretada pela bactéria, foi utilizado o método em tubo, segundo (MARTINEZ, et al., 2001). Uma alçada da amostra a ser testada crescida em meio seletivo, Ágar Sal Manitol (Difco, 230650), foi misturada com 0,5 mL de plasma de coelho (Newprov) em tubo de hemólise e incubada a 37°C, sendo observada a cada 30 minutos nas primeiras 4 horas. Após este intervalo de tempo, outra observação era realizada com 24 horas. Qualquer grau de formação de coágulo constituiu um teste positivo.

Foram usadas amostras comprovadamente positiva (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923) e negativa (*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228), além de amostras do plasma de coelho sem inóculo, como controle.

3.2.2.2 Teste de DNase

A atividade da desoxirribonuclease (DNase) foi testada em Ágar DNase (contendo 0,2% de DNA) de acordo com o recomendado pelo fabricante (Difco laboratórios, Detroit, Mich). O DNA é um substrato para a atividade da DNase. O teste de DNase é usado para detectar a degradação de ácido desoxirribonucléico (MACFADDIN, 1985; WASHINGTON, 1985). DNase é uma enzima que quebra o DNA, em subunidades compostas de nucleotídeos. Para verificar a produção de DNase pelas amostras, uma placa de Petri contendo Ágar DNase foi inoculada (em

linha) para cada amostra e incubada a 37°C por 24 horas. Após o crescimento (período de incubação), a placa foi invertida e alagada com uma solução à 1N de ácido clorídrico (HCl) e observada a reação. A positividade do teste, atividade enzimática, foi caracterizada pela presença de uma zona clara circundando o crescimento, o que significa que o DNA presente no ágar foi despolimerizado pela DNase bacteriana (Figura 8). Em ausência da atividade de DNase, o reagente interage com o ácido nucléico intacto, resultando na formação de um precipitado turvo, assim como no restante do meio, devido à precipitação dos sais presentes no mesmo.



Figura 8 – Teste de DNase positivo a direita, com uma zona clara em torno da linha de crescimento e a esquerda DNase negativo.

3.2.2.3 Fermentação de manitol em Ágar Sal Manitol

As 312 cepas foram repicadas em placas de petri contendo Ágar Sal Manitol (Difco, 230650). O *Staphylococcus* tolera crescimento em altas concentrações de sal, portanto cresce neste meio, onde o *S. aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol. A fermentação do manitol, deixa o meio ácido e o indicador de pH vermelho de fenol, muda de vermelho (alcalino) para amarelo (ácido) (BOERLIN, et al., 2003).

Portanto foram consideradas manitol positivas as cepas que apresentaram coloração do meio amarela, após 24 horas de incubação a 37°C (Figura 9).



Figura 9 – Diferença entre fermentação do manitol (ágar amarelo) e não fermentação (ágar vermelho) em Ágar Sal Manitol.

3.2.2.4 Teste de Hemólise

As cepas de *Staphylococcus* sp. foram testadas quanto à presença de hemólise após 24 horas de incubação à 37°C em ágar sangue, preparado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha em Ágar Trípico de Soja (Acumedia, 7100^a). Quanto a hemólise foram registradas como positivas, cepas que apresentavam hemólise e negativa, cepas não hemolíticas (BOERLIN, et al., 2003).

3.3 TÉCNICA DO SERUM-SOFT AGAR – SSA

O meio SSA foi preparado conforme Vaz, et al., (1996). As amostras foram semeadas com agulha em tubos de vidro de 10ml contendo Caldo Trípico de Soja enriquecido com 0,15% de ágar e 5% de soro normal de coelho (Figura 10) e após,

incubadas a 37°C por 24 horas, a morfologia das colônias formadas foi observada contra fundo escuro com luz lateral. As amostras produtoras de cápsula apresentaram crescimento difuso, enquanto as não capsuladas proporcionaram colônias compactas (Figura 11) (FINKELSTEIN e SULKIN, 1958; NORCROSS e OPBEDEECK, 1983).

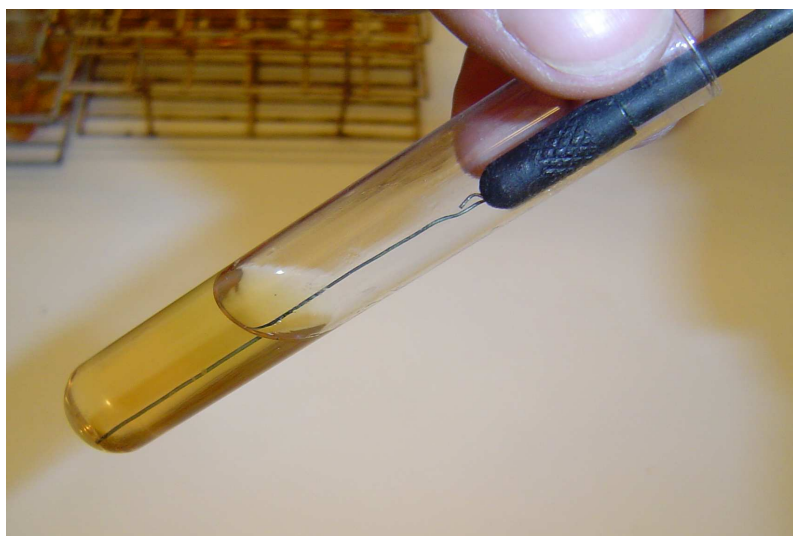


Figura 10 – Inoculação das amostras em SSA.

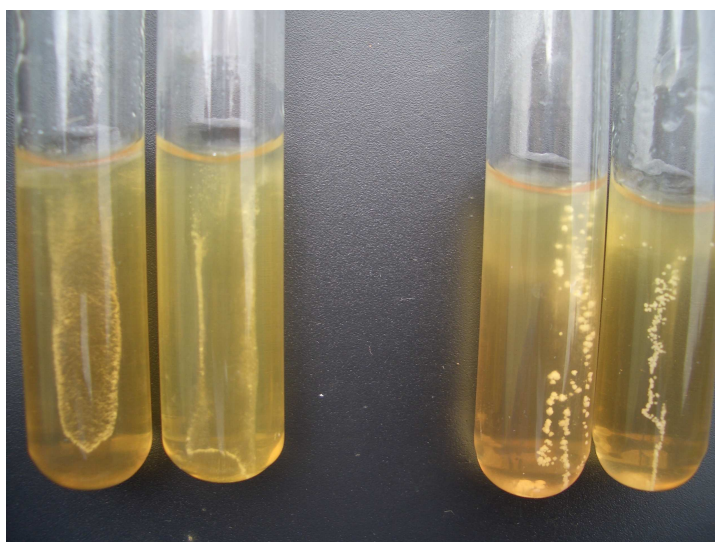


Figura 11 – Colônias de *Staphylococcus* sp. em SSA. A esquerda: colônias difusas, SSA positivos; a direita: colônias compactas, SSA negativos.

3.4 TIPIFICAÇÃO CAPSULAR

A tipificação da cápsula polissacarídea, das 312 amostras de *Staphylococcus* sp. foi realizada através da técnica de *colony immunoblot*, com anticorpos específicos tipo 5 (CP5) ou tipo 8 (CP8), descrita previamente por Lee, et al., (1990). Este teste é rápido e específico, baseado na comparação dos sorotipos capsulares. A reatividade de cada amostra foi avaliada por comparação com as cepas controle (tipos 5 e 8 e não tipificáveis), presentes no filtro de membrana (Figura 12). Todas as amostras foram testadas no mínimo duas vezes. Reação com escore entre 2+ e 4+ foram consideradas positivas. As amostras que não reagiram para anti-soros CP5 e CP8 foram definidas como não-tipificáveis (NT).

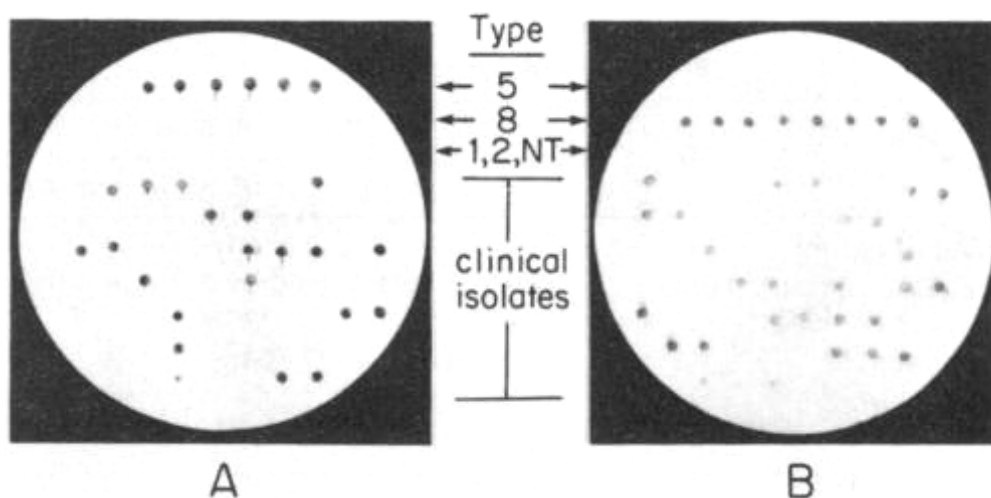


Figura 12 - Reação de *colony immunoblot* com cepas de *S. aureus* controle (tipo 5, 8, 1, e 2 e NT) e isolados clínicos. Os filtros de membrana interagiram com soro de coelho (diluído 1:8,000) reagindo com tipo 5, cepa Reynolds (A) ou soro de coelho (diluído 1:5,000) reagindo com tipo 8, cepa Becker (B).

Fonte: Journal of Clinical Microbiology, Lee, et al. (1990).

O procedimento de soro-tipificação foi realizado somente com anticorpos para os tipos capsulares 5 (CP5) e 8 (CP8), pois cepas com cápsulas tipos 1 (CP1) e 2

(CP2) são facilmente identificadas por apresentarem morfologia característica (colônias mucóides) em meio sólido.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da tipificação capsular foram submetidos ao Teste de χ^2 (Qui-quadrado), utilizando o InStat 3.0 (GRAPHPAD SOFTWARE, 1998), para avaliar as diferenças entre as freqüências dos tipos capsulares em isolados de diferentes origens.

Foram estimadas as freqüências relativa e absoluta da ocorrência de espécies de *Staphylococcus* nos 312 isolados de mastite bovina e bubalina no Brasil e também das características destas em SSA. O intervalo de confiança de 95% para sensibilidade e especificidade dos diferentes testes para identificação de *S. aureus*, foi determinado através do programa InStat 3.0 (GRAPHPAD SOFTWARE, 1998).

A influência dos tipos de cápsula sobre os diferentes testes de identificação de *S. aureus* e também sobre a morfologia das colônias em SSA foi verificada através do Teste Exato de Fisher utilizando SAS 6.12 (SAS INSTITUTE, 1998), pois este teste permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, se as amostras diferem significativamente quanto às proporções destes acontecimentos.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DA TIPIFICAÇÃO CAPSULAR

Anticorpos monoclonais para cápsula tipo 5 e 8 em *colony immunoblot*, permitiram identificar, aproximadamente 71% dos *S. aureus* isolados de vacas e búfalas com mastite, testados (Tabela 8). A distribuição dos tipos capsulares foi significativamente diferente ($P < 0,001$), de acordo com a origem animal dos isolados. O tipo 8 capsular polissacarídeo foi expresso por 51,83%, sendo significativamente o mais freqüente, das cepas de origem bovina, onde 17,07% apresentaram cápsula do tipo 5. O tipo 5 foi significativamente mais prevalente entre as cepas de origem bubalina (62,96%).

Foi constatado, portanto, que há prevalência antigênica de dois tipos capsulares, CP5 e CP8, em *S. aureus* isolados de mastite bovina e bubalina no Brasil, e ausência de outros dois sorotipos, CP1 e CP2. As demais amostras identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativo, apresentaram-se como o esperado, classificadas como NT no teste de *colony immunoblot*.

Tabela 3 – Prevalência dos tipos capsulares dentre as cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina e bubalina no Brasil.

Origem Animal	Nº (%) de isolados		
	Tipo 5	Tipo 8	NT ^a
Vacas	28 (17,07) a ¹ A ²	85 (51,83) c B	51 (31,10) e C
Búfalas	17 (62,96) b E	6 (22,22) d F	4 (14,81) f F

^a Não tipificáveis são amostras que não reagiram para anti-soros CP5 e CP8 em *colony immunoblot*.

¹ Números na mesma coluna seguidos de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente (Teste de qui-quadrado, $P < 0,001$)

² Números na mesma linha seguidos de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente (Teste de qui-quadrado, $P < 0,05$)

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Na identificação por espécie das 312 amostras do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina e bubalina, incluídas neste estudo, foi observada uma maior ocorrência de *S. aureus* em bovinos. Entre os bubalinos prevaleceram os SCN (Tabela 3). Os testes usados para esta identificação foram os de produção de coagulase, atividade de DNase, redução do manitol e presença de hemólise, e também foi considerada a presença de cápsula em *colony immunoblot*.

Tabela 4 – Prevalência de espécies de *Staphylococcus* nos 312 isolados de mastite bovina e bubalina no Brasil.

Espécie	Bovinos [n (%)]	Bubalinos [n (%)]
<i>S. aureus</i>	164 (64,06)	27 (48,21)
SCN	92 (35, 94)	29 (51,79)
Total	256	56

A avaliação estatística de sensibilidade e especificidade foi realizada para as coleções de *Staphylococcus* originários de bovinos e de bubalinos. A performance dos diferentes testes de identificação de *S. aureus* para isolados bovinos são apresentados na Tabela 4 e para isolados bubalinos na Tabela 5. Os métodos que mostraram maior eficácia na identificação de *S. aureus* dentre os isolados bovinos foram coagulase, DNase e manitol. Entretanto, somente os teste de coagulase e DNase foram eficientes na identificação de isolados bubalinos.

Tabela 5 – Sensibilidade e especificidade dos testes para identificação de *S. aureus*, em isolados de origem bovina.

Isolados bovinos (n = 256)		
Critério de identificação	Sensibilidade ^α (%)	Especificidade ^α (%)
	(n=164)	(n=92)
Coagulase positiva, 24 h ^β	92,68 (87,57 - 96,16)	100,0 (96,07 - 100,0)
DNase positiva ^β	94,51 (89,83 - 97,46)	26,09 (17,46 - 36,31)
Redução do manitol ^β	81,10 (74,25 - 86,79)	61,96 (51,29 - 71,89)
Presença de hemólise ^γ	86,59 (80,41 - 91,41)	17,39 (10,27 - 26,71)

^α Número no parênteses representa o intervalo de confiança de 95%.

^β Altamente significativo (Teste Exato de Fisher, P<0,0001).

^γ Não significativo (Teste Exato de Fisher, P>0,05).

Em relação aos isolados bovinos, das 164 cepas classificadas como *S. aureus*, pelo critério de reação positiva a coagulase e presença de cápsula detectada pelo *colony immunoblot*, apenas 12 foram negativas ao teste de coagulase, mostrando este ser bastante sensível, já o mesmo apresentou 100% de especificidade. A atividade de DNase foi bastante sensível (94,54%), porém pouco

específica (26,09%), pois dos 92 isolados classificados como SCN, 68 apresentaram atividade de DNase. O manitol foi reduzido em 133 das 164 cepas de *S. aureus* e em 35 das 92 de SCN. A presença de hemólise foi constatada em 142 amostras de *S. aureus* e em 76 de SCN, apresentando sensibilidade não muito elevada (86,59%) e especificidade muito baixa (17,39%) mostrando não ser um teste significativo para a identificação de *S. aureus*.

Tabela 6 – Sensibilidade e especificidade dos testes para identificação de *S. aureus*, em isolados de origem bubalina.

Critério de identificação	Isolados bovinos (n = 56)	
	Sensibilidade ^α (%)	Especificidade ^α (%)
	(n=27)	(n=29)
Coagulase positiva, 24 h ^β	92,59 (75,69 - 99,09)	100,0 (87,24 - 100,0)
DNase positiva ^β	70,37 (49,79 - 86,26)	65,52 (45,62 - 82,05)
Redução do manitol ^γ	25,93 (11,11 - 46,26)	48,28 (29,43 - 67,47)
Presença de hemólise ^γ	33,33 (16,51 - 54,00)	79,31 (60,25 - 92,01)

^α Número no parênteses representa o intervalo de confiança de 95%.

^β Significativo (Teste Exato de Fisher, P<0,01).

^γ Não significativo (Teste Exato de Fisher, P>0,05).

Na identificação de *S. aureus* dentre os isolados bubalinos, o desempenho do teste de coagulase foi semelhante ao verificado em bovinos. O teste de DNase apresentou uma boa sensibilidade (70,37%) e especificidade (65,52). Nos demais testes, redução de manitol e presença de hemólise foram observado uma baixa sensibilidade (25,93% e 33,33% respectivamente), sendo que por isso, estes não foram eficazes na identificação de *S. aureus*.

Com relação às cepas de *S. aureus* de bovinos e bubalinos, a positividade

nos testes de caracterização de espécie não sofreu influência do tipo de cápsula ($P>0,05$) segundo avaliação estatística de proporções pelo Teste Exato de Fisher.

4.3 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS EM SSA

Dentre os isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos, tanto de bovinos como de bubalinos, foi observada uma elevada ocorrência de colônias difusas em SSA (Tabela 6). Entre os isolados bovinos de *S. aureus* a proporção de colônias difusas e compactas em SSA foram semelhantes, 53% e 47% respectivamente. No entanto, entre as amostras de búfalos a maior ocorrência (77,8%), foi de colônias difusas.

Tabela 7 – Morfologia das colônias de *Staphylococcus*, de 312 amostras de mastite bovina e bubalina em SSA.

SSA	Bovinos [n (%)]		Bubalinos [n (%)]	
	<i>S. aureus</i>	SCN	<i>S.aureus</i>	SCN
CD+	87 (53)	84 (91,3)	21 (77,8)	25 (86,2)
CC-	77 (47)	8 (8,7)	6 (22,2)	4 (13,8)
Total	164	92	27	29

CD+: Colônias difusas, SSA positivo

CC-: Colônias compactas, SSA negativo

Avaliando morfologia das cepas de *S. aureus* bovinas em SSA, nos diferentes tipos capsulares, foi observada uma diferença significativa ($p<0,05$) na ocorrência de colônias difusas entre os diferentes sorotipos (Tabela 7).

Tabela 8 – Ocorrência de colônias difusas em SSA, nos diferentes tipos capsulares de *S. aureus* isolados de bovinos.

Morfologia em SSA	CP5 (%)	CP8 (%)	NT (%)
CD +	71,43 a ¹	44,71 b	56,86 ab

¹ Números seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente (Teste Exato de Fisher, P<0,05)

5 DISCUSSÃO

5.1 TIPIFICAÇÃO CAPSULAR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Polissacarídeos capsulares, muito comumente dos sorotipos 5 e 8, são produzidos por isolados de *S. aureus* humanos independentemente da origem. Estudos sobre prevalência de cepas encapsuladas em bovinos têm apresentado diferentes resultados, com uma prevalência variável de cepas que reagem com anticorpos para CP5 ou CP8 em diferentes países (Tabela 1). A diferença de produção de cápsula entre isolados humanos e bovinos provavelmente reflete a limitada diversidade de amostras isoladas de bovinos dentro de uma região geográfica em particular (TOLLERSRUD, et al., 2000b). Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo para descrever a prevalência de sorotipos capsulares em isolados de bovinos no Brasil. Já em relação aos isolados de bubalinos não encontramos nenhuma referência na literatura mundial, em relação a sorotipificação capsular.

Existem vários métodos para tipificação capsular. Utilizamos neste experimento o *colony immunoblot* por ser um método que facilita a tipificação de um grande número de amostras, além de ser um teste rápido e específico, baseado na comparação dos sorotipos capsulares (LEE, et al., 1990).

O procedimento de soro-tipificação foi realizado somente com anticorpos para os tipos capsulares 5 (CP5) e 8 (CP8), uma vez que cepas que expressão os tipos 1 (CP1) e 2 (CP2) possuem colônias com morfologia mucóide, facilmente identificadas quando do crescimento em placas de ágar, e são extremamente raras (ARBEIT, et al., 1984; SOMPOLINSKY, et al., 1985).

5.1.1 Tipificação capsular de isolados bovinos

Foi verificado que há prevalência antigênica de dois tipos capsulares, CP5 e CP8, em *S. aureus* isolados de mastite bovina no Brasil. Dados epidemiológicos semelhantes foram obtidos na Europa (POUTREL, et al., 1988; TOLLERSRUD, et al., 2000b) e nos EUA (GUIDRY, et al., 1997), enquanto na Argentina (SORDELLI, et al., 2000) e em Israel (SOMPOLINSKY, et al., 1985) estes dois sorotipos representam 14 e 17,7% respectivamente.

Na Argentina, Sordelli, et al. (2000) obtiveram uma prevalência surpreendentemente alta de NT (86%). Nestes isolados foi verificado que muitas amostras sofreram deleção do gene *cap* (COCCHIARO, et al., 2006). O gene *cap* é o que determina a expressão de cápsula entre os *S.aureus*, segundo Cocchiaro, et al. (2006). Estudos anteriores haviam demonstrado a existência de cepas NT que apresentam o gene requerido para a expressão da cápsula (BHASIN, et al., 1998; LEE, et al., 1994; WANN, et al., 1999). Estas cepas carregam uma cópia intacta do gene *cap5*, mas uma mutação no gene *cap5E* confere a ausência de cápsula (WANN, et al., 1999).

Não foram encontradas amostras com as características típicas dos sorotipos CP1 e CP2, confirmando observações de outros autores, de que os tipos 1 e 2 capsular polissacarídeos são raros em isolados clínicos de *S. aureus* (ALBUS, et al.,

1988; ARBEIT, et al., 1984; HOCHKEPPEL, et al., 1987; KARAKAWA e VANN, 1982; POUTREL, et al., 1988; SOMPOLINSKY, et al., 1985).

A nível nacional, detectou-se uma alta proporção de CP8 (51,8%) em isolados de leite mastítico bovino (Figura 13), assim como visto nos países nórdicos (Dinamarca, Suécia, Islândia e Noruega), na Irlanda (TOLLERSRUD, et al., 2000a; TOLLERSRUD, et al., 2000b) e no Japão (HATA, et al., 2006). Contrariamente, Poutrel, et al. (1988) relatam que cepas sorotipo 5 prevaleceram em 212 isolados da França, enquanto somente 18% foram sorotipos 8 (Tabela 1). Em outro trabalho na Europa, com amostras da Alemanha, França, Inglaterra e Holanda, foi observado uma semelhante distribuição de isolados sorotipos 5, sorotipo 8, e NT (GUIDRY, et al., 1998).

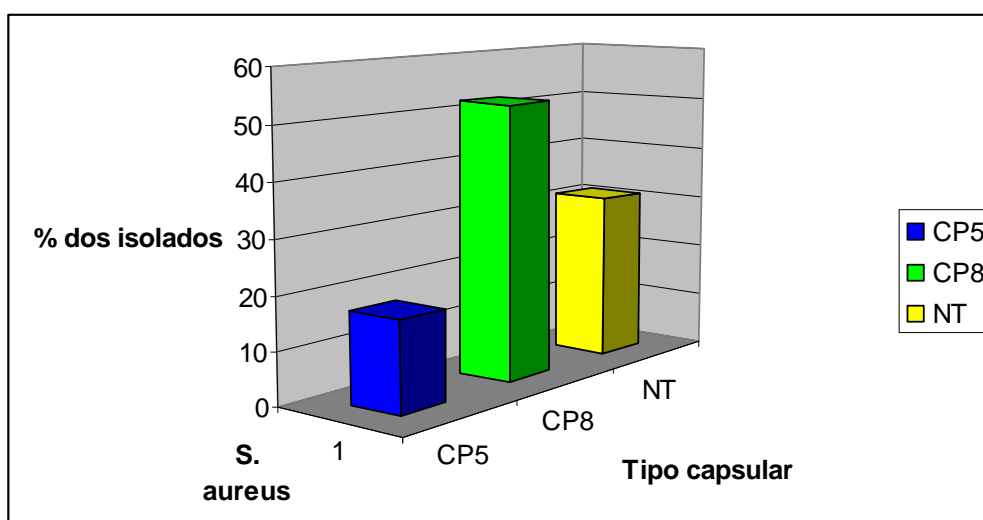


Figura 13 – Prevalência de sorotipos capsulares de 164 isolados de *S. aureus* de leite mastítico bovino no Brasil.

Uma situação epidemiológica diferente foi encontrada na Coreia, onde foi observado que aproximadamente metade (51,4%) dos 107 isolados de *S. aureus* foram NT, e dentre os capsulados foi obtido uma prevalência de sorotipo 5 (30%), enquanto a frequência de sorotipo 8 foi de 18,6%.

Os resultados confirmam a variabilidade na produção de cápsula por isolados de *S. aureus* bovinos de diferentes regiões geográficas. A epidemiologia dos sorotipos capsulares difere geograficamente, e isso tem importância relevante na produção de vacinas contra mastite estafilocócica. Estas devem conter antígenos capsulares específicos para as cápsulas existentes, para desta forma, apresentarem uma maior efetividade na prevenção da mastite bovina estafilocócica.

Os polissacarídeos capsulares de *S. aureus* são anti-fagocíticos e são um dos fatores de virulência mais importantes produzidos por estes patógenos (KARAKAWA e VANN, 1982; PETERSON, et al., 1978; THAKKER, et al., 1998). Estes polissacarídeos capsulares são sorotipos-específicos, e anticorpos para cápsula facilitam a destruição de *S. aureus* por leucócitos aumentando a imunidade do hospedeiro contra infecções estafilocócicas (KARAKAWA, et al., 1988; LEE, et al., 1997; THAKKER, et al., 1998).

5.1.2 Tipificação capsular de isolados bubalinos

Os resultados deste estudo ressaltam a existência de uma considerável variabilidade na prevalência de sorotipos capsulares 5 e 8 em amostras de *S. aureus* isoladas de búfalas de diversas regiões do Brasil (Figura 14). O sorotipo 5 foi o mais prevalente (62,96%), discordando da prevalência sorotípica dos isolados bovinos, onde o sorotipo 8 foi o mais freqüente.

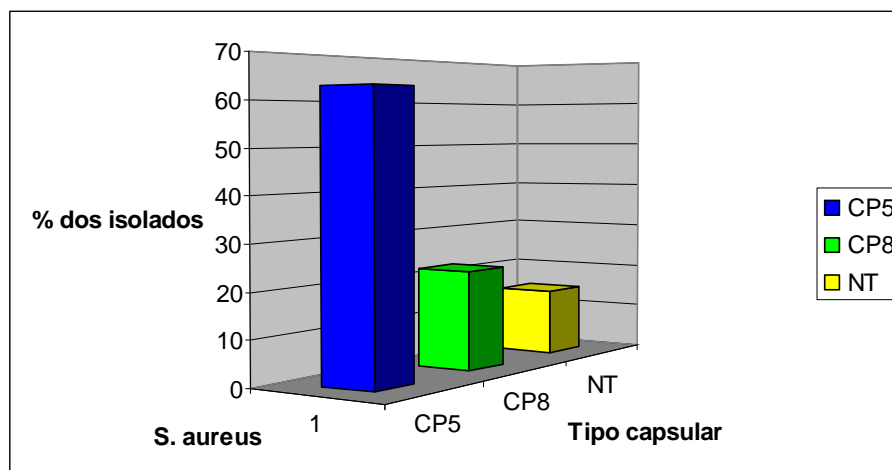


Figura 14 – Prevalência de sorotipos capsulares de 27 isolados de *S. aureus* de leite mastítico bubalino no Brasil.

A prevalência de *S. aureus* capsulados foi maior nos isolados de búfalos do que nos de bovinos, aproximadamente 85 e 71%, respectivamente. Em relação aos isolados bubalinos não existem dados epidemiológicos de outras regiões geográficas, impossibilitando maiores comparações.

Outros dados epidemiológicos sobre sorotipificação de *S. aureus* em animais doméstico, que não de origem bovina, são relatados por Poutrel, et al. (1988), que estudando 54 isolados de cabras e 33 de ovelha, verificaram que o tipo 8 foi significativamente o mais freqüente entre os isolados de origem caprina e ovina (68,5 e 75,8% respectivamente) e o tipo 5 foi o menos freqüente, encontrado em 13 e 3 % dos isolados, respectivamente.

5.1.3 Sorotipo 336 de *Staphylococcus aureus*

Um novo sorotipo de *S. aureus*, chamado 336, tem sido relatado na identificação de cepas tipificadas como NT, quando testadas apenas para CP5 e CP8 (GUIDRY, et al., 1998), mas a composição química deste antígeno não foi bem caracterizada (MA, et al., 2004).

É apresentado como antígeno, embora, não existam evidências de que este seja um antígeno capsular. Investigações tem apontado que o antígeno do sorotipo 336 não está presente somente em estafilococos não encapsulados, mas também foi detectado em algumas cepas sorotipos 5 e 8 (Tabela 10) (HAN, et al., 2000; MA, et al., 2004). Portanto o mais aceito é que o antígeno 336 é um polissacarídeo associado à parede celular, que é produzido em maior abundância ou mais facilmente detectado em cepas com ausência de cápsula (MA, et al., 2004).

Os sorotipos 5 e 8 representavam apenas 41% dos *S. aureus* isolados de amostras de leite nos Estados Unidos, enquanto na Europa estavam presentes em 70% dos isolados de amostras de leite, como observado na Tabela 1. Com a inclusão do recentemente desenvolvido anti-soro 336, passou-se a identificar 100% das amostras dos Estados Unidos e 98% das amostras européias (Tabela 10) (GUIDRY, et al., 1998). Baseado nisso, foi sugerido por Guidry, et al. (1998) o desenvolvimento de uma vacina contra *S. aureus*, mais eficiente, baseada em polissacarídeos capsulares e celulares (antígeno 336).

Tabela 9 – Prevalência de sorotipos de *S. aureus*, baseado em polissacarídeos capsulares e celulares, de isolados em diferentes países.

Local	N	CP5 (%)	CP8 (%)	336 (%)	CP5 + 336 (%)	CP8 + 336 (%)	NT (%)	(Autor, Ano)
EUA	273	18	23	59	---	---	0	(GUIDRY, et al., 1998)
Europa ¹	94	34	34	30	---	---	2	(GUIDRY, et al., 1998)
Coréia	107	12,1	12,1	46,7	17,8	6,5	4,7	(HAN, et al., 2000)

¹ França (n= 22), Países Baixos (n= 36), Alemanha (n= 21) e Reino Unido (n= 15).

--- : Inexistentes.

5.1.4 Sorotipos capsulares e vacinas

Ma, et al. (2004) investigaram a utilização de vacina com uma composição de sorotipos incluindo o antígeno 336 e concluíram que esta bacterina promove uma proteção eficaz, pois induz a produção de anticorpos diretamente contra os três mais prevalentes sorotipos de *S. aureus* causadores de mastite bovina.

Lee, et al. (2005) estudando uma vacina trivalente contra a mastite bovina, contendo *S. aureus* CP5, CP8 e 336, observaram elevação nas subpopulações de linfócitos, aumento na produção de anticorpos (IgG1 e IgG2) e incremento na fagocitose por neutrófilos.

A eficácia da vacinação contra estes três sorotipos foi demonstrada experimentalmente, onde, 54 quartos de novilhas holandesas vacinadas e 20 quartos de não vacinadas foram desafiados através de infusão intramamária com um *pool* de cepas de *S. aureus*. Durante três meses de observação clínica, apenas 6% dos quartos do grupo vacinado desenvolveram mastite estafilocócica crônica, no entanto, 100% das vacas controle desenvolveram mastite crônica (WILLIAMS, et al., 1975).

Em nosso estudo, obtivemos aproximadamente 31% de cepas não-tipificáveis para sorotipos capsulares 5 e 8. Neste contexto, uma sorotipificação baseada em polissacarídeos capsulares e celulares torna-se interessante, pois provavelmente teremos um alto índice destas cepas NT positivas para sorotipo 336, como o observado nos Estados Unidos, Europa e Coréia. Esta informação pode ser importante no desenvolvimento de futuras vacinas efetivamente eficientes contra mastite estafilocócica no Brasil.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SP.

5.2.1 Isolados de Bovinos

A maior ocorrência de *S. aureus* (64,06%) dentre as amostras de bovinos analisadas, vem ao encontro do observado em vários trabalhos no Brasil, os quais, ao estudarem o perfil microbiológico dos rebanhos, têm apontado o *S. aureus* como agente mais freqüentemente isolado de mastite bovina (BARBALHO e MOTA, 2001; BRITO, et al., 1999; COSTA, et al., 1986; LANGENEGGER, et al., 1970; LANGONI, et al., 1990; NADER FILHO, et al., 1983; VIANNI, et al., 1992).

Além de ser um agente contagioso cuja disseminação é aumentada pela intensificação da bovinocultura de leite (HILLERTON, 1996), existem alguns fatores que favorecem esta alta freqüência de isolamentos e que estão relacionados com o maior tempo de permanência desta bactéria no interior da glândula mamária, sendo eles: a elevada capacidade de penetração e instalação nos tecidos mamários com formação de microabcessos (RADOSTITS, et al., 2000), resistência à fagocitose (presença de cápsula) (KAMPEN, et al., 2005), sobrevivência no interior de fagócitos (HILLERTON, 1996) e aquisição de resistência a antimicrobianos (BARBERIO, et al., 2002; DODD e BOOTH, 2000).

5.2.2 Isolados de Bubalinos

Obteve-se uma prevalência, dentre os isolados de leite mastítico bubalino, de *Staphylococcus* coagulase-negativos (51,79%). A tendência de uma maior freqüência de SCN, concorda com dados de levantamentos microbiológicos de mastite subclínicas em búfalas realizados no Brasil (LANGONI, et al., 2001) e em outros países (EL SAGHEER AHMED, et al., 1992). Uma vez que estudos sobre a

incidência de mastite clínica em búfalas são praticamente inexistentes e devem ser consideradas as limitações metodológicas empregadas, nos estudos existentes, o que impossibilita comparações (AMARAL, et al., 2003).

A diferença em relação às prevalências de *S. aureus* entre as espécies estudadas pode estar relacionada aos sistemas de criação destas, mais extensivo nos bubalinos, o que dificulta a disseminação das cepas de *S. aureus*, devido a menor concentração de animais. Outro fator que confere maior resistência a infecção está relacionado a própria estrutura anatômica dos tetos das búfalas que promove uma defesa física mais eficiente da glândula mamária (LAU, 1994; UPPAL, et al., 1994), evitando a penetração de agentes infecciosos, e conseqüentemente reduzindo os índices de mastite por *S. aureus*, pois este agente quando presente na glândula tende a permanecer por longos períodos (VAZ, 2004).

5.2.3 Caracterização fenotípica das amostras de *Staphylococcus aureus*

A confiável e rápida identificação das colônias de *S. aureus* em culturas simples de leite é a base para um controle eficiente da mastite por *S. aureus* (BOERLIN, et al., 2003). Devido à alta sensibilidade e especificidade (BLOBEL e SCHLIESSER, 1994) o teste de coagulase é considerado o método padrão para identificação de *S. aureus* em leite (BOERLIN, et al., 2003). Foram utilizados para esta caracterização, além do teste de coagulase, o teste de DNase, redução de manitol e produção de hemólise (BOERLIN, et al., 2003). Porém, ocorreram discrepâncias nos resultados das provas fenotípicas de 14 amostras estudadas (Tabela 9). No entanto, estas foram identificadas como *S. aureus* por apresentarem cápsula polissacarídea tipo 5 ou 8 identificada pelo método de *colony immunoblot*. Esta conclusão é possível uma vez que somente *S. aureus* produz sorotipos

capsulares do tipo 5 ou 8, devido à não existência de outros sorotipos determinados pelo locus *cap*, e que não existe localização de genes *cap* em outro sitio do genoma (COCCHIARO, et al., 2006). Para a confirmação definitiva da espécie, é necessário submeter às amostras a reação de polimerase em cadeia (PCR) específica de espécie, descrito por Martineau, et al., (1998).

Das 14 amostras que se apresentaram negativas ao teste de produção de coagulase mas que apresentaram cápsulas dos tipos 5 ou 8, 11 foram positivas a pelo menos um dos demais testes de caracterização. Estas amostras provavelmente podem ser classificadas como *S. aureus*, pois o teste de coagulase não oferece 100% de sensibilidade (BOERLIN, et al., 2003). As 3 outras amostras foram negativas a todos os testes utilizados, e estas podem estar relacionadas a margem de erro do teste de *colony immunoblot*.

Assim como *S. aureus*, existem outras espécies de estafilococos, como o *S. hyicus* e o *S. intermedius*, cujas variantes podem apresentar positividade ao teste de coagulase. Porém dentre as amostras de *Staphylococcus* coagulase positivas analisadas neste trabalho, nenhuma foi não hemolítica e negativa aos demais testes fenotípicos o que caracterizaria uma amostra de *S. hyicus* (QUINN, et al., 2005). Quanto ao *S. intermedius*, seu papel como agente da mastite bovina tem sido questionado, pois seu isolamento de rebanhos leiteiros tem sido muito baixo ou ausente (BRITO, et al., 2002; JASPER, et al., 1985; LANGLOIS, et al., 1984; ROBERSON, et al., 1996; WATTS e OWENS, 1989). Além de que, outras espécies de *Staphylococcus* que não o *S. aureus* não expressam sorotipos capsulares 5 ou 8 (POUTREL, et al., 1990).

Tabela 10 – Caracterização fenotípica de 12 amostras bovinas e 2 bubalinas de *S. aureus* isolados de mastite.

Amostras	Hemólise	Coagulase	DNase	Manitol	Tipo Capsular
BOV22	-	-	+	+	CP8
BOV59	-	-	+	+	CP8
BOV70	-	-	+	-	CP5
BOV78	-	-	-	-	CP5
BOV80	-	-	-	-	CP5
BOV89	+	-	+	+	CP8
BOV143	-	-	+	+	CP5
BOV158	-	-	-	+	CP5
BOV168	-	-	-	-	CP8
BOV174	-	-	+	-	CP5
BOV193	+	-	+	-	CP5
BOV208	-	-	+	-	CP5
BUB270	+	-	+	-	CP5
BUB289	+	-	-	+	CP8

5.2.4 Sensibilidade e especificidade dos testes

O teste de coagulase mostrou ser o mais confiável para a identificação de *S. aureus* em leite bovino e bubalino, devido à alta sensibilidade e especificidade observada neste teste (Tabelas 4 e 5). Esta mesma observação foi confirmada por outros autores que consideram o teste de produção de coagulase como método padrão para a identificação de *S. aureus* em leite mastítico (BLOBEL e SCHLIESSER, 1994; BOERLIN, et al., 2003). Boerlin, et al. (2003), no entanto,

estudando uma coleção de 272 *Staphylococcus* isolados de mastite bovina, obteve uma sensibilidade mais elevada para o teste de coagulase (99,4%).

O teste de DNase mostrou uma alta sensibilidade, porém não deve ser usado como único critério para a identificação de *S. aureus* pois apresentou muitos resultados falsos positivos, sendo aconselhada sua utilização associada ao teste de coagulase. Esta baixa especificidade é devida à freqüente presença de uma fraca atividade de DNase em muitas amostras que não de *S. aureus* (principalmente em *S. haemolyticus* alfa-hemolíticos), levando à interpretação equivocada do teste. Além disso outras espécies que não *S. aureus*, também, muitas vezes apresentam uma clara atividade de DNase (principalmente *S. chromogenes*) (BOERLIN, et al., 2003).

A redução do manitol, foi um critério importante na caracterização de *S. aureus* em bovinos mas não em bubalinos. No entanto, mesmo entre os isolados de bovinos a sensibilidade e a especificidade deste não foram muito altas (Tabela 4), conseqüentemente não deve ser considerado como único critério de caracterização de *S. aureus*.

Tanto nos isolados bovinos como nos bubalinos a presença de hemólise não foi um método eficaz na identificação de *S. aureus*, sendo de baixa especificidade entre as amostras bovinas e de baixa sensibilidade entre os isolados bubalinos. Segundo Lam, et al. (1995), apesar de não ser um método muito sensível, a presença de hemólise serve como um critério opcional para a identificação de *S. aureus* em amostras de leite. Visto que a população de *S. aureus* hemolíticos varia de região para região (LARSEN, et al., 2002), a performance deste teste varia em função da população de *S. aureus* estudada e deve ser interpretada com cautela.

5.3 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS EM SSA

A morfologia de colônias difusas indica a presença na bactéria de uma cápsula ou uma espessa camada extracelular dispersa de polissacarídeos (OPBEDEECK, et al., 1988b).

Em nosso estudo obtivemos uma maior porcentagem de colônias com morfologia difusa entre os SCN, tanto de origem bovina como bubalina (Tabela 6). Segundo Christensen, et al.(1985) entre os SCN destaca-se a importância da produção de limo, o qual determina a capacidade da bactéria em produzir biofilme. Este é um fator de virulência relacionado à mastite bovina e está comumente associado a infecções crônicas (AGUILAR, et al., 2001; MELCHIOR, et al., 2006). Portanto, esta maior ocorrência de colônias com morfologia difusa provavelmente está ligada à produção em grande quantidade de uma matriz exopolissacarídea pelos SCN, a qual funciona como uma barreira, impedindo a ligação de fatores de agregação presentes no soro com proteínas específicas da parede celular do SCN. Em adição, foi verificado que na tipificação de cápsula através do método de “*colony immunoblot*” todas as amostras de SCN foram classificadas como NT. Assim sendo, a presença de colônias com morfologia difusa entre os SCN, não reflete a presença de cápsula verdadeira mas de limo.

Dos isolados de *S. aureus* bovinos examinados 53% apresentaram morfologia difusas pelo cultivo em SSA (Tabela 6), discordando de outros estudos que verificaram que o crescimento de colônias difusas em SSA é alto (93%) em isolados de *S. aureus* da glândula mamária de bovinos (NORCROSS e OPBEDEECK, 1983; OPBEDEECK e NORCROSS, 1983). Conforme Opdebeeck, et al. (1987), a presença de cápsula em estafilococos bovinos é comum, porém com o passar do tempo perde-se em subculturas, podendo ser expressa novamente desde que

cultivada em condições apropriadas. Portanto o fato de algumas amostras serem oriundas de coleções, mantidas em subculturas, pode ter apresentado uma influência negativa sobre a expressão de cápsula pela técnica de SSA, em nosso estudo.

No presente estudo, aproximadamente 80% dos *S. aureus* CP tipos 5 e 8 de leite de vaca e búfala produziram colônias difusas em SSA. Em outro estudo com isolados de leite de vaca, cabra e ovelha na Europa, 85% dos *S. aureus* CP tipos 5 e 8 apresentaram colônias difusas em SSA (SUTRA, et al., 1990). Resultados similares também foram encontrados por outros autores nos Estados Unidos (OPBEDEECK e NORCROSS, 1983) e Austrália (OPBEDEECK, et al., 1988a) com isolados de campo de leite bovino incubados em SSA. Em contraste, um número muito baixo de isolados clínicos de origem humana (aproximadamente 31%) apresentaram colônias difusas (OPDEBEECK, et al., 1985).

A morfologia de colônias difusas em SSA é considerada como um critério de encapsulação, parecendo ser uma característica da maioria das cepas de *S. aureus* de leite mastítico de animais domésticos, recentemente isolado ou cultivados em condições apropriadas (HAN, et al., 2000; SUTRA, et al., 1990). Todavia, nossos resultados indicam que morfologia de colônia compacta em SSA, não exclui a possibilidade da amostra ser encapsulada, uma vez que observamos amostras expressando cápsula polissacarídea indicada por “*colony immunoblot*”, e apresentando colônias com morfologia compacta em SSA. Isso concorda com Sutra, et al. (1990), os quais encontraram amostras apresentando colônias compactas em SSA e expressando CP através de ELISA com anticorpos monoclonais.

Outros autores, no entanto, observaram que amostras difusas em SSA, não apresentavam cápsula pela técnica de “microscopic India ink” e afirmam que a

técnica de SSA não é um teste confiável de encapsulação (ANDERSON, 1984). Segundo Wilkinson (1983), o material extracelular produzido neste caso, difere de uma cápsula verdadeira, pois é removido por lavagens com solução salina. Já Rather, et al. (1985) concluíram que estas cepas produzem limo e não cápsula verdadeira.

Em relação a morfologia em SSA, foi observada diferença na proporção de colônias difusas nos isolados bovinos entre as cepas tipos 5 e 8, com maior ocorrência (71,43%) entre as amostras com cápsula tipo 5 (Tabela 7), discordando de Sutra, et al. (1990), que encontraram proporções similares, 85,7 e 85,3%, de morfologia difusa em SSA para cepas tipo 5 e 8, respectivamente. Isolados de *S. aureus* sorotipo 5 produzem mais polissacarídeo capsular e são mais virulentos para ratos que os isolados de *S. aureus* tipos 8 (WATTS, et al., 2005). Portanto, a maior ocorrência de colônias difusas em SSA entre as cepas com cápsula polissacarídea tipo 5, provavelmente seja devido a maior produção de polissacarídeo capsular por este sorotipo.

6 CONCLUSÕES

No Brasil os tipos capsulares polissacarídeos de *Staphylococcus aureus* envolvidos em processos infecciosos da glândula mamária de bovinos e bubalinos, são os sorotipos CP5 e CP8, ocorrendo também cepas caracterizadas como NT. Entretanto não foram encontradas cepas com características de cápsulas polissacarídeas tipo 1 (CP1) e 2 (CP2).

A nível nacional existe uma diferença na frequência antigênica dos tipos capsulares polissacarídeos em cada espécie e entre as espécies estudadas. Nos isolados bovinos há prevalência de cápsula polissacarídea tipo 8, enquanto nos isolados bubalinos a maior ocorrência é de cápsula tipo 5.

Os sorotipos capsulares polissacarídeos de *S. aureus* encontrados no Brasil são iguais aos encontrados em outros países. No entanto, o perfil antigênico aqui encontrado não se assemelha a nenhum levantamento epidemiológico realizado até o momento em outra região geográfica, confirmando a variabilidade geográfica na produção de cápsula por isolados de *S. aureus* bovino.

Portanto, há prevalência antigênica de dois tipos capsulares, CP5 e CP8, os quais se destacam na patogênese e imunoprofilaxia das mastites, no Brasil. Esta informação se torna importante para o desenvolvimento racional de uma vacina capsular para a prevenção da mastite estafilocócica, pois os antígenos

polissacarídeos de superfície do *S. aureus*, são imunógenos sorotipos-específicos e anticorpos para estes antígenos devem estar presentes para que ocorra a opsonofagocitose, ou seja, a eficiência de um vacina estafilocócica está diretamente ligada à presença de antígenos capsulares específicos para as cápsulas existentes.

A morfologia de colônias difusas em SSA é um critério de encapsulação característico das cepas de *S. aureus*. Entretanto, a ocorrência de colônias com morfologia compacta não exclui a possibilidade da amostra de *S. aureus* ser encapsulada. Entre os SCN a presença de colônias difusas em SSA, não reflete a presença de cápsula verdadeira mas de limo.

Em relação aos fatores de patogenicidade do *Staphylococcus*, existe uma grande variabilidade na expressão destes fatores entre as diferentes cepas. Destaca-se a ocorrência de amostras capsuladas e produtoras de coagulase dentre os *S. aureus* em isolados bovinos e bubalinos e uma alta ocorrência de cepas produtoras de limo, conseqüentemente de biofilme, dentre os *Staphylococcus* Coagulase-Negativos. A DNase é produzida pela maioria dos *S. aureus*, no entanto um grande número de cepas de SCN também a secretam.

7 REFERÊNCIAS

AGUILAR, B., AMORENA, B. e ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. **Vet Microbiol.** v. 78, n. 2. p. 183-191. 2001.

ALBUS, A., et al. *Staphylococcus aureus* capsular types and antibody response to lung infection in patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol.** v. 26, n. 12. p. 2505-2509. 1988.

AMARAL, F. R., et al. Mastite Bubalina. **CBQL em Revista.** v. 1, n. 4. p. 16-20. 2003.

ANDERSON, J. C. Absence of encapsulation in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Res Vet Sci.** v. 37, n. 3. p. 359-361. 1984.

ARBEIT, R. D., et al. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 2, n. 2. p. 85-91. 1984.

BARBALHO, T. C. F. e MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Rev Bras Saúde Prod An.** v. 2, n. 2. p. 31-36. 2001.

BARBERIO, A., GIETL, H. e DALVIT, P. "In vitro" sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999 **Revista Nappama.** v. 1, n. 1. p. 53-57. 2002.

BASCUÑÁN, C. C. Perspectivas da estimulação da resposta imune da glândula mamária bovina In: DÜRR, J. W., CARVALHO, M. P. D. e SANTOS, M. V. D. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UFP, 2004. 105-129 p.

BASELGA, R. e ALBIZU, I. **Exopolisacarídeos capsulares bacterianos**. 2004. Disponível em: <www.exopol.com/exo> Acesso em: 25 nov. 2004.

BASELGA, R., ALBIZU, I. e AMORENA, B. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. **Vet Microbiol**. v. 39, n. 3-4. p. 195-204. 1994.

BHASIN, N., et al. Identification of a gene essential for O-acetylation of the Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide. **Mol Microbiol**. v. 27, n. 1. p. 9-21. 1998.

BIBERSTEIN, E. L. e HIRSH, D. C. Estafilococos. In: HIRSH, D. C. e ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. v. 108-112 p.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 16 ed. São Paulo: EDUSP, 1975. 1062p.

BLOBEL, H. e SCHLIESSER, T. Handbuch der bakteriellen infektionen bei tieren. In: JENA, G. F. V. **Staphylokokken-Infektionen und Enterotoxine**. Stuttgart, Germany: 1994. v. 2, p.

BOERLIN, P., et al. Methods for identification of Staphylococcus aureus isolates in cases of bovine mastitis. **J Clin Microbiol**. v. 41, n. 2. p. 767-771. 2003.

BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet J**. v. 164, n. 2. p. 116-128. 2002.

BRAMLEY, A. J., et al. **Current concepts of bovine mastitis**. 4 Madison: National Mastitis Council 1996. 64p.

BRAMLEY, A. J. e DODD, F. H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control--progress and prospects. **J Dairy Res**. v. 51, n. 3. p. 481-512. 1984.

BRANT, M. C. e FIGUEIREDO, J. B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. **Arq Bras Med Vet e Zootec**. v. 46, p. 595-606. 1994.

BRITO, J. R. F., BRITO, M. A. V. P. e ARCURI, E. F. **Controle da mastite – ou como reduzir a Contagem de Células Somáticas do rebanho bovino leiteiro**. 2000. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/lab/controlarmastite.doc>> Acesso em: 05.ago. 2006.

BRITO, M. A. V. P. e BRITO, J. R. F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: BRITO, J. R. F. e BRESSAN, M. **Controle integrado da mastite bovina**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1996. v. 68-96 p.

BRITO, M. A. V. P., et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arq Bras Med Vet e Zootec**. v. 51, n. 2. p. 33-35. 1999.

BRITO, M. A. V. P., CAMPOS, G. M. A. e BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**. v. 32, n. 1. p. 79-82. 2002.

BURTON, J. L. e ERSKINE, R. J. **Immunity and mastitis: some new ideas for an old disease**: The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. W.B. Saunders Company, 2003.

CALZOLARI, A., et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial herds. **J Dairy Sci** v. 80, p. 854-858. 1997.

CAPUTY, G. G. e COSTERTON, J. W. Morphological examination of the glycocalyxes of *Staphylococcus aureus* strains Wiley and Smith. **Infect Immun**. v. 36, n. 2. p. 759-767. 1982.

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.

CHRISTENSEN, G. D., et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **J Clin Microbiol**. v. 22, n. 6. p. 996-1006. 1985.

COCCHIARO, J. L., et al. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol**. v. 59, n. 3. p. 948-960. 2006.

COHN, Z. A. Determinants of infection in the peritoneal cavity. I. Response to and fate of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* in the mouse. **Yale J Biol Med**. v. 35, p. 12-28. 1962.

COLDEBELLA, A. **Contagem de Células Somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas**: 2003. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia) -

Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 2003.

COSTA, B. O. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Rev Bras Med Vet.** v. 17, n. 4. p. 21-26. 1995.

COSTA, E. O., COUTINHO, S. D. e TEIXEIRA, C. M. Etiologia bacteriana da mastite bovina no estado de São Paulo, Brasil. **Rev Microbiol.** v. 17, n. 2. p. 107-112. 1986.

COSTA, E. O., et al. Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cow (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFALO CONGRESS, 5, 1997, Caserta. **Anais...** Caserta: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p.631-634.

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

COUGHLAN, S., HARKISS, G. D. e HUPKINS, J. Enhanced proliferation of CD4+ T cells induced by dendritic cells following antigen uptake in the presence of specific antibody. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 49, n. p. 321-330. 1996.

CRAVEN, N. e WILLIAMS, M. R. Defense of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 10, n. p. 71-127. 1985.

CULLOR, J. S., TYLER, J. W. e SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais.** São Paulo: Manole, 1994. v. 2, 1041-1060 p.

DASSY, B., et al. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. **J Gen Microbiol.** v. 137, n. 5. p. 1155-1162. 1991.

DAUM, R. S., et al. Capsular polysaccharide serotypes of coagulase-positive staphylococci associated with tenosynovitis, osteomyelitis, and other invasive infections in chickens and turkeys: evidence for new capsular types. **Avian Dis.** v. 38, n. 4. p. 762-771. 1994.

DE FRANCISCIS, G. e DI PALO, R. Buffalo milk production. In: WORLD BUFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p.137.

DODD, F. H. e BOOTH, J. M. Mastitis and Milk Production. In: ANDREWS, A. H. **The Health of Dairy Cattle**. Malaten: Blackwell Science, 2000. v. 359 p.

DOMINGUES, P. F. **Controle da Produção Leiteira na Mastite Bovina Subclínica**: 1993. 87 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 1993.

DÜRR, J. W. **Organização da cadeia produtiva para a qualidade do leite**. 2005. Disponível em: <http://www.cbql.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=34&Itemid=64> Acesso em: 15 set. 2006.

EL SAGHEER AHMED, M. S., ALI, L. e HEGAZI, A. G. California Mastitis Test in relation to subclinical mastitis. **Egypt J Anim Prod**. v. 29, n. 2. p. 255-261. 1992.

ENEVOLDSEN, C., GROHN, Y. T. e THYSEN, I. Dairy cow characteristics related to Staphylococcus aureus isolation from quarter samples. **J Dairy Res**. v. 62, n. 1. p. 69-81. 1995.

ESSLEMONT, R. J. e KOSSAIBATI, M. A. Culling in 50 dairy herds in England. **Vet Rec**. v. 140, p. 9-36. 1997.

FATTOM, A., et al. Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. **Infect Immun**. v. 58, n. 7. p. 2367-2374. 1990.

FELIPPSEN, L. F. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região Norte do Paraná. **Ciência Rural**. v. 29, n. 1. p. 87-89. 1999.

FINKELSTEIN, R. A. e SULKIN, S. E. Characteristics of coagulase positive and coagulase negative staphylococci in serum-soft agar. **J Bacteriol**. v. 75, p. 339-344. 1958.

FONSECA, L. F. L. e SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOSTER, T. J. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**. v. 9, p. 221-227. 1991.

GARCIA, V., et al. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 4, n. 1. p. 45-51. 1996.

GILBERT, I. Dissociation in an encapsulated staphylococcus. **J Bacteriol**. v. 21, p. 157-160. 1931.

GRAPHPAD SOFTWARE [computer program]. Version 3.05 San Diego (CA): GraphPad Software, Inc. 1998.

GUIDO, M. C., et al. Female bubaline mastitis etiology in brazilian state of São Paulo. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ÁLLEVAMENTO DEL BÚFALO, 1, 1994. **Anais...** S.l.: s.n.,1994. 1 CD-ROM.

GUIDRY, A., et al. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. **Vet Microbiol**. v. 59, n. 1. p. 53-58. 1997.

_____ Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **Am J Vet Res**. v. 59, n. 12. p. 1537-1539. 1998.

GUIDRY, A. J., BERNING, L. M. e HAMBLETON, C. N. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes. **J Dairy Sci**. v. 76, p. 1285-1289. 1993.

GUIDRY, A. J., et al. Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. **J Dairy Sci**. v. 77, n. 10. p. 2965-2974. 1994.

_____ Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **J Dairy Sci**. v. 74, n. 10. p. 3360-3369. 1991.

HAGIWARA, S. e KAWAI, K. Lactoferrin concentration in milk from normal and subclinical mastitic cows. **J Vet Med Sci**. v. 65, n. 3. p. 319-323. 2003.

HAN, H. R., PAK, S. I. e GUIDRY, A. Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and protection of

S. aureus infection in mice with CP vaccine. **J Vet Med Sci.** v. 62, n. 12. p. 1331-1333. 2000.

HARMON, J. R. e LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practive.** v. 10, n. 1. p. 29-34. 1989.

HATA, E., et al. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. **J Vet Med Sci.** v. 68, n. 2. p. 165-170. 2006.

HENSEN, S. M., et al. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **J Dairy Sci.** v. 83, n. 9. p. 1966-1975. 2000.

HILLERTON, J. E. Controle da mastite bovina. In: BRITO, J. R. F. e BRESSAN, M. **Controle integado da mastite bovina.** Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1996. v. 111 p.

HOCHKEPPEL, H. K., et al. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. **J Clin Microbiol.** v. 25, n. 3. p. 526-530. 1987.

HOGAN, J. S., et al. Opsonic activity of bovine serum and mammary secretion after *Escherichia coli* J5 vaccination. **J Dairy Sci.** v. 75, n. 1. p. 72-77. 1992.

JARAMILLO, J. A. La tipificacion de *Staphylococcus aureus* su importancia epidemiologica en infecciones de la glándula mamaria. **Rev Vet Zoot Caldas.** v. 9, n. p. 34-37. 1996.

JASPER, D. E., INFANTE, F. e DELLINGER, J. D. Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. **J Clin Microbiol.** v. 21, n. 4. p. 582-584. 1985.

JENNINGS, H. J. Capsular polysaccharides as vaccine candidates. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 150, p. 97-127. 1990.

JOHNE, B., JARP, J. e HAAHEIM, L. R. *Staphylococcus aureus* exopolysaccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy. **J Clin Microbiol.** v. 27, n. 7. p. 1631-1635. 1989.

KAMPEN, A. H., TOLLERSRUD, T. e LUND, A. Staphylococcus aureus capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils in vitro. **Infect Immun.** v. 73, n. 3. p. 1578-1583. 2005.

KAPRONEZAI, J., MELVILLE, P. e BENITES, N. R. Análise microbiológica, Teste de Tamis e California Mastitis Test realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do Estado de São Paulo. **Arq Inst Biol.** v. 72, n. 2. p. 179-183. 2005.

KARAKAWA, W. The role of capsular antigens in *Staphylococcus aureus* immunity. **Zbl Bakt.** v. 277, n. 4. p. 415-418. 1992.

KARAKAWA, W. W., et al. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun.** v. 56, n. 5. p. 1090-1095. 1988.

KARAKAWA, W. W. e VANN, W. F. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. **Semin Infect Dis.** v. 4, p. 285-293. 1982.

KEHRLI, M. E., JR. e HARP, J. A. Immunity in the mammary gland. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** v. 17, n. 3. p. 495-516, vi. 2001.

KOENIG, M. G. Factors relating to the virulence of staphylococci. I. Comparative studies on two colonial variants. **Yale J Biol Med.** v. 34, p. 537-559. 1962.

KUMAR, R. e BATHIA, K. L. Lactoperoxidase activity in buffalo milk and whey. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p. 2009-2220.

LADEIRA, S. R. L. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A. L. e MENDES, M. D. C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** Pelotas: UFPEL Universitaria, 1998. v. 651 p.

LAM, T. J., et al. The differentiation of *Staphylococcus aureus* from other Micrococcaceae isolated from bovine mammary glands. **J Appl Bacteriol.** v. 79, n. 1. p. 69-72. 1995.

LAMMERS, A., et al. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. **Vet Microbiol.** v. 80, n. 3. p. 255-265. 2001.

LANGENEGGER, H., et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesq Agropec Bras.** v. 5, p. 437. 1970.

LANGLOIS, B. E., HARMON, R. J. e AKERS, K. Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the DMS Staph-Trac system. **J Clin Microbiol.** v. 20, n. 2. p. 227-230. 1984.

LANGONI, H., et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). **ARS Veterinária.** v. 17, n. 3. p. 213-217. 2001.

_____ Mastite bovina subclínica: etiologia e sensibilidade bacteriana **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 14, n. 1. p. 11-31. 1990.

LARANJA, L. F. e MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. **Sci. agric.** . v. 51, n. 3. p. 578-585. 1994.

LARSEN, H. D., AARESTRUP, F. M. e JENSEN, N. E. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. **Vet Microbiol.** v. 85, n. 1. p. 61-67. 2002.

LAU, H. D. Important economic diseases in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p.209-220.

LEE, J. C., et al. Virulence studies, in nice, of transposon induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsular size. **J Infect Dis.** v. 156, p. 741-750. 1987.

_____ Expression of type 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin 1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** v. 28, n. 12. p. 2612-2615. 1990.

_____ Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a model of endocarditis in rats. **Infect Immun.** v. 65, p. 4146-4151. 1997.

_____ Genetic analysis of type 5 capsular polysaccharide expression by *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** v. 176, n. 16. p. 4883-4889. 1994.

LEE, J. W., et al. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. **Can J Vet Res.** v. 69, n. 1. p. 11-18. 2005.

LEE, J. Y. Capsule production. In: HONEYMAN, A. L., FRIEDMAN, H. e ENDINELLI, M. ***Staphylococcus aureus* infection and disease.** New York, N.Y.: Plenum, 2001. 35-45 p.

LOEFFLER, D. A., MCDERMOTT, M. P. e NORCROSS, N. L. Evaluation by enzyme-linked immunoglobulins to surface exopolysaccharide antigen in cows with staphylococcal mastitis. **Cornell Vet.** v. 77, p. 293-302. 1987.

LONGO, F., et al. Quelques données épidémiologiques sur les mammites subcliniques de la vache laitière. **Revue Méd Vet.** v. 145, n. 1. p. 43-47. 1994.

MA, J., COCCHIARO, J. e LEE, J. C. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. **J Dairy Sci.** v. 87, p. 178-182. 2004.

MACFADDIN. **Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1985.

MARTINEAU, F., et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** v. 36, p. 618-623. 1998.

MARTINEZ, T. C. N., et al. Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Rev Bras Saúde Prod An.** v. 1, n. 2. p. 48-53. 2001.

MAYER, S. J., et al. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. **Res Vet Sci.** v. 47, n. 2. p. 152-157. 1989.

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

MELLY, M. A., et al. Biological properties of the encapsulated *Staphylococcus aureus* M. **Infect Immun.** v. 10, n. 2. p. 389-397. 1974.

MENDONÇA, C. L., et al. Etiologia da mastite bovina. **Vet Not.** v. 5, n. 1. p. 107-118. 1999.

MERCHANT, I. A. e PACKER, R. A. **Bacteriologia y virologia veterinarias.** Zaragoza: Acribia, 1970. 768p.

NADER FILHO, F. A., SHOCKEN-ITURRINO, R. P. e ROSSI JR., O. D. Mastite bovina em rebanhos produtores de leite tipo B. **Arq Bras Med Vet e Zootec.** v. 35, n. 5. p. 621-630. 1983.

NAG, N. C. Staphylococcal mastitis in cows, buffaloes and goats and their antibiotic sensitivity. **Indian J Anim Health.** v. 14, p. 169-173. 1995.

NAGASE, N., et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. **J Vet Med Sci.** v. 64, n. 12. p. 1169-1172. 2002.

NAIDU, A. S., et al. Comparison between lactoferrin and subepithelial matrix protein binding in *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis. **J Dairy Sci.** v. 74, n. 10. p. 3353-3359. 1991.

NONNECKE, B. J., KEHRLI, M. E. J. e HARP, J. A. Function and regulation of the cellular immune response with reference to the bovine mammary gland. **J Dairy Sci.** p. 1988.

NORCROSS, N. L. e OPBEDEECK, J. P. Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Vet Microbiol.** v. 8, p. 397-404. 1983.

NORDHAUG, M. L., et al. A field trial with an experimental vaccine against staphylococcus-aureus mastitis in cattle .2. antibody-response. **J Dairy Sci.** v. 77, n. 5. p. 1276-1284. 1994.

O'BRIEN, C. N., et al. Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. **J Dairy Sci.** v. 83, n. 8. p. 1758-1766. 2000.

O'RIORDAN, K. e LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clin Microbiol Rev.** v. 17, n. 1. p. 218-234. 2004.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária.** 2 ed. Canoas: ULBRA, 2000. 237p.

OLIVER, S. P. e SORDILLO, L. M. Approaches to the manipulation of mammary involution. **J Dairy Sci.** v. 72, p. 1647-1664. 1989.

OPBEDEECK, J. P. e NORCROSS, N. L. Frequency and immunologic cross-reactivity of encapsulated *Staphylococcus aureus* in bovine milk in New York. **Am J Vet Res.** v. 44, p. 986-988. 1983.

OPBEDEECK, J. P., O'BOYLE, D. A. e FROST, A. J. Encapsulated *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Aust Vet J.** v. 65, p. 194-195. 1988a.

OPBEDEECK, J. P., WATSON, D. L. e FROST, A. J. Colony morphology of *Staphylococcus aureus* in Serum-Soft Agar following in vivo e in vitro growth **Vet Microbiol.** v. 16, p. 87-91. 1988b.

OPBEDEECK, J. P., et al. The expression of capsule in serum-soft agar by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet Microbiol.** v. 13, n. 3. p. 225-234. 1987.

OPBEDEECK, J. P., O'BOYLE, D. e FROST, A. J. The expression of capsule in serum-soft agar by *Staphylococcus aureus* isolated from human clinical sources. **J Med Microbiol.** v. 20, n. 2. p. 275-278. 1985.

PAAPE, M., et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** v. 7, n. 2. p. 109-121. 2002.

PEORALA, S. New strategies to prevent mastitis. **Reprod Dom Anim.** v. 37, p. 211-216. 2002.

PERSSON, K., SANDGREN, C. H. e RODRIGUEZ, M. H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. **Am J Vet Res.** v. 53, n. 12. p. 2235-2240. 1992.

PETERSON, P. K., et al. Influence of encapsulation on staphylococcal opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun.** v. 19, n. 3. p. 943-949. 1978.

PHILPOT, W. N. Qualidade do leite e controle de mastite: passado presente e futuro. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, 2, 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, p.23-38.

PIRES, M. F. Á., BRITO, J. R. F. e BRITO, M. A. V. P. **Homeopatia: uma opção de tratamento da mamite bovina**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2004. 40p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 100).

POOLMAN, J. T. Polysaccharides and membrane vaccines. In: MIZIAHI, A. **Advances in the biological process bacterial vaccines**. New York, N. Y.: Wiley-Liss, 1990. v. 13, 57-86 p.

POUTREL, B., et al. Prevalence of capsular polysaccharide type 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat and ewe milk. **J Clin Microbiol**. v. 26, n. 1. p. 38-40. 1988.

_____ Reactivity of coagulase-negative staphylococci isolated from cow and goat milk with monoclonal antibodies to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8. **J Clin Microbiol**. v. 28, n. 2. p. 358-360. 1990.

POUTREL, B. e SUTRA, L. Type 5 and 8 capsular polysaccharides are expressed by *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits, poultry, pigs and horses. **J Clin Microbiol**. v. 31, n. 2. p. 467-469. 1993.

PROJAN, S. J. e NOVICK, R. P. The molecular basis the pathogenicity. In: CROSSLEY, B. K. e ARCHER, G. L. **The staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. 55-81 p.

QUESSY, S., et al. Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. **FEMS Microbiol Lett**. v. 115, n. 1. p. 19-26. 1994.

QUINN, P. J., et al. *Staphylococcus* species. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby-Year Book Europe, 1994. v. 118-126 p.

_____ **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

QUIROGA, G. H. Mecanismos de defesa de la glandula mamaria bovina. Revision de literatura. **Rev Med Vet**. v. 74, n. 5. p. 288-292. 1993.

RADOSTITS, O. M., et al. **Clinica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1737p.

RAHMAN, H. e BAXI, K. K. Studies on staphylococcal mastitis in bovine. **Indian Vet J.** v. 60, p. 865-869. 1983.

RAINARD, P. e POUTREL, B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. **J Dairy Sci.** v. 83, n. 5. p. 945-951. 2000.

RATHER, P. N., DAVIS, A. P. e WILKINSON, B. J. Slime production by bovine milk *S. aureus* and identification of coagulase negative staphylococcal isolates. **J Clin Microbiol.** v. 23, p. 858-862. 1985.

RIBEIRO, M. E. R., et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. **R Bras Agrociência.** v. 9, n. 3. p. 287-290. 2003.

RISTOW, L. E., JÚNIOR, A. A. P. e MEIRA, F. A. Coleta de material para análise laboratorial e diagnóstico de mastite. **Leite Integral.** v. 1, n. 1. p. 46-48. 2006.

ROBBINS, J. B., et al. Virulence properties of bacterial capsular polysaccharides-unanswered questions. In: SMITH, H., SKEHEL, J. e TURNER, M. **The molecular basis of microbial pathogenicity.** Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1980. v. 115-132 p.

ROBERSON, J. R., et al. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **Am J Vet Res.** v. 57, n. 1. p. 54-58. 1996.

ROGHMANN, M., et al. Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. **J Hosp Infect.** v. 59, n. 1. p. 27-32. 2005.

ROITT, I., BROSTOFF, J. e MALE, D. **Immunology.** 5. London: Times Mirror International, 1996.

RUSSELL, M. W., BROOKER, B. E. e REITER, B. Inhibition of the bactericidal activity of bovine polymorphonuclear leucocytes and related systems by casein. **Res Vet Sci.** v. 20, n. 1. p. 30-35. 1976.

SAA, E. e KRUIZE, J. [Virulence factors of coagulase-negative *Staphylococcus* of human and bovine origin]. **Rev Latinoam Microbiol.** v. 37, n. 3. p. 201-208. 1995.

SANTOS, M. V. D. **Mastite causa prejuízos, mas pode ser controlada**. 2000. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mn/radarestecnicos/artigos>> Acesso em: 25 nov. 2004.

SANTOS, M. V. D. e FONSECA, L. F. L. D. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite** Barueri, SP: Manole, 2007. 314p.

SAS INSTITUTE [computer program]. version 6.12 Cary, (NC): SAS Intitute. 1998.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. A., NADER FILHO, F. A. e AVILA, G. P. C. Sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positiva isolados em caso de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos **ARS Veterinária**. v. 12, n. 1. p. 57-63. 1996.

SHUKLA, P. C. e SUPEKAR, P. G. Cell count in milk samples of normal and mastitis animals. **Livest Adv**. v. 12, n. 12. p. 44-48. 1987.

SHULTZ, W. Infecções por estafilococos. In: BEER, J. **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. v. 1-9 p.

SHUSTER, D. E., KEHRLI, M. E. e STEVENS, M. G. Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. **Am J Vet Res**. v. 54, n. 1. p. 80-85. 1993.

SILVA, I. D. e SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo J**. v. 10, n. 2. p. 133-137. 1994.

SOLTYS, J. e QUINN, M. T. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. **Infect Immun**. v. 67, n. 12. p. 6293-6302. 1999.

SOMPOLINSKY, D., et al. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. **J Clin Microbiol**. v. 22, n. 5. p. 828-834. 1985.

SORDELLI, D. O., et al. Capsule Expression by Bovine Isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: Genetic and Epidemiologic Analyses. **J Clin Microbiol**. v. 38, n. 2. p. 846-850. 2000.

SORDILLO, L. M. e SCOTT, N. L. Alternative approaches for the prevention and treatment of mastitis. **Bovine Proc**. v. 27, p. 54-60. 1995.

SORDILLO, L. M., SHAFER-WEAVER, K. e DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **J Dairy Sci.** v. 80, n. 8. p. 1851-1865. 1997.

SOUTO, L. I. M., et al. Ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros bovinos no município de São Pedro, estado de São Paulo, Brasil In: 9 Congresso Panamericano do Leite, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Embrapa Gado de Leite, p.299-301.

SUTRA, L., et al. Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitic milk: relationship between capsular polysaccharide types 5 and 8 and colony morphology in serum-soft agar, clumping factor, teichoic acid, and protein A. **J Clin Microbiol.** v. 28, n. 3. p. 447-451. 1990.

SUTRA, L. e POUTREL, B. Detection of capsular polysaccharide in milk of cows with natural intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus*. **Am J Vet Res.** v. 51, n. 11. p. 1857-1859. 1990.

_____ Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol.** v. 40, n. 2. p. 79-89. 1994.

THAKKER, M., et al. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is anti-phagocytic and enhance bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infect Immun.** v. 66, p. 5183-5189. 1998.

TIJARE, D. B., et al. Sensitivity of indirect tests in detection of subclinical mastitis in buffaloes. **Indian Vet J.** v. 76, n. 912-915. p. 1999.

TIMMS, L. L. e SCHULTZ, L. H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **J Dairy Sci.** v. 70, n. 12. p. 2648-2657. 1987.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução.** 6 São Paulo: Roca, 2002. 532p.

TOLLERSRUD, T., et al. Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. **Apmis.** v. 108, n. 9. p. 565-572. 2000a.

_____ Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. **J Clin Microbiol.** v. 38, n. 8. p. 2998-3003. 2000b.

UPPAL, S. K., et al. Natural defence mechanism against mastitis: a comparative histomorfology of buffalo and cow teat canal. **Buffalo J.** v. 10, n. 2. p. 125-131. 1994.

VAZ, A. K. Imunidade na Glândula Mamária. **CBQL em Revista.** v. 3, n. 5. p. 16-19. 2004.

_____ O que as células somáticas realmente representam? In: MESQUITA, A. J., DURR, J. W. e COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil.** Goiânia: Talento, 2006. v. 352 p.

VAZ, A. K. e LUZ, E. P. Efeito da transferrina bovina e outros agentes quelantes do ferro sobre o crescimento in vitro de *Staphylococcus* sp. In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: p.853.

VAZ, A. K., LUZ, E. P. e MEYER, A. Expressão de capsulas por *Staphylococcus* sp. causadores de mastite bovina. In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias - PANVET, 1996, Campo Grande, Brasil. **Anais...** Campo Grande, Brasil: 1996. p.91.

VAZ, A. K., PATERNO, M. R. e MARCA, A. Avaliação de uma vacina estafilocócica como auxílio à antibioticoterapia de mastite subclínica durante o período de lactação. **A Hora Veterinária.** v. 21, n. 124. p. 2001.

VIANNI, M. C. E., et al. Frequência de isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influencia na produção láctea. **Arq Univ Fed Rur RJ.** v. 15, n. 2. p. 187-192. 1992.

WANN, E. R., et al. Genetic analysis of the cap5 locus of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 170, n. 1. p. 97-103. 1999.

WASHINGTON, O. **Laboratory procedures in clinical microbiology.** 2 New York: Springer-Verlag, 1985.

WATSON, D. L. Ovine opsonins for *Staphylococcus aureus* cell wall and pseudocapsule. **Res Vet Sci.** v. 46, p. 84-89. 1989.

_____ Staphylococcal mastitis vaccine. **Vaccine**. v. 10, n. 5. p. 359. 1992a.

_____ Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. **Res Vet Sci**. v. 53, n. 3. p. 346-353. 1992b.

WATSON, D. L. e WATSON, N. A. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. **Res Vet Sci**. v. 47, n. 2. p. 152-157. 1989.

WATTS, A., et al. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. **Infect Immun**. v. 73, n. 6. p. 3502-3511. 2005.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Vet Microbiol**. v. 16, n. 1. p. 41-66. 1988.

WATTS, J. L. e OWENS, W. E. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. **Res Vet Sci**. v. 46, n. 1. p. 1-4. 1989.

WILEY, B. B. e MAVERAKIS, N. H. Capsule production and virulence among strains of *Staphylococcus aureus*. **Ann N Y Acad Sci**. v. 236, p. 221-232. 1974.

WILKINSON, B. J. *Staphylococcus* capsule and slime. In: EASMON, C. e ADLAM, C. **Staphilococci and staphylococcal infections**. London: Academic Press, 1983. v. 2, 481-523 p.

WILLIAMS, J. M., et al. A clinical evaluation of *Staphylococcus aureus* bacterin in the control of staphylococcal mastitis in cow. **Vet Med/Small Anim Clin**. v. 70, p. 587-594. 1975.

YE, X. e YOSHIDA, S. Lactoperoxidase and lactoferrin: changes in post-partum milk during bovine lactation disorders. **Milchwissenschaft**. v. 50, n. 2. p. 67-71. 1995.

YOKOMIZO, Y., et al. Isolation of encapsulated strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. **Res Vet Sci**. v. 22, n. 2. p. 158-160. 1977.

YOSHIDA, K. e EKSTEDT, R. D. Relation of mucoid growth of *Staphylococcus aureus* to clumping factor reaction, morphology in serum-soft agar, and virulence. **J Bacteriol**. v. 96, n. 4. p. 902-908. 1968.

YOSHIDA, K., et al. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. **J Dairy Sci.** v. 67, n. 3. p. 620-627. 1984.

YOSHIDA, K. e MINEGISHI, Y. Capsular substance production in unencapsulated strains of *Staphylococcus aureus*. **Zbl Bacteriol.** v. 5, p. 359-375. 1976.

YOUNIS, A., et al. Staphylococcus aureus exosecretions and bovine mastitis. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.** v. 50, n. 1. p. 1-7. 2003.

ZHANG, S. e MADDOX, C. W. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. **Infect Immun.** v. 68, n. 3. p. 1102-1108. 2000.