



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
LEITE E QUEIJO COALHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Recife

2016

Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
LEITE E QUEIJO COALHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino  
Co-orientadora: Dra. Mariana Andrade Figueiredo

Recife  
2016

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Lins, Rosanny Holanda Freitas Benevides**  
**Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo coalho no Estado de Pernambuco. / Recife: O Autor, 2016.**

**59 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino**

**Coorientadora: Mariana Andrade Figueiredo**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Genética, 2016.**

***Inclui referências***

- 1. *Staphylococcus aureus* 2. Queijo de coalho 3. Bovino-doenças I. Balbino, Tereza Cristina Leal (orient.) II. Figueiredo, Mariana Andrade (coorient.) III. Título**

**579.353**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017- 471**

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
LEITE E QUEIJO COALHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Aprovado em 17/10/2016

Banca Examinadora:

---

Dra. Tereza Cristina Leal Balbino  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes  
Universidade de Pernambuco

---

Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira  
Universidade Federal de Pernambuco

**Recife**

**2016**

Dedico este trabalho a cada familiar e amigo que me incentivou e, de alguma forma, me ajudou a chegar até o fim.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Tereza Cristina (Cris), minha orientadora, pelos 10 anos de convivência, orientação, oportunidade, amizade e compreensão. Agradeço de coração pela contribuição na minha formação, com a certeza de um futuro melhor por isso.

À Dra. Mariana Andrade (Mari) não só pela rica coorientação que firmou o projeto desde o início, mas também pela amizade e os momentos bons extra trabalho.

À Julia que, sempre disponível, atenta e disposta, contribuiu e muito para o andamento do projeto. Agradeço e torço pelo seu sucesso.

Aos técnicos, Bruna, Cláudio, Fabiana, D. Yara e Silvana, por sempre nos dar condições de trabalho ajudando com aqueles "pedidos de última hora" e dividindo a experiência da prática que têm dentro do laboratório.

Aos "amigos do Aggeu", Antônio, Carina, Diogo, Felipe, Lívia, Paloma, Tatiana e Vladimir, que com o tempo tornaram-se só "amigos". Foram muitos os momentos de discussão científica que acompanhados de outros tantos momentos de lazer tornaram o caminho mais prazeroso. Tenham certeza da contribuição de cada um de vocês para a conclusão desse trabalho e do carinho que guardarei por toda vida.

Às queridas Gerlane, Marise, Nilma e Patrícia. Sentirei falta dos nossos cafés, sempre tão fartos de delícias e conversas.

À Fernanda (Nanda), pessoa especial, sempre tão carinhosa e prestativa independente do assunto ser ou não trabalho.

À Márcia Saturnino pela disponibilidade e inúmeros artigos que conseguiu com presteza para mim ao longo desses anos.

A todos que fazem parte da Plataforma Tecnológica Fiocruz (PE), pelos inúmeros sequenciamentos.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia do CPqAM e do Departamento de Genética da UFPE pela troca de experiências.

A Carlos Figueiredo pela disponibilidade e boa vontade em ajudar.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infraestrutura que permitiu a realização desse trabalho.

Ao programa REUNI pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca examinadora que dedicaram seu tempo na avaliação deste trabalho, agradeço certa de que as suas contribuições serão de grande valia.

Às minhas famílias (a de onde vim e a que formei); sem vocês nada teria sentido. Agradeço à minha mãe, Anita, pelos esforços da vida toda e por ser uma incentivadora do meu progresso, fazendo até o impossível para que isso aconteça. Ao meu marido, pelo companheirismo e amor sem fim. À Luísa, meu primeiro tesouro, filha linda e compreensiva que ofereceu ajuda por várias vezes "para essa tese acabar logo". E ao meu segundo tesouro, João Vítor, que chegará em breve para tornar minha vida mais linda e completa.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, mesmo não citados são igualmente importantes.

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina. Neste estudo, foram investigadas a presença de 14 genes de virulência, mecanismos de resistência à meticilina e a diversidade genética em isolados de leite e queijo da Região Agreste de Pernambuco. Os genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *ebpS*, *sdrC*, *cap5*, *spa*, *icaA*, *icaD*, *hla* e *hlb* foram analisados nos 84 isolados, estando presentes em pelo menos 94% dos isolados; os genes *fnbB*, *cap8* e *pvl* apresentaram frequência de 46%, 5% e 21%, respectivamente. Mesmo os isolados fenotipicamente resistentes apresentaram-se genotipicamente sensíveis à meticilina. A análise de sequências multilocus (MLST) revelou oito perfis e três complexos clonais revelando a interação entre os diferentes tipos de sequência. Os dados do MLST mostraram a dispersão clonal entre diferentes municípios, e a relação clonal entre amostras de queijo e leite da mesma propriedade, inclusive com o mesmo perfil de virulência, evidenciando o risco da contaminação cruzada, provavelmente decorrente da manipulação, e também da dispersão da bactéria para consumo. Estes achados revelam um sério problema de Saúde Pública para os consumidores dos produtos dessa região. A associação de diferentes técnicas de tipagem (MLST e ITS-PCR) apresentou maior poder discriminatório que quando estas são usadas isoladamente, mostrando-se útil para um estudo mais coerente, robusto e aprofundado do patógeno.

**Palavras-chave: Genotipagem. MLST. Mecanismo de resistência à meticilina. Genes de virulência.**

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is one of the main etiological agents of bovine mastitis. In this study, we investigated the presence of 14 virulence genes, the mechanism of resistance to methicillin and the genetic diversity in milk and cheese isolates from the Agreste region of Pernambuco. The *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *ebpS*, *sdrC*, *cap5*, *spa*, *icaA*, *icaD*, *hla* and *hlb* genes were analyzed in 84 isolates, and found in 94% of the isolates; the *fnbB*, *cap8* and *pvl* genes had frequencies of 46%, 5% and 21%, respectively. Even the phenotypically resistant isolates were found to be genotypically susceptible to methicillin. The analysis of multilocus (MLST) sequences revealed eight sequence types and three clonal complexes, revealing the interaction between the different sequence types. The MLST data showed clonal dispersion between different municipalities, and the clonal relationship between cheese and milk samples from the same producing dairy farm, also producing the same virulence profile, which confirms the risk of cross-contamination, probably as a result of handling, as well as the dispersion of the bacteria for consumption. These findings reveal a serious public health problem for consumers of such products from this region. The combined use of different typing techniques (MLST and ITS-PCR) showed greater discriminatory power compared to the use of each of these techniques used individually, proving itself as a useful approach for a more coherent, robust and comprehensive study of the pathogen.

**Keywords: Genotyping. MLST. Methicillin resistance mechanism. Virulence genes.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustrações	Página
<b>Figura 1.</b> Presença de grumos no leite de um animal com mastite clínica.....	19
<b>Figura 2.</b> Microscopia eletrônica de varredura de microrganismos pertencentes à espécie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do cromossomo de <i>S. aureus</i> (N315), associado a elementos genéticos específicos da cepa MU50.....	22
<b>Quadro 1.</b> Fatores de virulência abordados neste estudo.....	23
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da técnica do MLST, demonstrando a amplificação dos fragmentos dos genes <i>housekeeping</i> por PCR e sequenciamento para a determinação do tipo de seqüência (ST) dos isolados e agrupamento destes em complexos clonais (CCs).....	30
<b>Figura 5.</b> Mapa do estado de Pernambuco (Brasil) dividido por Mesorregiões (parte superior). Na parte inferior, a Mesorregião Agreste dividida em municípios. Em destaque, os municípios onde foram realizadas coletas de leite mastítico e de queijo coalho.....	33
<b>Quadro 2.</b> Sequências de <i>primers</i> utilizados e condições das reações de PCR para a análise dos genes de virulência nos isolados de <i>S. aureus</i> estudados.....	36
<b>Quadro 3.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados no MLST e o tamanho dos respectivos fragmentos sequenciados.....	38
<b>Quadro 4.</b> Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência presentes em cada isolado.....	43
<b>Quadro 5a.</b> Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência com função de adesão presentes em cada isolado.....	44
<b>Quadro 5b.</b> Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência com função de evasão presentes em cada isolado.....	44
<b>Quadro 5c.</b> Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência com função de lesão presentes em cada isolado.....	45
<b>Figura 6.</b> Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR dos genes <i>housekeeping</i> ( <i>arcC</i> , <i>aroE</i> , <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>pta</i> , <i>tpi</i> e <i>yqiL</i> ).....	47
<b>Quadro 6.</b> Comparação entre os STs fundadores de cada Complexo Clonal e os STs relacionados.....	50
<b>Figura 7.</b> Rede de haplótipos mostrando os oito STs interligados.....	51
<b>Quadro 7.</b> Perfis gerados a partir da análise da associação das quatro ferramentas de tipagem (MLST, PFGE, ITS-PCR, PCR-Coa).....	54
<b>Quadro 8.</b> Perfis gerados a partir da análise da associação de três ferramentas de tipagem: MLST, ITS-PCR, PCR-Coa.....	55

<b>Quadro 9.</b>	Perfis gerados a partir da análise da associação de duas ferramentas de tipagem: MLST e ITS-PCR.....	55
<b>Quadro 10.</b>	Características observadas na correlação do MLST com outras ferramentas de tipagem.....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Comparação entre as frequências dos genes de virulência presentes em isolados bovinos e humanos, neste e em outros estudos.....	42
<b>Tabela 2</b>	Frequência dos genes de adesão por município estudado.....	46
<b>Tabela 3</b>	Frequência dos genes de evasão por município estudado.....	46
<b>Tabela 4</b>	Frequência dos genes de lesão por município estudado.....	47
<b>Tabela 5</b>	Tipos de sequências (STs) observados nos 84 isolados estudados e suas respectivas frequências e localidades de isolamento.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	Coleção de Cultura Americana (American Type Culture Collection)
BHI	Infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)
<i>cap5</i>	Gene que codifica o polissacarídeo capsular 5
<i>cap8</i>	Gene que codifica o polissacarídeo capsular 8
<i>clfA</i>	Gene que codifica os receptores de fibrinogênio A
<i>clfB</i>	Gene que codifica os receptores de fibrinogênio B
DI	Índice discriminatório
<i>ebpS</i>	Gene que codifica a proteína de ligação à elastina
<i>fnbA</i>	Gene que codifica os receptores de fibronectina A
<i>fnbB</i>	Gene que codifica os receptores de fibronectina B
<i>Hla</i>	Gene que codifica $\alpha$ -hemolisina
<i>Hlb</i>	Gene que codifica $\beta$ -hemolisina
<i>icaA</i>	Gene que codifica a enzima N-acetilglucosaminiltransferase, envolvida na formação de biofilme
<i>icaD</i>	Gene responsável pela máxima expressão da enzima envolvida na formação de biofilme
ITS	Região espaçadora intergênica
<i>mecA</i>	Gene de resistência à metilina
<i>mecC</i> ou <i>mecA</i> <sub>LGA251</sub>	Gene de resistência à metilina homólogo ao <i>mecA</i>
<i>mecI</i>	Gene que codifica uma proteína repressora da transcrição de <i>mecA</i>
<i>mecR1</i>	Gene que codifica uma proteína indutora da transcrição de <i>mecA</i>
MGEs	Elementos genéticos móveis
MLST	Tipagem de sequência multilocus
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MSCRAMM	Componentes de Superfície Microbiana de Reconhecimento de Moléculas da Matriz Adesiva
PBP	Proteína de ligação à penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado

<i>Pvl</i>	Gene que codifica a Leucocidina Panton-Valentine (genes contíguos <i>lukS-PV</i> e <i>lukF-PV</i> )
PVL	Leucocidina Panton-Valentine
SCC <i>mec</i>	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
<i>sdrC</i>	Gene que codifica a proteína de ligação à sialoproteína e fibrinogênio
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
<i>Spa</i>	Gene da proteína A estafilocócica
Spa	Proteína A estafilocócica
ST	Tipo de sequência multilocus

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1	MASTITE BOVINA.....	18
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
<b>2.2.1</b>	<b>Características gerais</b> .....	19
2.2.1.1	O genoma de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2.2.1.2	Patogenicidade e virulência.....	22
2.2.1.3	Susceptibilidade do <i>Staphylococcus aureus</i> a antimicrobianos.....	26
2.2.1.4	Diversidade genética e genotipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1	ISOLADOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
4.2	PESQUISA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À METICILINA: <i>mecA</i> E <i>mecC</i> .....	33
4.3	INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA.....	34
4.4	GENOTIPAGEM.....	37
<b>4.4.1</b>	<b>Tipagem de Sequências Multilocus (MLST)</b> .....	37
4.4.1.1	Cálculo do índice discriminatório.....	38
4.4.1.2	Análise da dispersão e compartilhamento dos ST.....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	40
5.1	PESQUISA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À METICILINA: <i>mecA</i> E <i>mecC</i> .....	40
5.2	INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA.....	40
5.3	GENOTIPAGEM DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
<b>5.3.1</b>	<b>Tipagem de Sequências Multilocus (MLST)</b> .....	47
<b>5.3.2</b>	<b>Correlação do MLST com as outras ferramentas de tipagem</b> .....	51
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
6.1	PESQUISA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À METICILINA: <i>mecA</i> E <i>mecC</i> .....	56

6.2	INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA.....	56
6.3	GENOTIPAGEM DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	59
6.3.1	Tipagem de Sequências Multilocus (MLST).....	59
6.3.2	Correlação do MLST com as outras ferramentas de tipagem.....	61
7	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS .....	65
	ANEXOS.....	74
	ANEXO A - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS CEPAS DE <i>S. aureus</i> ISOLADOS EM QUATRO MUNICÍPIOS DA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO, PERFIS DE SENSIBILIDADE À METICILINA, PERFIS GENOTÍPICOS GERADOS PELO MLST, PFGE, ITS-PCR E PCR-Coa, E PERFIS DE VIRULÊNCIA (PGV).....	74
	ANEXO B - EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS PELO KIT DA QIAGEN (DNEASY® BLOOD & TISSUE KIT) - COM ALTERAÇÕES.....	78
	ANEXOS C - ARTIGO A SER ENVIADO PARA A REVISTA VETRINARY MICROBIOLOGY.....	80
	ANEXO D - ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE A TESE: CO-AUTORA.....	106
	CURRÍCULO LATTES.....	107

## 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp são os mais frequentemente isolados em amostras de leite provenientes de vacas com mastite contagiosa, sendo *S. aureus* a espécie mais observada. Deve-se assinalar a importância da doença na saúde pública, devido à veiculação aos humanos de microrganismos patogênicos e suas toxinas, assim como resíduos de antibióticos. São significativos também os prejuízos causados às indústrias pela redução na quantidade e qualidade do leite produzido.

*Staphylococcus aureus* produz vários fatores de virulência que contribuem de diversas maneiras para sua patogenicidade. Embora não se possa determinar a importância relativa de cada um dos fatores de virulência produzidos por essa espécie, eles podem ser divididos em fatores de adesão, evasão e lesão. Além da sua importância devido à uma ampla distribuição e patogenicidade, esse microrganismo possui uma elevada capacidade de superar os efeitos antimicrobianos. Seu alto nível de resistência antimicrobiana, especialmente a beta-lactâmicos, favorece falhas no tratamento e sua persistência no rebanho e no ambiente hospitalar. A aquisição do gene *mecA* pelo *S. aureus* pode conferir à bactéria resistência ao antibiótico meticilina e a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos utilizados no tratamento da mastite. De acordo com o perfil de susceptibilidade à meticilina, os isolados podem ser denominados *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) ou *Staphylococcus aureus* meticilina sensíveis (MSSA). Embora os isolados MSSA sejam sensíveis à meticilina, são considerados importantes patógenos nas infecções, visto que também possuem a capacidade de causar doenças e persistirem circulando no ambiente e em unidades de saúde.

Definir, do ponto de vista epidemiológico, a origem dos organismos envolvidos na etiologia de uma doença é importante, já que a adequada identificação do patógeno é um requisito indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção, e também para monitorar sua dispersão dentro e entre as populações estudadas. Os resultados de vários estudos, no Brasil e no mundo, sugerem que a maioria dos casos de mastite bovina por *S. aureus* seja causada por um grupo limitado de clones e que estes sejam amplamente distribuídos em diferentes regiões geográficas.

Várias técnicas de tipagem molecular de *S. aureus* já foram desenvolvidas e apresentam um alto valor epidemiológico, dentre as quais pode-se citar: a análise da região espaçadora intergênica (ITS-PCR), análise do polimorfismo do gene da coagulase (*coa*) e da proteína A (*spa*), tipagem do Cassete Cromossômico Estafilocócico (*SCCmec*), análise dos macrofragmentos de restrição separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e análise de genes de manutenção do genoma utilizando a técnica de tipagem de sequência multilocus (MLST). Estas metodologias podem auxiliar no conhecimento mais detalhado sobre a dinâmica das infecções causadas por *S. aureus*.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi realizar uma caracterização molecular dos *S. aureus* isolados de queijo coalho e leite mastítico de diferentes municípios da região agreste de Pernambuco, bacia leiteira do Estado, para melhor compreender os fatores de virulência, a dispersão e diversidade desses isolados, buscando a ferramenta ou associação de ferramentas que forneça a melhor abordagem para tal, além do melhor entendimento sobre a susceptibilidade antimicrobiana à meticilina e sua relação com a mastite bovina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MASTITE BOVINA

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o efetivo mundial de bovinos no ano de 2014 foi de 1,03 bilhões de cabeças. No ranking mundial, o Brasil ocupava a segunda posição, ficando atrás apenas da Índia, país em que a criação de bovinos não se dá de maneira comercial. Em termos de produção de leite, o Brasil ocupava a quinta posição. O Nordeste foi responsável, em 2012, por 12% de todo leite produzido no país; em 2014 sofreu uma brusca queda nesse percentual, passando a representar 1% do total produzido (IBGE, 2014).

De uma maneira geral, o leite continua a apresentar baixa qualidade microbiológica tendo em vista as más condições higiênico-sanitárias, estado de saúde dos animais e cuidados inadequados com utensílios e equipamentos utilizados nos procedimentos de ordenha (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

A mastite bovina ou “mamite”, como também é conhecida a inflamação da glândula mamária, é uma das doenças mais comuns nos rebanhos bovinos. Pode ser causada por injúria química, mecânica ou infecção microbiológica, sendo esta última, a mais comum (COSER *et al*, 2012). Entre os agentes envolvidos na etiologia da mastite, o *Staphylococcus aureus* se destaca como um dos mais frequentes e determina os maiores prejuízos em rebanhos leiteiros em todos os continentes (DEB *et al*, 2013; FABRES-KLEIN *et al*, 2014).

Ressalta-se a importância da doença para a saúde pública, pela veiculação de microrganismos patogênicos e suas toxinas, assim como resíduos de antibióticos aos consumidores. São também significativos os prejuízos causados às indústrias pelas flutuações nos constituintes do leite, o que afeta a sua qualidade e quantidade, pois a vaca infectada pode deixar de produzir até três litros de leite por dia, além dos gastos com medicamentos e serviços veterinários, perda funcional das glândulas e até por morte do animal (ZANELLA *et al*, 2010; MENDONÇA; GUIMARÃES; BRITO, 2012; SIMÕES; OLIVEIRA, 2012; ROSSO, 2014).

A mastite pode ser subdividida em clínica, quando é possível visualizar alterações na glândula mamária e no leite (Figura 1), e subclínica, quando o

animal e o leite não apresentam essas alterações visíveis. Desta forma, a mastite subclínica é uma grande preocupação para os produtores de leite, devido à sua maior prevalência e a ausência de sintomas óbvios. Os animais assintomáticos atuam como um reservatório da doença, levando a uma rápida propagação das bactérias através do rebanho, sendo responsáveis por aproximadamente 70% das perdas relacionadas a essa doença (KLEIN *et al*, 2012; ROSSO, 2014).

O tratamento da mastite é complexo e requer a intervenção por meio de antimicrobianos, porém o processo de terapia deverá sempre ser indicado e acompanhado por um médico-veterinário e alinhado às práticas de higiene e manejo de ordenha (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012; ROSSO, 2014).

Figura 1: Presença de grumos no leite de um animal com mastite clínica.



Fonte: Embrapa gado de leite (2016)

## 2.2 *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1 Características gerais

*Staphylococcus aureus* (Figura 2) é uma das 54 espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, família Staphylococcaceae (FABRES-KLEIN *et al*, 2014; NCBI, 2014). O nome da espécie se deve ao fato deste patógeno produzir um pigmento carotenoide (estafiloxantina), que confere ao mesmo uma coloração

amarelada ou dourada (do grego “aureus” = dourado) (SCHELIN *et al*, 2011; TONG *et al*, 2012).

Este patógeno é imóvel, não formador de esporos e é anaeróbio facultativo. Possui a capacidade de sobreviver em compartimentos intracelulares e também em ambientes inanimados (STEFANI; GOGLIO, 2010; SCHELIN *et al*, 2011; FLUIT, 2012), como é o caso das máquinas de ordenha e alimentos. É uma bactéria extremamente versátil, sendo comensal e patógeno de um grande número de espécies animais, inclusive o homem (OTE *et al*, 2011; FLUIT, 2012). Em humanos é responsável por um amplo espectro de doenças que vão desde infecções mais simples de pele até pneumonia e septicemia (HOLMES, ZADOKS, 2011; TURLEJ, 2011; FOSTER *et al*, 2014). Em animais, destaca-se por ser um dos principais agentes envolvidos na etiologia da mastite bovina contagiosa, resultando em consideráveis perdas econômicas pela redução da produção e qualidade do leite (HWANG, 2010; OTE *et al*, 2011).

**Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura de microrganismos pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Science Photo Library (2014)

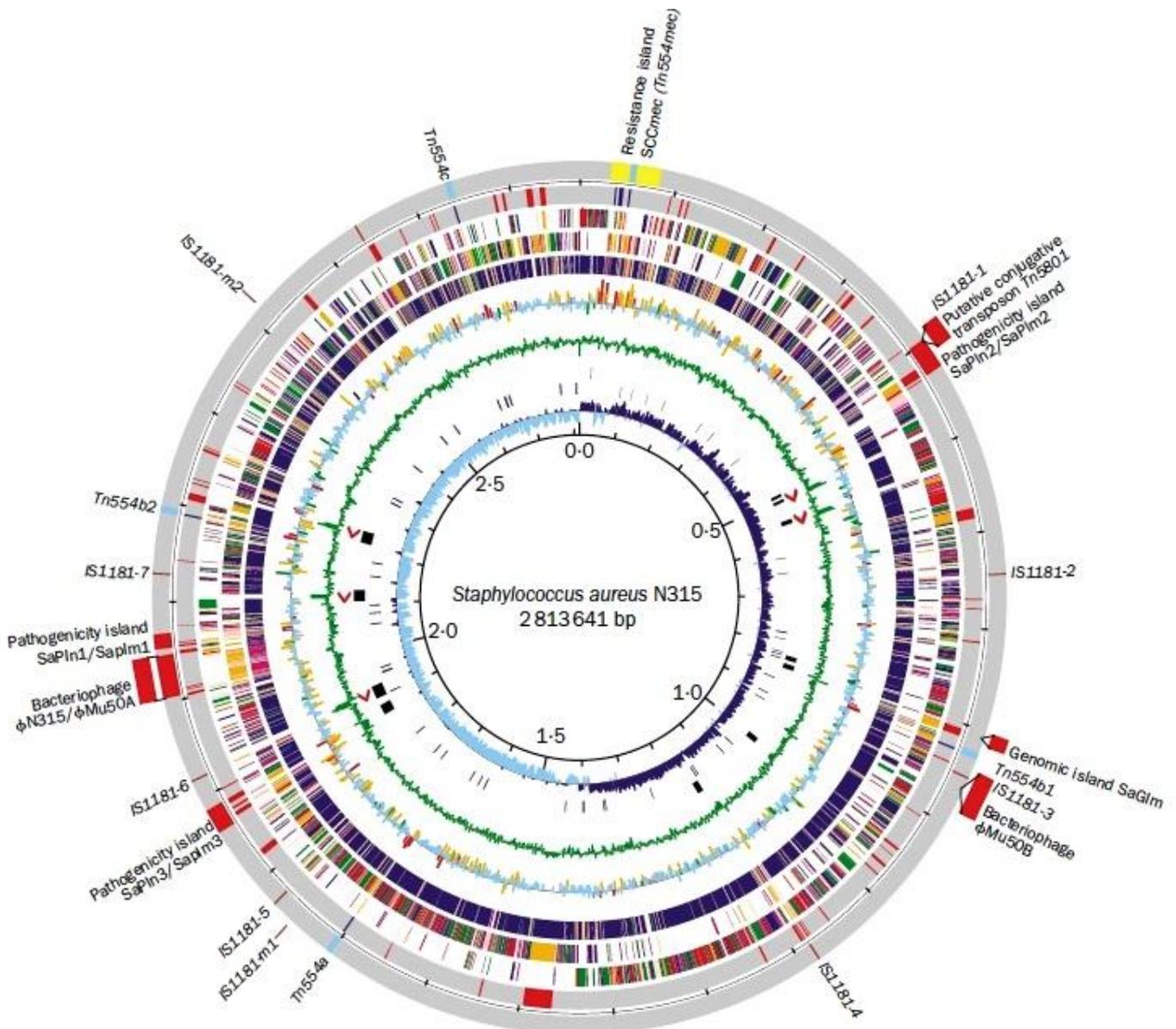
#### 2.2.1.1 O Genoma de *Staphylococcus aureus*

O genoma do *S. aureus* foi completamente sequenciado pela primeira vez em um trabalho realizado por Kuroda e colaboradores em 2001 (STEFANI *et al*, 2012). O banco de dados públicos GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) conta com mais de 40 sequências completas e muitos outros genomas parcialmente sequenciados (NCBI, 2014).

O genoma de referência de *S. aureus* corresponde ao da cepa N315, isolada em 1982 a partir de um esfregaço da faringe de um paciente no Japão. Este é composto por uma mistura complexa de genes sendo a maioria responsável pela resistência a antibióticos e observados em plasmídeos e em outros elementos genéticos móveis. O genoma da cepa N315 possui cerca de 2.8 mega bases (Mb), 2.695 genes, baixo conteúdo de GC (32,8%) e diferentes classes de elementos genéticos móveis: IS, transposons, plasmídeos, cassete de resistência (Figura 3) (KURODA *et al.*, 2001; NCBI, 2013).

A estrutura genômica do *S. aureus* é composta pelo genoma cromossomal, presente em todas as cepas e responsável pela sobrevivência do microrganismo, codificando, por exemplo, as moléculas responsáveis pelo metabolismo, síntese de DNA e RNA e pela replicação; e pelo genoma acessório, que é um conjunto de genes que mostram a diversidade observada dentro de espécies bacterianas e que codificam proteínas necessárias para a adaptação bacteriana às diversas condições ambientais, através da aquisição de resistência e / ou a produção de fatores de virulência, como os elementos genéticos móveis (MGEs - Mobile Genetics Elements), ou "mobilomas". Estes codificam funções de mobilização e têm um importante papel na plasticidade do genoma (LINDSAY; HOLDEN, 2006; MALACHOWA; DeLEO, 2010; STEFANI *et al.*, 2012; ALIBAYOU *et al.*, 2014). Diferentes classes de MGEs foram identificadas em *S. aureus*: fagos, ilhas de patogenicidade, plasmídeos, transposons, sequencias de inserção, bacteriófagos e cassetes cromossômicos estafilocócicos (MALACHOWA; DeLEO, 2010; ALIBAYOU *et al.*, 2014).

**Figura 3.** Representação esquemática do cromossomo de *S. aureus* (N315), associado a elementos genéticos específicos da cepa Mu50.



Fonte: Kuroda *et al.* (2001).

### 2.2.1.2 Patogenicidade e virulência

A capacidade de um microrganismo de causar doença depende do seu acesso ao hospedeiro e da sua habilidade para penetrá-lo, evadir de suas defesas e lesionar seus tecidos. Alguns microrganismos, como é o caso do *S. aureus*, também podem causar doença devido à produção de toxinas (TORTORA *et al.*, 2005). Embora muitos fatores de virulência tenham sido identificados no genoma de *S. aureus*, as diferenças do potencial patogênico entre os isolados permanecem em grande parte desconhecidas (KURODA *et al.*, 2001).

*Staphylococcus aureus* produz vários fatores de virulência que contribuem de diversas maneiras para sua patogenicidade (WANG *et al.*, 2009; PEACOCK *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2011; FOSTER *et al.*, 2014). Embora não se possa determinar a importância relativa de cada um dos fatores de virulência produzidos pelo *S. aureus*, eles podem ser divididos em fatores de adesão (adesinas), fatores de evasão (cápsula, proteína A e biofilme) e fatores de lesão (toxinas e enzimas) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), dentre os quais, 14 foram analisados neste estudo (Quadro 1).

Quadro 1: Fatores de virulência abordados neste estudo

Tipo de fator de virulência	Fatores selecionados para este estudo	Genes
Fatores de adesão	Fatores de aglutinação A e B - Proteínas de ligação ao fibrinogênio	<i>clfA</i> , <i>clfB</i>
	Proteínas de ligação à fibronectina	<i>fnbA</i> , <i>fnbB</i>
	Proteínas de ligação à elastina	<i>ebpS</i>
	Proteínas de ligação à sialoproteína e fibrinogênio	<i>sdrC</i>
Fatores de evasão	Proteína A	<i>Spa</i>
	Polissacarídeos capsulares Biofilme	<i>cap5</i> , <i>cap8</i> <i>icaA</i> , <i>icaD</i>
Fatores de lesão tecidual	Leucocidinas	<i>Pvl</i>
	Hemolisinas	<i>hla</i> , <i>hly</i>

São conhecidas, pelo menos, 25 toxinas diferentes, 15 componentes de superfície microbiana de reconhecimento de moléculas da matriz adesiva (MSCRAMM) e 20 moléculas de evasão do sistema imune (FLUIT, 2012). O estágio inicial da infecção por este patógeno envolve proteínas responsáveis pela aderência à matriz celular do hospedeiro e outras proteínas de superfície que promovem a formação de biofilme ou a resistência à opsonofagocitose (SUTRA; POUTREL, 1994; VASUDEVAN *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2010).

As adesinas de *S. aureus* são agrupadas em uma família chamada de Componentes da Superfície Microbiana de Reconhecimento de Moléculas da Matriz Adesiva (MSCRAMM). Os MSCRAMMs podem mediar a aderência a diferentes tipos de células. Os genes *clfA* e *clfB* codificam o fator de aglutinação A ou ClfA e o fator de aglutinação B ou ClfB, respectivamente; essas proteínas desempenham o mesmo papel que é o de ligação ao fibrinogênio, diferindo entre

si no local onde ocorre a ligação (LINKE; GOLDMAN, 2011; CAMUSSONE; CALVINHO, 2013). Os genes *fnbA* e *fnbB*, codificam proteínas de ligação à fibronectina, mas também ao fibrinogênio e à elastina (LINKE; GOLDMAN, 2011). Um estudo realizado com isolados humanos indicou que isolados de *S. aureus* associados com doença invasiva foram mais propensos a carrear ambos os genes, *fnbA* e *fnbB* (PEACOCK *et al*, 2000). Além de serem adesinas multifuncionais, as proteínas FnBPA e B são eficientes mediadoras da internalização do *S. aureus* nas células. Classicamente, os estafilococos foram considerados como patógenos extracelulares. No entanto, é hoje amplamente aceito que o mesmo pode ser também internalizado pelas células hospedeiras e replicar intracelularmente (CHAVAKIS *et al*, 2005). O gene *ebpS* codifica a proteína de ligação à elastina, que é um dos principais componentes da matriz extracelular (LINKE; GOLDMAN, 2011). As proteínas Sdr em *S. aureus* são membros da família MSCRAMMs e, embora sua função não tenha sido ainda completamente identificada, sugere-se que estejam envolvidas na ligação com a sialoproteína óssea e o fibrinogênio, e que promova a aderência da bactéria ao tecido do úbere (SITKIEWICZ *et al.*, 2011; XUE *et al*, 2011; KLEIN *et al*, 2012).

Dentre os fatores responsáveis pela evasão do sistema imune do hospedeiro, os genes *cap5* e *cap8* codificam os polissacarídeos capsulares 5 e 8, respectivamente, com função principal de proteger a bactéria contra a fagocitose. Estudos sorológicos anteriores (SOMPOLINSKY *et al*, 1985; GUIDRY *et al*, 1998) sugeriram a existência de 11 sorotipos diferentes de CP, entretanto, um estudo mais recente (COCCHIARO *et al*, 2006) relatou a existência de apenas quatro tipos (CP 1, 2, 5 e 8), com todos os outros tipos representando versões mutadas dos quatro tipos originais. A proteína A estafilocócica (Spa), que compreende cerca de 7% da parede celular da bactéria, se liga a porção Fc, fragmento correspondente a haste, da imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro. Esta porção normalmente se liga aos receptores de Fc dos fagócitos e, desta forma, a bactéria torna-se revestida por uma camada protetora de anticorpos que evitam a opsonização e fagocitose da mesma (DOSSETT *et al.*, 1969; GAO; STEWART, 2004).

Os biofilmes bacterianos são definidos como comunidades de células bacterianas cobertas por uma matriz polimérica extracelular (KIEDROWSKI, 2011). A formação de biofilme é um dos mecanismos mais importantes de

sobrevivência da bactérias vivendo no nicho extracelular e compromete tanto a ação do sistema imune do hospedeiro, quanto a de agentes antimicrobianos, tendo papel crucial na manutenção de uma infecção persistente (BARDIAU *et al*, 2016; PAYNE; BOLES, 2016).. A habilidade de formar biofilme *in vivo* é considerada um dos principais fatores de virulência que influenciam na patogênese da mastite. A formação de biofilmes por *S. aureus* está intimamente relacionada com a síntese de poli-N-acetilglucosamina (PNAG), também referida como polissacarídeo de adesão intercelular (PIA). PIA é sintetizado por enzimas (N-acetilglucosaminiltransferase) codificadas pelo operon *icaABCD* (LIN *et al*, 2015). O gene *icaA* codifica N-acetilglucosaminiltransferase; o produto de *icaB* é a enzima N-desacetilase, responsável pela desacetilação parcial de PIA, relevante para seu desenvolvimento estrutural permitindo sua fixação na superfície exterior bacteriana. O produto do gene *icaC* está envolvido na externalização do PIA, e o *icaD* tem papel na expressão máxima de N-acetilglucosaminiltransferase (ARCIOLA *et al*, 2015; CERCA *et al*, 2008; VASUDEVEAN *et al*, 2003).

*Staphylococcus aureus* secreta várias citotoxinas denominadas leucocidinas e hemolisinas, responsáveis pelas lesões observadas durante o desenvolvimento da infecção (DINGES *et al*, 2000). A leucocidina Panton-Valentine (PVL), codificada pelos genes contíguos *lukS-PV* e *lukF-PV*, forma poros na membrana celular e mitocondrial de neutrófilos e de macrófagos e, assim, provoca a lise celular e a apoptose com a libertação subsequente de mediadores inflamatórios (KREIENBUEHL *et al.*, 2011).

As hemolisinas, codificadas pelos genes *hla* e *hlb*, promovem a formação de poros que alteram a permeabilidade da membrana celular dos leucócitos, extravasando o conteúdo celular e assim ocasionando a morte da célula; além disso, a lesão celular provocada pode promover a liberação de citocinas que contribuem para o desenvolvimento do choque séptico. Estas enzimas também possuem a capacidade de lisar hemácias, motivo pelo qual são denominadas de hemolisina (TRABULSI; ALTERTHUN, 2008). Além das citotoxinas, o *S. aureus*, também secreta várias enzimas chamadas toxinas esfoliativas e proteases de serina que facilitam a invasão dos tecidos do hospedeiro (NISHIFUJI *et al.*, 2008).

Durante a progressão da infecção, o *S. aureus* pode produzir toxinas superantigênicas, incluindo as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), que são importantes não só pelo seu potencial papel nas doenças estafilocócicas pela

modulação da resposta imune, mas também pela sua habilidade de causar intoxicação alimentar em humanos (DINGES *et al.*, 2000; SILVEIRA-FILHO *et al.*, 2014).

### 2.2.1.3 Susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* a antimicrobianos

Desde a década de 1940, a penicilina, primeiro antibiótico descoberto, tem sido usada clinicamente, porém já em 1942, o primeiro isolado de *S. aureus* resistente à essa droga foi detectado em um hospital e, logo em seguida na comunidade. Novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tais como meticilina, oxacilina e cefalosporina, que são resistentes à ação das penicilinas, foram desenvolvidos. Pouco tempo após a introdução desses medicamentos, em 1960, o primeiro isolado resistente à meticilina (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente - MRSA) foi relatado no Reino Unido (TORTORA *et al.*, 2005; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; PEACOCK; PATERSON, 2015).

A resistência a  $\beta$ -lactâmicos é conferida pelo gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina modificada ou PBP2a. O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel conhecido como Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Além do gene *mecA*, também fazem parte do SCC*mec*, os genes que controlam a sua transcrição, *mec1* e *mecR1* e os genes de recombinase do cassete cromossômico, *ccrA* e *ccrB*. Este cassete pode ainda conter genes que conferem resistência à íons de metais pesados e outros antibióticos, como aminoglicosídeos ou macrolídeos (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; STEFANI; GOGLIO, 2010; HOLMES; ZADOKS, 2011).

Outros mecanismos de resistência à meticilina, além da presença do gene *mecA*, são raros e incluem a presença de um gene homólogo ao *mecA*, o gene *mecC* ou *mecA*<sub>LGA251</sub> (CLSI, 2015). De acordo com Garcia-Álvarez e colaboradores (2011) o gene *mecC* é homólogo ao *mecA*, está localizado em outro cassete cromossômico SCC*mec* tipo XI e apresenta 70% de identidade com o mesmo. Porém não é detectado pelos ensaios rotineiros de PCR, já tendo sido também identificado em rebanho leiteiro como responsável pela resistência à essa classe de antibióticos. A habilidade de isolados com essa característica causando infecções em humanos também foi confirmada (SHORE *et al.*, 2011).

A resistência bacteriana a antibióticos é um sério problema para a saúde pública, pois há evidências que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos torne seus produtos e derivados, fontes para resistência aos antibióticos na espécie humana. Além disso, resíduos de antibióticos causam diminuição no rendimento industrial para a fabricação de derivados lácteos, uma vez que inibem bactérias fermentadoras (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A determinação da susceptibilidade antimicrobiana de isolados estafilocócicos é necessária não apenas para indicar a terapia adequada, mas também para monitorar a dispersão de cepas resistentes entre populações (SALMON, 2002; GÜLER *et al.*, 2005).

O tratamento considerado padrão ouro para MRSA é feito com glicopeptídeos, tais como vancomicina e teicoplanina (STEFANI; GOGLIO, 2010).

#### 2.2.1.4 Diversidade genética e genotipagem de *Staphylococcus aureus*

A diversidade genética de amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina tem sido investigada em diferentes países. Os resultados de vários estudos sugerem que a maioria dos casos de mastite bovina por *S. aureus* seja causada por um grupo limitado de clones especializados e que estes sejam amplamente distribuídos entre rebanhos de diferentes regiões geográficas (MATTHEWS *et al.*, 1994; FITZGERALD *et al.*, 1997; ZADOKS *et al.*, 2000; SABOUR *et al.*, 2004; RABELLO *et al.*, 2007; SILVEIRA-FILHO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014).

As investigações epidemiológicas utilizam ferramentas moleculares que visam uma compreensão da variabilidade genética entre os isolados de *S. aureus*, a estrutura da população e como eles continuam a evoluir. Várias técnicas de tipagem molecular foram desenvolvidas e apresentam um alto valor epidemiológico no estudo com isolados de *S. aureus* (STEFANI *et al.*, 2012), dentre as quais pode-se citar: a análise da região espaçadora intergênica (ITS-PCR), análise do polimorfismo do gene da coagulase (*coa*) e da proteína A (*spa*), tipagem do SCC*mec*, análise dos macrofragmentos de restrição separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e análise de genes *housekeeping* utilizando a técnica de tipagem de sequência multilocus (MLST). Estas metodologias podem auxiliar no conhecimento mais detalhado sobre a dinâmica

das infecções causadas por *S. aureus* (JENSEN; WEBSTER; STRAUS, 1993; TENOVER *et al.*, 1994; AARESTRUP *et al.*, 1995; ENRIGHT *et al.*, 2000; HARMSSEN *et al.*, 2003; McDOUGAL *et al.*, 2003; KONDO *et al.*, 2007; STEFANI *et al.*, 2012).

De acordo com Stefani e colaboradores (2012), alguns requisitos devem ser observados antes da escolha de qual ferramenta de tipagem será utilizada, dentre os quais destacam-se: reprodutibilidade da técnica, nomenclatura padronizada internacionalmente, comparabilidade intra e interlaboratorial, baixo custo, tempo de execução da técnica, utilização para uma variedade de microrganismos, fácil processamento, armazenamento e intercâmbio de dados e fornecimento de informações adequadas para uso prático (por exemplo em investigações epidemiológicas e análises filogenéticas). Embora nenhum método de tipagem sozinho satisfaça todos os critérios acima descritos, tem havido uma tendência para o uso de *spa*, MLST e SCC*mec* ao invés do PFGE. Além disso, a utilização de mais de uma técnica para estabelecer relação entre isolados bacterianos pode ser necessária para aumentar a eficiência e o poder discriminatório das mesmas (TENOVER *et al.*, 1994).

Técnicas como PFGE, que detectam acúmulo recente de variações genéticas, são úteis para distinguir as cepas de uma espécie heterogênea, para investigação de um surto ou a filogenia de uma pequena população. Já para a investigação da epidemiologia global e da população genética (a distribuição mundial e frequência de linhagens bacterianas com propriedades de virulência associadas à certas linhagens, por exemplo) se faz necessário um sistema que analise o acúmulo mais lento de variações genéticas. A tipagem com *spa* e MLST atendem a essa exigência e são amplamente utilizados para este fim (HOLMES; ZADOKS, 2011). Assim, embora individualmente cada ferramenta possua suas vantagens e desvantagens, a ferramenta ideal irá depender da proposta do estudo (HATA *et al.*, 2010).

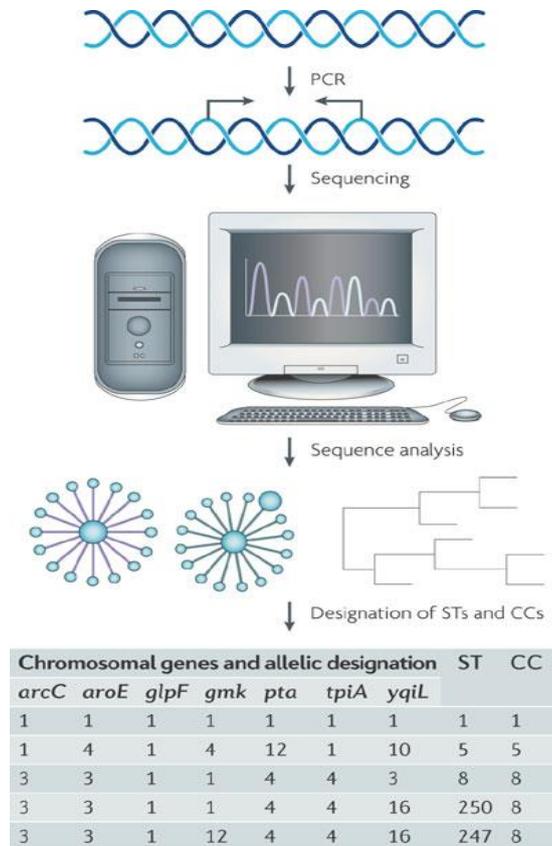
A ferramenta utilizada no presente estudo foi o MLST (Figura 4), que é altamente discriminatória, empregada no estudo de vários outros microrganismos, além do *S. aureus*, e baseia-se nas sequências de fragmentos internos de sete genes *housekeeping*. Para cada fragmento de gene, diferentes sequências são tidas como alelos distintos, e para cada isolado é definido um tipo de sequência (ST) pela combinação de alelos dos sete genes. Como há muitos alelos em cada

um dos sete *loci*, é altamente improvável que os isolados tenham perfis alélicos idênticos por acaso, assim, isolados com o mesmo perfil alélico são atribuídos como membros do mesmo clone (MAIDEN *et al*, 1998; SPRATT, 1999).

As cepas de *S. aureus* são agrupadas dentro de um único complexo clonal (CC) quando, pelo menos, cinco dos sete genes *housekeeping* têm sequências idênticas. Quando dois STs diferem em apenas um loco são chamados de variantes de loco único (SLV - Single-Locus Variant); quando diferem em dois locos são denominados variantes de loco duplo (DLV - Double-Locus Variant). O ancestral de cada CC é o ST com o maior número de SLV. Os subgrupos fundadores podem ser descritos como variantes de loco único ou variantes de loco duplo (DLV - Double-Locus Variant) de um CC fundador que se tornou prevalente na população, e que pode posteriormente se diversificar para produzir o seu próprio conjunto de variantes de loco único e/ou duplo (SPRATT *et. al*, 2004).

Uma grande vantagem do MLST é a capacidade para comparar os resultados obtidos em diferentes estudos através da Internet ([saureus.mlst.net](http://saureus.mlst.net)) (ENRIGHT *et al*, 2000).

**Figura 4.** Representação esquemática da técnica de MLST, demonstrando a amplificação dos fragmentos dos genes *housekeeping* por PCR e sequenciamento para determinação do tipo de sequência (ST) dos isolados e agrupamentos destes em complexos clonais (CC).



Nature Reviews | Microbiology

Fonte: Chambers e DeLeo com modificações (2009).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar molecularmente *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite, e queijo coalho de diferentes municípios da região agreste de Pernambuco.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de genes de virulência nos isolados de *S. aureus*;
- Caracterizar os mecanismos de resistência à meticilina nos isolados de *S. aureus* dos municípios estudados: *mecA* e *mecC*;
- Caracterizar e verificar a diversidade e distribuição dos isolados de *S. aureus* em diferentes municípios da Região Agreste do Estado de Pernambuco;
- Comparar a ferramenta de tipagem molecular utilizada nesse estudo com outras ferramentas moleculares utilizadas em estudo prévio, a fim de indicar qual a metodologia ideal para detectar a relação clonal entre os isolados de *S. aureus* e sua dispersão.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS DE *S. aureus*

Foram analisados 84 isolados de *S. aureus*, obtidos em 2005, provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, e de queijo coalho de quatro municípios da região Agreste de Pernambuco (Gravatá, São Bento do Una, Caetés e Correntes) (Figura 5). Os isolados estavam estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  em glicerol-BHI (1:1) na bacterioteca do Centro de Pesquisas Aggeu çMagalhães (CPqAM) (Anexo 1).

No município de Gravatá, 38 isolados foram obtidos de duas propriedades (nove isolados da propriedade 1 e 29 da propriedade 2). Em São Bento do Una, 27 isolados foram obtidos (cinco da propriedade 3 e 22 da propriedade 4). No Município de Caetés, 13 isolados foram estudados (dois da propriedade 5 e 11 da propriedade 6). No Município de Correntes seis isolados foram estudados (um da propriedade 7, quatro da propriedade 8 e um da propriedade 9) (Anexo 1).

O DNA genômico para uso em ensaios baseados em PCR foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico de acordo com Freitas e colaboradores (2008) e/ou usando o kit de extração DNeasy® Blood & Tissue kit com algumas modificações (Anexo 2).

**Figura 5.** Mapa do estado de Pernambuco (Brasil) dividido por Mesorregiões (parte superior). Na parte inferior, a Mesorregião Agreste dividida em municípios. Em destaque, os municípios onde foram realizadas coletas de leite mastítico e de queijo coalho.



Fonte: Silveira-Filho, 2007, com adaptações.

#### 4.2 PESQUISA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À METICILINA: *mecA* E *mecC*

O teste fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado em trabalho anterior (Silveira-Filho *et al.*, 2014). A análise foi realizada de acordo com os padrões do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), em agar Mueller-Hinton, utilizando discos para oxacilina-meticilina (1 mg). A sensibilidade ou resistência foi observada após 24 ou 48h de incubação a 37°C. Neste estudo foram encontrados 31 *S. aureus* resistente à metilina (MRSA).

A amplificação do gene *mecA* na pesquisa de susceptibilidade à metilina é prescrita como padrão-ouro na detecção dessa resistência (CLSI, 2012).

O gene *mecA* (fragmento de 286pb) foi pesquisado em todos os isolados através de uma PCR uniplex com *primer* descrito por Kondo e colaboradores

(2007). A cepa *S. aureus* MRSA3231 foi utilizada como controle positivo e ATCC 25923 como controle negativo. As reações foram preparadas para um volume final de 25µl consistindo de KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTP 200 mM; 20pmol de cada *primer*; 20 ng de DNA genômico de cada isolado; 1U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por um minutos, anelamento à temperatura de 55°C por um minuto e extensão do fragmento a 72°C por um minuto, e uma etapa final de alongamento a 72°C por cinco minutos.

A pesquisa do gene *mecC* (fragmento de 304pb) foi realizada utilizando *primers* e condições de reação de acordo com Cuny e colaboradores (2011). As reações também foram preparadas para um volume final de 25µl como descrito acima, e as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento à temperatura de 50°C por 30 segundos e extensão do fragmento a 72°C por 30 segundos, e uma etapa final de alongamento a 72°C por quatro minutos.

Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com SYBR<sup>®</sup> Green (PROMEGA), visualizados e fotografados no sistema de fotodocumentação L-PIX ex (Loccus Biotecnologia).

#### 4.3 INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Foram investigados 14 genes de virulência, pela técnica de PCR; os *primers* utilizados bem como as condições das reações estão descritos no quadro 2. Todas as reações foram preparadas para um volume final de 25µl consistindo de KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTP 200 mM; 20pmol de cada *primer*; 20 ng de DNA genômico de cada isolado; 1U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI).

Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com SYBR<sup>®</sup> Green (PROMEGA), visualizados e fotografados no sistema de fotodocumentação L-PIX ex (Loccus Biotecnologia). Quatro amplicons de cada gene foram purificados com a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix) e sequenciados em

sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), utilizando o BigDye Kit (Applied Biosystems), para confirmação dos amplicons.

**Quadro 2.** Sequências de *primers* utilizados e condições das reações de PCR para a análise dos genes de virulência nos isolados de *S. aureus* estudados.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Tamanho (pb)	Desnaturaçãoinicial (C° - tempo)	Desnaturaçãoinicial (C° - tempo)	Anelamento (C° - tempo)	Alongamento (C° - tempo)	Extensão (C° - tempo)	Nº de ciclos	Referência
Fatores de adesão ao tecido do hospedeiro									
<i>clfA</i>	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG	292	94°C - 5'	94°C - 1'	55°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 10'	25	Tristan <i>et al</i> (2003)
<i>clfB</i>	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC	205	94°C - 5'	94°C - 1'	55°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 10'	25	Tristan <i>et al</i> (2003)
<i>fnbA</i>	CTCAATCATATAACGCAACAGT GTACAGTTTTAGGGTCAATA	702	94°C - 5'	94°C - 30''	48,7°C - 30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>fnbB</i>	GTAACAGCTAATGGTTCGAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524	94°C - 5'	94°C - 1'	55°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 10'	25	Tristan <i>et al</i> (2003)
<i>ebpS</i>	CACGAGACTATTAAGATGCAGAAA TTATGGAATAACGATTTGTTGACCG	1047	94°C - 5'	94°C - 30''	52,8°C - 30''	72°C - 1'30''	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>sdrC</i>	CAACATTGATTTTTGGGTTAAGTGG GCAAATGCGACTTGTTCAAAA	802	94°C - 5'	94°C - 30''	51,3°C - 30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
Fatores de evasão do sistema imune									
<i>spa</i>	TATATCTGGTGGCGTAACAC GTTGAAGTTATTTTGTTCG	229	94°C - 5'	94°C - 30''	49,7°C - 30''	72°C - 30''	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>cap5</i>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CTC GGA TAA CAC CTG TTG	881	94°C - 3'	94°C - 30''	55°C - 30''	72°C - 1'	72°C - 7'	32	Moore e Lindsay (2001)
<i>cap8</i>	ATCGAAGAACATATCCAAGG TTCATCACCAATACCTTTTA	834	94°C - 5'	94°C - 30''	46,4°C - 1'30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>icaA</i>	TCAGACACTTGCTGGCGCAGTC TCACGATTCTCTCCCTCTCTGCCATT	936	95°C - 15'	95°C - 1'	60°C - 1'-30''	72°C - 1'	72°C - 10'	32	Campbell <i>et al</i> (2008)
<i>icaD</i>	AAACGTAAGAGAGGTGG GGCAATATGATCAAGATAC	381	94°C - 5'	95°C - 45''	49°C - 45''	72°C - 1'	72°C - 7'	30	Vasudevan <i>et al</i> (2003)
Fatores de lesão tecidual									
<i>pvl</i>	TGCCAGACAATGAATTACCCCCATT TCTGCCATATGGTCCCCAACCA	894	95°C - 15'	95°C - 1'	60°C - 1'-30''	72°C - 1'	72°C - 10'	35	Campbell <i>et al</i> (2008)
<i>hla</i>	TGCCGCAGATTCTGATATTAA TTTCTGAAGAACGATCTGTCCA	845	94°C - 5'	94°C - 30''	51,5°C - 1'30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>hlb</i>	GCGGTTGTGGATTCCGATAAT GGCTTTGATTGGGTAATGATC	524	94°C - 5'	94°C - 30''	50,9 - 30''	72°C - 30''	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)

## 4.4 GENOTIPAGEM

### 4.4.1 Tipagem de sequência multilocus (MLST)

A técnica do MLST foi realizada segundo Enright e colaboradores (2000) e baseia-se na análise do polimorfismo das sequências de nucleotídeos do DNA de sete fragmentos internos de genes constitutivos (genes *housekeeping*) utilizando os *primers* que foram desenhados a partir de sequências altamente conservadas, flaqueadoras de regiões mais variáveis desses genes. As sequências dos *primers*, bem como o tamanho dos fragmentos amplificados para cada gene, encontram-se descritos no quadro 3. As reações foram preparadas para um volume final de 25µl como citado acima. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento à temperatura de 55°C por um minuto e extensão do fragmento a 72°C por um minuto, finalizando com uma etapa de extensão a 72°C por cinco minutos.

A análise dos cromatogramas e montagem dos contigs foi realizada utilizando o pacote PHRED/PHRAP/CONSED (versões 0.071220.c, 1.090518, e 23.0, respectivamente) (EWING; GREEN, 1998; GORDON *et al.*, 1998). O alinhamento foi realizado utilizando o programa Mafft (versão 6.815b) (KATOH *et al.*, 2005) e sua análise com o Jalview (versão 2.8) (WATERHOUSE *et al.*, 2009).

As sequências obtidas foram submetidas ao banco de dados público internacional MLST (<http://saureus.mlst.net>), para obtenção do perfil alélico e determinação do ST dos isolados. Como controle, além da ATCC25923, também foi utilizada a cepa MRSA02928, gentilmente cedida pelo laboratório PHIDL da Universidade de Pittsburgh.

**Quadro 3.** Sequência dos *primers* utilizados no MLST e o tamanho dos respectivos fragmentos sequenciados.

Gene	Primer	Sequência de <i>primers</i> (5' → 3')	Fragmento sequenciado (pb)
<b>arcC</b>	<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	456
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<b>aroE</b>	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
<b>glpF</b>	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<b>gmk</b>	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	417
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	
<b>pta</b>	<i>pta</i> -Up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
<b>tpi</b>	<i>tpi</i> -Up	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA	402
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<b>yqiL</b>	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

#### 4.4.1.1 Cálculo do índice discriminatório

O cálculo do índice discriminatório (DI) do MLST foi realizado como descrito por Hunter e Gaston (1988) através da fórmula:

$$DI = 1 - [1/N(N-1)] \sum s n_j(n_j-1)$$

Onde "N" é o número total de isolados na população, "s" é o número total de diferentes tipos descritos, e "n<sub>j</sub>" é o número de isolados que representa cada tipo.

O DI indica a probabilidade em que dois isolados selecionados aleatoriamente dentro da população testada serão classificados em diferentes tipos, ou seja, a capacidade que uma ferramenta de tipagem tem para distinguir entre as linhagens não relacionadas, sendo considerado desejável um DI maior que 0,90.

#### 4.4.1.2 Análise da dispersão e compartilhamento dos STs

Para verificar a dispersão e compartilhamento dos haplótipos entre as populações estudadas foi criada uma rede de haplótipos utilizando o programa NETWORK, versão 4.6 (Bandelt *et al*, 1999).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PESQUISA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À METICILINA: GENES *mecA* E *mecC*

A pesquisa por PCR do gene *mecA*, responsável pelo principal mecanismo de resistência à meticilina e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, foi realizada nos 84 *S. aureus* estudados. Todos os isolados, mesmo os 31 MRSA, foram negativos para o gene *mecA*.

Foi realizada a pesquisa também para o gene homólogo *mecC* ou *mecA<sub>LGA251</sub>* e o mesmo resultado foi observado em todos os isolados pesquisados. Esse resultado sugere que estes isolados possam ser hiperprodutores de  $\beta$ -lactamase ou apresentem mecanismos de resistência adicional, porém análises complementares são necessárias para confirmar essa hipótese.

### 5.2 INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Foram investigados 14 genes de virulência (*clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *sdrC*, *spa*, *cap5*, *cap8*, *icaA*, *icaD*, *pvl*, *hla* e *hlb*) responsáveis pela adesão à diferentes células do hospedeiro, evasão do sistema imune e lesão tecidual, em todos os 84 isolados de *S. aureus* dos quatro municípios estudados (Anexo 1). Todos os isolados foram positivos para pelo menos sete dos 14 genes. Nenhum isolado apresentou todos os genes estudados. Os genes *cap5*, *icaD* e *hlb* estavam presentes em todos os isolados. Dos 84 isolados investigados, 83 (99%) foram positivos para o gene *fnbA*, 82 (98%) foram positivos para os genes *ebpS* e *spa*, 81 (~96%) para os genes *clfA*, *clfB* e *sdrC*, 79 (94%) positivos para *icaA* e *hla*, 39 (46%) apresentaram o gene *fnbB*, 18 (21%) o gene *pvl* e 4 (5%) foram positivos para o gene *cap8* (Tabela 1. Anexo 1). Uma comparação entre as frequências observadas neste estudo e em outros estudos, tanto com isolados de origem bovina quanto de origem humana pode ser vista na tabela 1.

Analisando os isolados com base na combinação dos genes de virulência que eles apresentaram, foram observados 15 perfis de virulência, denominados

neste trabalho de PGV1-PGV15. Entre estes, quatro perfis foram mais frequentes (PGV1,3,4,6), e representaram 83% dos isolados analisados (Quadro 4).

Um grande número de isolados (74), pertencentes aos seis primeiros perfis (PGV1 - PGV6) foram negativos para no máximo três genes, porém nunca referente à mesma função (adesão, evasão e lesão). Assim, 88% dos isolados apresentaram alta frequência para a maioria dos genes estudados (Quadro 4).

Os 31 isolados MRSA foram distribuídos em nove dos 15 perfis de virulência (PGV1: três isolados, PGV3: 15 isolados, PGV4: quatro isolados, PGV6: três isolados, PGV7: dois isolados, PGV9: um isolado, PGV12: um isolado, PGV13: um isolado e PGV14: um isolado) (Quadro 4).

Fazendo a análise considerando, separadamente, as funções de adesão, evasão e lesão, pode-se observar 7, 4 e 3 perfis, respectivamente (Quadros 5a, 5b, 5c). Dos genes relacionados à função de adesão, estiveram presentes, pelo menos, dois dos seis que foram estudados. Os dois perfis mais frequentes (PGV1 e PGV2), representantes de 92% dos isolados, foram positivos para todos ou cinco dos seis genes (Quadro 5a). Nos municípios de Gravatá, Caetés e Correntes, com exceção do gene *fnbB*, todos os outros com a função de adesão apresentaram uma alta frequência, estando presente sempre em 95% ou mais dos isolados. No município de São Bento do Una os genes *fnbB* e *sdrC* apresentaram uma frequência de 89% (Tabela 2).

**Tabela 1:** Comparação entre as frequências dos genes de virulência presentes em isolados bovinos e humanos, neste e em outros estudos

Genes de virulência	Frequência neste estudo	Frequência observada em outros estudos utilizando os mesmo genes															
		Klein <i>et al</i> , 2012*	Ote <i>et al</i> , 2011*	Pereyra <i>et al</i> , 2016*	Xu <i>et al</i> , 2015*	Yang <i>et al</i> , 2012*	Prashant <i>et al</i> , 2013*	Mitra <i>et al</i> , 2013*	Koramian <i>et al</i> , 2015*	Kot <i>et al</i> , 2016*	Camussone <i>et al</i> , 2012*	Szweda <i>et al</i> , 2012*	Coelho <i>et al</i> , 2011*	Koramian <i>et al</i> , 2015**	Ghasemian <i>et al</i> , 2016**	Bekir <i>et al</i> , 2012**	Yu <i>et al</i> , 2012**
<i>clfA</i>	94%	50,6%	96,9%	100%	89,3%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>clfB</i>	94%	91,8%	96,9%	100%	85,7%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>fnbA</i>	99%	-	83,8%	100%	0%	97%	-	98,8%	50%	14,5%	-	-	-	0,8%	56%	56,1%	-
<i>fnbB</i>	46%	-	-	90%	75%	0%	-	68,8%	61,1%	50%	-	-	-	56%	46%	-	-
<i>ebpS</i>	98%	-	96,9%	-	-	-	-	-	61,1%	50%	-	-	-	12%	11%	-	-
<i>sdrC</i>	94%	85,9%	96,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	92,1%
<i>Spa</i>	98%	85,9%	85,6%	-	96,4%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cap5</i>	100%	-	33,6%	-	-	59%	-	-	-	-	52,9%	-	-	-	-	-	-
<i>cap8</i>	5%	-	68,6%	-	-	23%	-	-	-	-	11,4%	-	-	-	-	-	-
<i>icaA</i>	94%	-	-	95%	-	-	-	-	91,1%	-	-	100%	22%	85,6%	71%	-	89,9%
<i>icaD</i>	100%	-	-	100%	-	-	-	-	91,1%	-	-	100%	20%	86,4%	41%	-	-
<i>Pvl</i>	21%	-	0,4	-	-	-	0%	41,6%	-	-	-	-	-	-	-	-	23,6%
<i>hla</i>	94%	-	98,7%	-	96,4%	85%	-	-	-	-	-	-	24%	-	-	-	80,9%
<i>hlb</i>	100%	-	99,1%	-	92,9%	82%	-	-	-	-	-	-	16%	-	-	-	67,4%

Nota: \* Estudo realizado com isolados de origem bovina; \*\*Estudo realizado com isolados de origem humana.

Obs.: O gene *fnbB* apresentou frequência geral neste estudo de 46%, mas variou bastante entre os municípios (Gravatá - 5%; São Bento do Una - 89%; Caetés - 31%; Correntes - 33%). O gene *cap8* teve frequência geral de aproximadamente 5%, também com variação entre os municípios (Gravatá - 5%; São Bento do Una - 0%; Caetés - 0%; Correntes - 33%).

**Quadro 4:** Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência presentes em cada isolado.

Perfis	Fatores de adesão						Fatores de evasão					Fatores de lesão			Nº de isolados (%)	Isolados	Quantidade de genes positivos
	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>ebpS</i>	<i>sdrC</i>	<i>spa</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>pvl</i>	<i>hla</i>	<i>Hlb</i>			
PGV1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	7 (8,3)	18B*, 19B, 26B*, 34B*, 11C, 12C, 3D	13
PGV2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1 (1,2)	31A	13
PGV3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	21 (25)	59A, 1B*, 4B*, 5B*, 6B*, 8B*, 9B, 10B*, 11B*, 12B*, 13B*, 17B*, 22B, 23B*, 29B*, 32B*, 35B*, 36B*, 1C, 2C, 8D	12
PGV4	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	11 (13,1)	22A, 57A*, 61A, 85A*, 27B*, 28B*, 7C, 8C, 9C, 10C, 13C	12
PGV5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	3 (3,6)	19A, 2D, 10D	12
PGV6	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	31 (37)	1A, 4A, 20A, 25A, 26A, 38A, 40A, 53A, 62A, 63A, 70A, 76A*, 81A*, 83A*, 84A, 86A, 87A, 92A, 95A, 96A, 99A, 100A, 101A, 102A, 103A, 104A, 3C, 4C, 5C, 6C, 4D	11
PGV7	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	2 (2,4)	20B*, 21B*	10
PGV8	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	1 (1,2)	21A	10
PGV9	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	1 (1,2)	90A*	10
PGV10	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	1 (1,2)	1D	10
PGV11	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	1 (1,2)	14B	9
PGV12	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	1 (1,2)	82A*	8
PGV13	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	1 (1,2)	3B*	8
PGV14	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	1 (1,2)	51A*	7
PGV15	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	1 (1,2)	88A	7

Nota: \*Isolados MRSA

**Quadro 5a:** Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência com função de adesão presentes em cada isolado.

Perfis	Nº de amostras (%)	<i>clfA</i>	<i>clfb</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>ebpS</i>	<i>sdrC</i>	Quantidade de genes positivos
PGVA1	29 (34,5)	+	+	+	+	+	+	6
PGVA2	48 (57,1)	+	+	+	-	+	+	5
PGVA3	2 (2,4)	+	+	+	+	+	-	5
PGVA4	1 (1,2)	+	+	+	-	-	+	4
PGVA5	1 (1,2)	+	+	+	+	-	-	4
PGVA6	2 (2,4)	-	-	+	-	+	+	3
PGVA7	1 (1,2)	-	-	-	-	+	+	2

Os genes com função de evasão estiveram presentes em pelo menos três dos cinco genes estudados, e dos quatro perfis observados o mais frequente (PGVE2), representando 87% dos isolados, foi negativo apenas para o gene *cap8* (Quadro 5b). Os quatro municípios apresentaram frequência superior à 80% para todos os genes pesquisados com função de evasão, com exceção do gene *cap8* que não estava presente nos isolados dos municípios de São Bento do Una e Caetés; em Gravatá, apenas 5% dos isolados apresentaram o *cap8* e no município de Correntes, a frequência observada foi de 33% (Tabela 3).

**Quadro 5b:** Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência com função de evasão presentes em cada isolado.

Perfis	Nº de amostras (%)	<i>spa</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	Quantidade de genes positivos
PGVE1	4 (4,8)	+	+	+	+	+	5
PGVE2	73 (87)	+	+	-	+	+	4
PGVE3	5 (6)	+	+	-	-	+	3
PGVE4	2 (2,4)	-	+	-	+	+	3

Dentre os três genes com função de lesão ao tecido do hospedeiro, o menos frequente foi o *pvl*. Todos os isolados foram positivos para pelo menos um dos genes. Dos três perfis observados, o mais frequente (PGVL2), representando 73% dos isolados, foi positivo para os genes *hla* e *hnb*, e negativo apenas para o gene *pvl* (Quadro 5c). Dentre os genes responsáveis pela lesão tecidual pode-se observar frequência superior à 90% em todos os municípios para *hla* e *hnb*, enquanto que o *pvl* só foi superior à 50% no município de Caetés (Tabela 4).

**Quadro 5c:** Perfis observados analisando-se a combinação dos genes de virulência com função de lesão tecidual presentes em cada isolado.

Perfis	Nº de amostras (%)	<i>pvl</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	Quantidade de genes positivos
PGVL1	18 (21,4)	+	+	+	3
PGVL2	61 (72,6)	-	+	+	2
PGVL3	5 (6)	-	-	+	1

**Tabela 2:** Frequência dos genes de adesão por município estudado.

Município	<i>ebpS</i>		<i>clfA</i>		<i>clfB</i>		<i>fnbA</i>		<i>fnbB</i>		<i>sdrC</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Gravatá (38 isolados)	37 (97%)	1 (3%)	36 (95%)	2 (5%)	36 (95%)	2 (5%)	37 (97%)	1 (3%)	2 (5%)	36 (95%)	38 (100%)	0 (0%)
São Bento do Una (27 isolados)	26 (96%)	1 (4%)	26 (96%)	1 (4%)	26 (96%)	1 (4%)	27 (100%)	0 (0%)	24 (89%)	3 (11%)	24 (89%)	3 (11%)
Caetés (13 isolados)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	4 (31%)	9 (69%)	13 (100%)	0 (0%)
Correntes (6 isolados)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	2 (33%)	4 (67%)	6 (100%)	0 (0%)
Total	82	2	81	3	81	3	83	1	32	52	81	3

**Tabela 3:** Frequência dos genes de evasão por município estudado.

Município	<i>Spa</i>		<i>cap5</i>		<i>cap8</i>		<i>icaA</i>		<i>icaD</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Gravatá (38 isolados)	38 (100%)	0 (0%)	38 (100%)	0 (0%)	2 (5%)	36 (95%)	34 (89%)	4 (11%)	38 (100%)	0 (0%)
São Bento do Una (27 isolados)	26 (96%)	1 (4%)	27 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	27 (100%)	26 (96%)	1 (4%)	27 (100%)	0 (0%)
Caetés (13 isolados)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)
Correntes (6 isolados)	5 (83%)	1 (17%)	6 (100%)	0 (0%)	2 (33%)	4 (67%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
Total	82	2	84	0	4	80	79	5	84	0

**Tabela 4:** Frequência dos genes de lesão por município estudado.

Município	<i>pvl</i>		<i>Hla</i>		<i>hly</i>	
	+	-	+	-	+	-
Gravatá (38 isolados)	4 (10,5%)	34 (89,5%)	35 (92%)	3 (8%)	38 (100%)	0 (0%)
São Bento do Una (27 isolados)	6 (22%)	21 (78%)	25 (93%)	2 (7%)	27 (100%)	0 (0%)
Caetés (13 isolados)	7 (54%)	6 (46%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)
Correntes (6 isolados)	1 (17%)	5 (83%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
Total	18	66	84	0	79	5

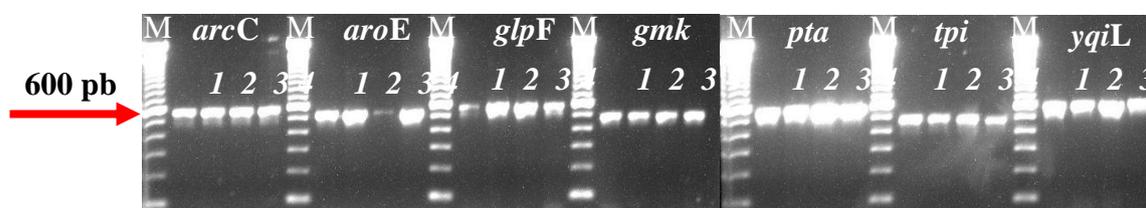
### 5.3 GENOTIPAGEM DE *S. aureus*

#### 5.3.1 Tipagem de sequência multilocus (MLST)

Os 84 isolados de *S. aureus* deste estudo foram analisados pelo MLST e agrupados em oito tipos de sequências (STs), definidos pela combinação dos alelos de cada um dos sete genes *housekeeping* (Figura 6. Tabela 5). O DI apresentado foi de 0,73. Das 84 amostras estudadas, 34 (40%) foram agrupadas em quatro STs (ST2987, ST2988, ST3257 e ST3258) descritos pela primeira vez neste trabalho e denominados após a submissão das novas sequências ao curador do banco de dados do MLST (Tabela 5).

Dois dos novos STs (ST2987 e ST2988) foram relacionados ao ST126 já descrito. O ST2987 diferiu apenas no gene *yqiL* nas posições 192 [A - G], 303 [G - A] e 333 [C - T] passando a apresentar o alelo 3, enquanto no ST126 o alelo correspondente é o 40. O ST2988 diferiu no gene *arcC* na posição 111 [T - C], passando a apresentar o alelo 330, enquanto que no ST126 o alelo correspondente foi o 3 (Quadro 6).

**Figura 6** – Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR dos genes *housekeeping* (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*). Linha M - marcador de peso molecular (DNA ladder 100pb). Colunas 1- 19A, 2 – 26B, 3 – 5C, 4 – 2D.



Os outros dois novos STs (ST3257 e ST3258) foram relacionados ao ST97. O ST3257 diferiu no gene *glpF* na posição 81 [C - T], apresentando o alelo 429, enquanto no ST97 o alelo é o 1. O ST 3258 possui o alelo 468, enquanto no ST97 o alelo é o 1, diferentes entre si na posição 57 [A - T] do gene *aroE* (Quadro 6).

O tipo de sequência mais frequente nos isolados foi o ST2988 (30 isolados - 36%), seguido do ST97 (25 isolados - 30%) e ST126 (21 isolados - 25%); juntos esses três STs representaram 91% dos isolados estudados (Tabela 5).

ST126 foi o único presente em todos os municípios. O ST97 foi observado em três municípios (São Bento do Una, Caetés e Correntes), os STs 1624 e 2988, em dois municípios (São Bento do Una e Caetés, e Gravatá e São Bento do Una, respectivamente), e os demais STs em apenas um município (ST1 - Correntes; ST2987 - Caetés; ST3257 - Caetés e ST3258 - Correntes, sendo os três últimos, STs novos). O ST2988, também novo, foi observado em Gravatá e São Bento do Una (Tabela 5).

Na propriedade 2 (Gravatá) foi possível observar cepas de diferentes fontes de isolamento (queijo e leite) pertencendo ao mesmo ST (Anexo 1).

**Tabela 5.** Tipos de sequências (STs) observados nos 84 isolados estudados e suas respectivas frequências e localidades de isolamento.

STs	Alelos <i>arcC/aroE/glpF/gmk/pta/tpil/yqiL</i>	Nº de isolados (%)	Local de isolamento da bactéria
ST1	1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1	02 (~2,4%)	02 - Correntes
ST97	3 / 1 / 1 / 1 / 1 / 5 / 3	25 (~30%)	21 - São Bento Una; 02 - Caetés; 02 Correntes
ST126	3 / 68 / 1 / 4 / 1 / 5 / 40	21 (~25%)	09 - Gravatá; 04 - São Bento Una; 07 - Caetés; 01 - Correntes
ST1624	3 / 1 / 1 / 1 / 1 / 5 / 40	02 (~2,4%)	01 - São Bento Una; 01 - Caetés
*ST2987	3 / 68 / 1 / 4 / 1 / 5 / 3	02 (~2,4%)	02 - Caetés
*ST2988	330 / 68 / 1 / 4 / 1 / 5 / 40	30 (~36%)	29 - Gravatá; 01 - São Bento do Una
*ST3257	3 / 1 / 429 / 1 / 1 / 5 / 3	1 (~1%)	01 - Caetés
*ST3258	3 / 468 / 1 / 1 / 1 / 5 / 3	1 (~1%)	01 - Correntes

Nota: \*ST's novos.

Caetés foi o município que abrigou o maior número de isolados com STs diferentes (ST97, ST126, ST1624, ST2987 e ST3257), seguido por São Bento do Una e Correntes, ambos abrigando isolados que apresentaram quatro STs (ST97, ST126, ST1624 e ST2988; ST1, ST97, ST126 e ST3258, respectivamente). Gravatá abrigou apenas isolados que apresentaram dois STs (ST126 e ST2988) (Tabela 5).

O ST1, quando comparado aos outros STs, diferiu em pelo menos três dos genes, não sendo, portanto, relacionado a nenhum outro ST encontrado neste estudo. Esse tipo de sequência foi observado em apenas dois isolados (2D e 10D - município de Correntes) (Anexo 1).

Os oito STs foram incluídos em três complexos clonais: CC1 (ST1/dois isolados), CC97 (ST97, ST1624, ST3257 e ST3258/29 isolados) e CC126 (ST126, ST2987 e ST2988/53 isolados) (Quadro 6; Figura 7).

**Quadro 6:** Comparação entre os STs fundadores de cada Complexo Clonal e os STs relacionados.

CC (Nº isolados)	ST	Nº de isolados	Sequência Alélica <i>arcC/aroE/glpF/gmk/pta/tpi/yqiL</i>	Gene (Alelos ≠ entre o ancestral e os outros STs do mesmo CC)	Dif. nucleotídicas/ Posição
<b>CC1</b> (2 isolados)	<b>ST1</b>	2	1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1	-	-
<b>CC97</b> (29 isolados)	<b>ST97</b>	25	3 / <b>1</b> / <b>1</b> / 1 / 1 / 1 / 5 / <b>3</b>	-	-
	ST1624	2	3 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 5 / <b>40</b>	<i>yqiL</i> (3 - 40)	G - A / 192 A - G / 303 T - C / 333
	*ST3257	1	3 / 1 / <b>429</b> / 1 / 1 / 1 / 5 / 3	<i>glpF</i> (1 - 429)	C - T / 81
	*ST3258	1	3 / <b>468</b> / 1 / 1 / 1 / 1 / 5 / 3	<i>aroE</i> (1 - 468)	A - T / 57
<b>CC126</b> (53 isolados)	<b>ST126</b>	21	<b>3</b> / 68 / 1 / 4 / 1 / 1 / 5 / <b>40</b>	-	-
	*ST2987	2	3 / 68 / 1 / 4 / 1 / 1 / 5 / <b>3</b>	<i>yqiL</i> (40 - 3)	A - G / 192 G - A / 303 C - T / 333
	*ST2988	30	<b>330</b> / 68 / 1 / 4 / 1 / 1 / 5 / 40	<i>arcC</i> (3 - 330)	C - T / 111

Nota: \*STs descritos pela primeira vez neste estudo.

Cada cor destaca um CC, sendo o ST ancestral, o primeiro de cada grupo em negrito e que dá nome ao seu CC.

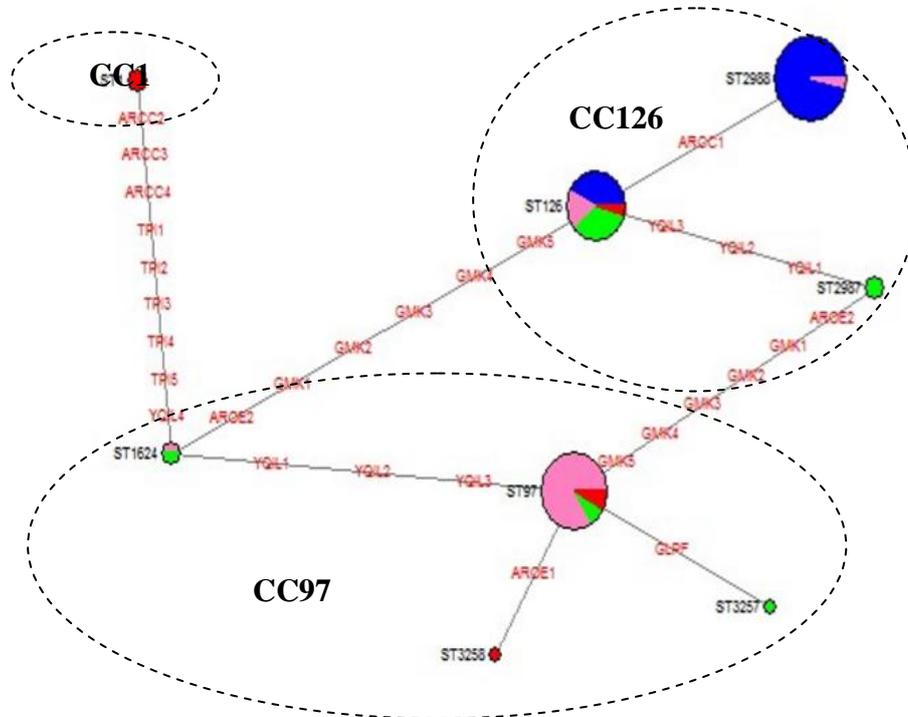
Para verificar o nível de compartilhamento de nucleotídeos entre os STs identificados neste estudo e suas frequências de distribuição entre os municípios foi gerada uma rede de haplótipos que pode ser observada na figura 7.

O menor número de diferença entre dois STs foi de um nucleotídeo (ST97-ST3257, ST97-ST3258, e ST126-ST2988). Alguns STs diferiram entre si em mais de um polimorfismo, porém dentro do mesmo gene, como foi o caso dos ST97 e ST1624, e ST126 e ST2987, ambos com três polimorfismos no gene *yqiL* (Figura 7).

Os STs 97 e 2987 apresentaram polimorfismo nos genes *arcC* (1 nucleotídeo) e *gmk* (5 nucleotídeos). Nos STs 126 e 1624, as diferenças foram nos genes *aroE* (1 nucleotídeo) e *gmk* (5 nucleotídeos) (Figura 7).

O ST1 foi o que mais diferiu dos demais, estando mais próximo do ST1624, porém com nove polimorfismos distribuídos em três genes (3 - *arcC*; 5 - *tpi*; 1 - *yqjL*) (Figura 7).

**Figura 7:** Rede de haplótipos mostrando os oito STs interligados.



Nota: O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos observados no haplótipo a que o círculo se refere. Entre as linhas que ligam dois STs, pode-se observar o número de diferenças entre os mesmos e em quais genes essas diferenças estão presentes.

● Gravatá ● São Bento do Una ● Caetés ● Correntes

Os PGV1, 7 e 10, foram restritos aos isolados pertencentes ao CC97, enquanto os PGV2, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14 e, 15, foram restritos aos isolados pertencentes ao CC126. O PGV3 foi comum à isolados do CC97 e CC126, enquanto o PGV5 foi comum à isolados do CC126 e CC1 (Anexo 1).

### 5.3.2 Correlação do MLST com as outras ferramentas de tipagem

Os mesmos isolados deste estudo foram analisados em um trabalho anterior realizado por Silveira-Filho *et al.* (2014) para avaliar a distribuição clonal de *S. aureus* utilizando diferentes métodos de tipagem. Os isolados foram tipados pelo polimorfismo do gene da coagulase (gene *coa*), ITS-PCR e a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). O mais alto poder discriminatório foi obtido pelo PFGE (0,81), seguido da ITS-PCR (0,71) e da PCR-*coa* (0,46). Os cálculos do índice discriminatório tiveram que ser

refeitos para que os resultados pudessem ser comparados aos desta pesquisa, uma vez que o número total de isolados utilizados por Silveira-Filho *et al.* (2014) foi 94, enquanto neste estudo foram 84. Foi observado por Silveira-Filho *et al.* (2014) que apesar de apresentar o maior DI, o PFGE não permitiu compreender a epidemiologia da região por causa da grande diversidade de clones de *S. aureus* que foram encontrados, provavelmente devido ao acúmulo de mutações durante o processo de adaptação ao hospedeiro. Além disso, o PFGE é uma técnica morosa e mais cara que as técnicas de PCR. Sobre a PCR-coa os autores concluíram que o número limitado de coagulotipos encontrados sugere uma forte pressão seletiva do gene *coa*, além de refletir a limitada localização geográfica. A ITS-PCR pareceu a melhor abordagem para estabelecer a relação clonal entre os *S. aureus* isolados de diferentes propriedades leiteiras, devido à sua praticidade, baixo custo e eficiência. No entanto, neste trabalho permaneceu a necessidade de adicionar aos resultados obtidos uma técnica de genotipagem mais refinada e detalhada.

Os resultados do MLST foram então comparados com os obtidos por estas técnicas. Foi possível observar que o MLST (DI - 0,73), assim como as outras três ferramentas, permitiu estabelecer uma relação clonal entre isolados obtidos de diferentes fontes de isolamento (leite, queijo e ordenhadeira), além de permitir observar a dispersão clonal entre propriedades do mesmo município e entre municípios diferentes.

A análise com a associação das quatro ferramentas de tipagem (PCR-coa, ITS-PCR, PFGE e MLST) gerou 39 perfis (P1-P39), dos quais 23 (~59%) representavam uma única amostra, cada (Quadro 7). Alguns isolados, mesmo com o mais elevado índice discriminatório (0,95) observado com a associação dessas ferramentas, permaneceram dentro de um mesmo perfil, sendo, portanto, indistinguíveis. Dentre estas, 38 (45%) fazem parte dos cinco perfis mais frequentes: P4 (12 isolados), P26 (11 isolados), P33 (6 isolados), P17 (5 isolados) e P13 (4 isolados).

O alto índice discriminatório também não impediu que fosse observada a correlação entre isolados obtidos a partir de leite de vaca com mastite e isolados obtidos a partir de queijo coalho e ordenhadeira (P12: 35B - ordenhadeira - e 36B - leite; P33: 57A ; 82A - leite - e 99A; 102A; 103A, 104A - queijo coalho; P26: 61A; 63A; 76A; 83A; 87A; 95A; 96A; 1A; 4A - leite - e 100A; 101A - queijo coalho). Por outro lado, a associação das quatro ferramentas comprometeu a observação da dispersão clonal entre os diferentes municípios estudados. Esse grande número de perfis observados

com essa associação ocorreu devido ao PFGE que, isoladamente, foi a ferramenta mais discriminatória (DI: 0,81). Assim, a análise utilizando a associação entre ferramentas foi refeita excluindo-se o PFGE. A associação do MLST, ITS-PCR e PCR-Coa (DI: 0,84) gerou 15 perfis (PG1-PG15) dos quais 7 (~47%) representaram uma única amostra, cada (Quadro 8). Os cinco perfis mais frequentes englobaram 84,5% (71) dos isolados estudados; foram eles: PG4 (23), PG5 (17), PG9 (16), PG10 (11) e PG6 (4).

Essa associação também permitiu observar a correlação entre isolados obtidos a partir de leite de vaca com mastite e isolados obtidos a partir de queijo coalho e ordenhadeira (PG4: 35B - ordenhadeira - e 26B, 18B, 1B, 4B, 5B, 6B, 8B, 9B, 10B, 11B, 13B, 17B, 20B, 21B, 19B, 23B, 29B, 32B, 34B, 36B, 11C, 3D - leite; PG10: 51A, 59A, 53A, 57A, 82A, 62A, 85A - leite - e 99A; 102A; 103A, 104A - queijo coalho; PG9: 61A; 63A; 76A; 83A; 87A; 95A; 96A; 1A; 4A, 70A, 84A, 90A, 92A, 86A - leite - e 100A; 101A - queijo coalho).

Também foi possível observar a dispersão clonal entre os diferentes municípios. Os perfis genotípicos são aqui representados pelo conjunto dos perfis do MLST, ITS-PCR e PCR-coa, seguindo essa ordem. O perfil PG5 (126/R1/Coa1A) mostrou-se disseminado nos quatro municípios estudados. O segundo perfil mais disseminado foi o PG4 (97/R10/Coa2), identificado nos municípios de São Bento do Una, Caetés e Correntes. Outros dois perfis, o PG6 (126/R2/Coa1A) e o PG7 (1624/R10/Coa2), foram observados em dois dos quatro municípios estudados, Gravatá e Caetés, e São Bento do Una e Caetés, respectivamente. O terceiro (PG9: 2988/R1/Coa1A) e o quarto (PG10: 2988/R4/Coa1A) perfis mais frequentes ficaram restritos ao município de Gravatá.

Essa associação concentrou a maioria dos MRSA (61%) no perfil PG4 (Quadro 9).

**Quadro 7:** Perfis gerados a partir da análise da associação das quatro ferramentas de tipagem (MLST, PFGE, ITS-PCR, PCR-Coa)

Número do perfil	Perfil (MLST/PFGE/ITS-PCR/PCR-coa)	Quant. de isolados	Isolados
P1	1/G3/R3/Coa1B	2	2D, 10D
P2	97/B4/R10/Coa2	1	34B
P3	97/B5/R10/Coa2	1	23B
P4	97/C1/R10/Coa2	12	1B, 4B, 5B, 6B, 8B, 9B, 10B, 11B, 13B, 17B, 20B, 21B
P5	97/C2/R10/Coa2	2	18B, 26B
P6	97/D3/R7/Coa2	1	1C
P7	97/D3/R10/Coa2	1	11C
P8	97/G2/R9/Coa2	1	8D
P9	97/G2/R10/Coa2	1	3D
P10	97/H/R10/Coa2	1	19B
P11	97/J1/R10/Coa2	2	29B, 32B
P12	97/J2/R10/Coa2	2	**35B, 36B
P13	126/A1/R1/Coa1A	4	3C, 7C, 8C, 9C
P14	126/A2/R1/Coa1A	1	4C
P15	126/A1/R2/Coa1A	2	5C, 6C
P16	126/B1/R1/Coa1A	2	14B, 22B
P17	126/B3/R1/Coa1A	5	22A, 26A, 31A, 38A, 40A
P18	126/B3/R2/Coa1A	2	20A, 25A
P19	126/C1/R1/Coa1A	1	27B
P20	126/E/R1/Coa1A	1	28B
P21	126/F/R1/Coa1A	1	4D
P22	126/G1/R1/Coa1A	2	19A, 21A
P23	1624/C1/R10/Coa2	1	12B
P24	1624/D3/R10/Coa2	1	12C
P25	2987/A1/R1/Coa1A	2	10C, 13C
P26	2988/B1/R1/Coa1A	11	1A, 4A, 61A, 63A, 76A, 83A, 87A, 95A, 96A, 100A, 101A
P27	2988/B1/R4/Coa1A	2	51A, 59A
P28	2988/B2/R1/Coa1A	1	70A
P29	2988/B2/R4/Coa1A	1	62A
P30	2988/B3/R4/Coa1A	1	53A
P31	2988/C1/R10/Coa2	1	3B
P32	2988/I1/R1/Coa1A	3	84A, 90A, 92A
P33	2988/I1/R4/Coa1A	6	57A, 82A, *99A, *102A, *103A, *104A
P34	2988/I2/R1/Coa1A	1	86A
P35	2988/I2/R4/Coa1A	1	85A
P36	2988/I3/R5/Coa1A	1	81A
P37	2988/J3/R6/Coa1A	1	88A
P38	3257/D3/R10/Coa2	1	2C
P39	3258/C3/R7/Coa2	1	1D

Nota: \* Isolados obtidos a partir de queijo coalho; \*\* isolado obtido a partir da ordenhadeira; isolados MRSA

Foi analisada ainda a associação das ferramentas MLST e ITS-PCR. Pode-se observar que a exclusão dos resultados da PCR-coa da análise em nada alterou os perfis obtidos com a associação MLST/ITS-PCR/PCR-coa, mostrando que esta ferramenta não interferia no resultado. Foram obtidos os mesmos 15 perfis, agora chamados de PG1´-PG15´ (Quadro 9) apenas para diferenciar dos obtidos na análise anterior, e consequentemente o DI (0,84) também se manteve.

Quadro 8: Perfis gerados a partir da análise da associação de três ferramentas de tipagem: MLST, ITS-PCR, PCR-Coa.

Número do perfil	Perfil (MLST/ITS-PCR/PCR-coa)	Quant. de isolados	Isolados
PG1	1/R3/Coa1B	2	2D, 10D
PG2	97/R7/Coa2	1	1C
PG3	97/R9/Coa2	1	8D
PG4	97/R10/Coa2	23	26B, 18B, 1B, 4B, 5B, 6B, 8B, 9B, 10B, 11B, 13B, 17B, 20B, 21B, 19B, 23B, 29B, 32B, 34B, **35B, 36B, 11C, 3D
PG5wq	126/R1/Coa1A	17	19A, 21A, 22A, 26A, 31A, 38A, 40A, 14B, 22B, 27B, 28B, 3C, 7C, 8C, 9C, 4C, 4D
PG6	126/R2/Coa1A	4	20A, 25A, 5C, 6C
PG7	1624/R10/Coa2	1	12B, 12C
PG8	2987//R1/Coa1A	2	10C, 13C
PG9	2988/R1/Coa1A	16	61A, 63A, 76A, 83A, 87A, 95A, 96A, 1A, 4A, 100A, 101A, 70A, 84A, 90A, 92A, 86A
PG10	2988/R4/Coa1A	11	51A, 59A, 53A, 57A, 82A, *99A, *102A, *103A, *104A, 62A, 85A
PG11	2988/R5/Coa1A	1	81 <sup>A</sup>
PG12	2988/R6/Coa1A	1	88 <sup>A</sup>
PG13	2988/R10/Coa2	1	3B
PG14	3257/R10/Coa2	1	2C
PG15	3258/R7/Coa2	1	1D

Nota: \* Isolados obtidos a partir de queijo coalho; \*\* isolado obtido a partir da ordenhadeira; isolados MRSA

Quadro 9: Perfis gerados a partir da análise da associação de duas ferramentas de tipagem: MLST e ITS-PCR.

Número do perfil	Perfil (MLST/ITS-PCR)	Quant. de isolados	Isolados
PG1´	1/R3	2	2D, 10D
PG2´	97/R7	1	1C
PG3´	97/R9	1	8D
PG4´	97/R1	23	1B, 4B, 5B, 6B, 8B, 9B, 10B, 11B, 13B, 17B, 18B, 19B, 20B, 21B, 23B, 26B, 29B, 32B, 34B, **35B, 36B, 11C, 3D
PG5´	126/R1	17	19A, 21A, 22A, 26A, 31A, 38A, 40A, 14B, 22B, 27B, 28B, 3C, 4C, 7C, 8C, 9C, 4D
PG6´	126/R2	4	20A, 25A, 5C, 6C
PG7´	1624/R10	1	12B, 12C
PG8´	2987/R1	2	10C, 13C
PG9´	2988/R1	16	1A, 4A, 61A, 63A, 70A, 76A, 83A, 84A, 86A, 87A, 90A, 92A, 95A, 96A, 100A, 101A,
PG10´	2988/R4	11	51A, 59A, 53A, 57A, 82A, *99A, *102A, *103A, *104A, 62A, 85A
PG11´	2988/R5	1	81A
PG12´	2988/R6	1	88A
PG13´	2988/R10	1	3B
PG14´	3257/R10	1	2C
PG15´	3258/R7	1	1D

Nota: \* Isolados obtidos a partir de queijo coalho; \*\* isolado obtido a partir da ordenhadeira; isolados MRSA

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 PESQUISA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À METICILINA: *mecA* E *mecC*

Os 84 isolados estudados foram analisados em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (SILVEIRA-FILHO *et al*, 2014) quanto à suscetibilidade à meticilina, o qual identificou resistência em 31 (37%) isolados (Anexo 1).

A pesquisa do gene *mecA* e do seu homólogo, *mecC*, revelou que mesmo os isolados fenotipicamente resistentes foram negativos para ambos, sugerindo não ser o mecanismo responsável pela resistência a meticilina nos 31 isolados MRSA deste estudo. Resultados semelhantes, tanto em isolados humanos quanto de origem animal, também foram observados em outros estudos no Brasil (MELO *et al*, 2014), na China (LI *et al*, 2015) e na Escócia (BA *et al*, 2014).

Embora ainda não estejam claras, algumas hipóteses foram levantadas sobre possíveis mecanismos de resistência alternativos nesses casos como, por exemplo, substituições de aminoácidos encontradas nos domínios transpeptidase das PBPs 1, 2 e 3 que são alvos da ação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (BA *et al*, 2014), polimorfismos de nucleotídeo único em três genes, especificamente, aqueles que codificam PBP 4 (BANERJEE, 2010) e diferenças nucleotídicas pontuais entre os genes *mecA* de origem humana e animal na região de anelamento do *primer Forward* impedindo sua amplificação quando se utiliza *primers* desenvolvidos para humanos em animais (MELO *et al*, 2014); porém mais estudos são necessários para confirmação dessas hipóteses, assim como para esclarecer que mecanismo está envolvido na resistência apresentada pelos isolados desse estudo. Os resultados obtidos mostram a possibilidade de existirem vários mecanismos distintos para a resistência a  $\beta$ -lactâmicos em *S. aureus* e que por isso talvez a pesquisa dos genes *mecA* e *mecC* não seja suficiente para a definição de isolados MRSA.

### 6.2 INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

A etapa de adesão ao tecido do hospedeiro pelo *S. aureus* é o primeiro evento crítico no estabelecimento de uma infecção por esse patógeno (LINKE; GOLDMAN, 2011), e alguns fatores de superfície são cruciais para o seu sucesso tanto como um comensal, quanto como um agente patogênico (FOSTER *et al*, 2014). Foram

estudados seis fatores de superfície responsáveis pela adesão ao tecido do hospedeiro, dos quais cinco (*ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fnbA* e *sdrC*) apresentaram frequência igual ou superior a 89% independente do município estudado, mostrando o alto potencial desses isolados em dar início à infecção. O gene *fnbB*, que é responsável por codificar a proteína de ligação à fibronectina, mas também ao fibrinogênio e à elastina (LINKE; GOLDMAN, 2011), assim como o *fnbA*, apresentou frequência de 89% em São Bento do Una, mas baixa frequência nos demais municípios (Gravatá - 5%; Caetés - 31%; Correntes - 33%). A maioria dos isolados de *S. aureus* carregam ambos os genes, mas não parece haver nenhuma diferença na atividade de ligação à fibronectina entre as cepas que carregam apenas um ou os dois genes (GREENE *et al*, 1995), de maneira que a baixa frequência de *fnbB* nos outros municípios, certamente não compromete a eficiência dos isolados *fnbB* negativos na adesão ao tecido do hospedeiro, uma vez que apenas o isolado 88A foi negativo para ambos os genes (*fnbA* e *fnbB*), mas positivo para outros dois genes de adesão (*ebpS* - adesão à elastina, e *sdrC* - adesão à sialoproteína e fibrinogênio).

Acredita-se que algumas propriedades do *S. aureus*, como formação de biofilme, sobrevivência intracelular e expressão capsular, sejam associadas com infecções crônicas, e geralmente a mastite subclínica (BARDIAU, *et al*, 2016); essas propriedades favorecem a evasão do sistema imune do hospedeiro. Foram estudados cinco fatores de superfície responsáveis pela evasão do sistema imune do hospedeiro codificados pelos genes *spa*, *cap5*, *cap8*, *icaA* e *icaD*. O gene *spa* é responsável por codificar a proteína A que se liga a porção Fc, fragmento correspondente a haste, da imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro. Esta porção normalmente se liga aos receptores de Fc dos fagócitos e, desta forma, a bactéria torna-se revestida por uma camada protetora de anticorpos que evitam a opsonização e fagocitose da mesma (DOSSETT *et al.*, 1969; GAO; STEWART, 2004). O polissacarídeo capsular (CP) é um dos fatores de virulência mais importantes de *S. aureus* porque confere resistência à fagocitose e prolonga a persistência do patógeno na corrente sanguínea do hospedeiro (GOGOI-TIWARI *et al*, 2015). Os tipos capsulares CP5 e CP8 são os mais prevalentes em isolados humanos (SORDELLI *et al*, 2000) e também em *S. aureus* isolados em casos de infecções intramamárias em bovinos, porém a distribuição dos CPs varia entre os países, e um número relevante de estirpes podem não expressar qualquer CPs (SCALI *et al*, 2015).

Semelhante ao que foi observado para os genes com função de adesão, quatro (*spa*, *cap5*, *icaA* e *icaD*) dos cinco genes responsáveis por mecanismos de evasão apresentaram alta frequência independente do município analisado (acima de 83%, chegando a 100% para os genes *cap5* e *icaD*). Dessa maneira, os isolados estudados apresentaram alto potencial também para a etapa de evasão, mesmo com a baixa frequência encontrada para o gene *cap8* (Gravatá - 5%; São Bento do Una e Caetés - 0% e Correntes - 33% ), uma vez que *cap5* desempenha o mesmo papel e está presente em todos os isolados.

Uma vez colonizando o hospedeiro, *S. aureus* secreta várias citotoxinas, chamadas leucocidinas e hemolisinas, responsáveis pelas lesões observadas durante o desenvolvimento da infecção (DINGES *et al*, 2000). A frequência dos genes que codificam as hemolisinas  $\alpha$  (*hla*) e  $\beta$  (*hlb*) foi superior a 90% independente do município estudado. O gene *pvl* apresentou uma frequência de 21%, porém bem variada entre os municípios: Gravatá - 10,5%; São Bento do Una - 22%; Caetés - 54%; Correntes - 17%. Embora outros trabalhos, como o realizado por Mitra e colaboradores (2013), também mostre a presença desse gene em isolados obtidos a partir de leite de vaca com mastite (41,6% dos isolados), o *pvl* é geralmente associado à doenças em humanos como pneumonia necrozante (SCHWARTZ; NOURSE, 2011; YU *et al*, 2012), sendo incomum em estudos realizados com isolados de mastite (PRASHANT *et al*, 2011; OTE *et al*, 2011).

Como foi observado, genes dos três grupos (adesão, evasão e lesão) foram identificados em todos os isolados, em sua maioria em uma alta frequência, o que mostra o grande arsenal e potencial de virulência de que dispõem esses isolados. Embora tenha-se observado 15 perfis, considerando a combinação dos genes de virulência apresentada, todos os isolados foram aptos a causar a mastite, independente de apresentar 13 (número máximo de genes observados por isolado - PGV1 e PGV2) ou sete (número mínimo de genes observados por isolado - PGV14 e PGV15) dos 14 genes estudados, mostrando que diversas combinações dos genes de virulência são possíveis mantendo a habilidade de causar infecção intramamária em vacas. Isso também fica evidente quando comparamos as frequências desses genes em outros estudos (Tabela 1). Não foi possível fazer associações entre os PGVs e os STs identificados, uma vez que se observou um mesmo PGV englobando isolados pertencentes a diversos STs (p. ex. o PGV3 - ST97, ST1624, ST3258, ST126 e ST2988) e um mesmo ST com isolados apresentando variados PGVs (p. ex. o ST2988

- P<sub>GV</sub>3, 4, 6, 9, 12, 13, 14 e 15). Embora o P<sub>GV</sub>3 tenha englobado 15 dos 31 isolados MRSA (48%), também não foi possível fazer associações entre os P<sub>GV</sub>s e resistência.

### 6.3 GENOTIPAGEM DE *S. aureus*

#### 6.3.1 Tipagem de sequência multilocus (MLST)

A análise do MLST identificou oito tipos de sequência dentre os 84 isolados, dos quais quatro foram descritos pela primeira vez. Três dos quatro novos STs ficaram restritos a um único município: ST2987 (CC126) e ST3257 (CC97) - Caetés; ST3258 (CC97) - Correntes; é possível que isso tenha ocorrido pelo fato de que o evento que causou a mutação seja recente, não permitindo a disseminação e estabelecimento do clone em um novo município.

O ST2988 (CC126), também novo, foi observado em Gravatá e São Bento do Una, porém quando se leva em consideração a distância geográfica entre Gravatá (município que apresentou maior quantidade de isolados que exibiram este ST), e os outros três municípios estudados, São Bento do Una é o mais próximo, o que poderia justificar a presença desse ST em propriedades desse município e a ausência nos demais. O mesmo aconteceu com o ST1624 (CC97), observado em isolados de dois dos quatro municípios estudados, São Bento do Una e Caetés, os mais próximos geograficamente (Figura 5).

Na propriedade 2 (Gravatá) foi possível observar cepas de diferentes fontes de isolamento (99A, 100A, 101A, 102A, 103A e 104A - obtidas a partir de amostras de queijo e 1A, 4A, 53A, 62A, 63A, 84A, 86A, 87A, 95A e 96A - obtidas a partir de amostras de leite) pertencendo ao mesmo perfil genotípico (ST2988) e também de virulência (P<sub>GV</sub>6), (Anexo 1), o que mostra o risco da contaminação cruzada, provavelmente decorrente das mãos dos manipuladores, e a possibilidade de dispersão da bactéria para consumo na preparação do queijo artesanal. O isolado obtido a partir da ordenhadeira (35B - ST97/P<sub>GV</sub>3) também mostrou correlação com outros isolados obtidos a partir do leite na mesma propriedade (1B, 4B, 5B, 6B, 8B, 9B, 10B, 11B, 13B, 17B, 23B, 29B, 32B, 36B - ST97/P<sub>GV</sub>3) e em propriedades de outros dois municípios (1C - propriedade 5, Caetés e 8D - propriedade 8, Correntes - ST97/P<sub>GV</sub>3), reforçando

o perigo de contaminação cruzada e possibilidade de dispersão da bactéria para outros animais no rebanho também na ordenha mecanizada.

Caetés foi o município que abrigou o maior número de STs diferentes (ST97 - CC97, ST126- CC126, ST1624 - CC97, ST2987- CC126 e ST3257- CC97, sendo os dois últimos, STs identificados pela primeira vez neste estudo e que ficaram restritos a este município); seguido dos municípios de São Bento do Una e Correntes, ambos abrigando isolados que exibiram 4 tipos de sequência (ST97 - CC97, ST126 - CC126, ST1624 - CC97 e ST2988 - CC126; ST1- CC1, ST97- CC97, ST126 - CC126 e ST3258 - CC97, respectivamente). Gravatá abrigou isolados que comportaram apenas dois STs (ST126 - CC126 e ST2988 - CC126).

A variabilidade genotípica em uma propriedade pode ser explicada pelo tipo de sistema de produção adotado pela mesma; espera-se que isolados obtidos de animais em um sistema semi-intensivo ou extensivo apresente maior variabilidade de genótipos devido à sua exposição a um maior número de fontes ambientais (OLIVEIRA *et. al*, 2015). A mesma ideia é válida quando se considera o tipo de dinâmica de aquisição dos animais pelas propriedades: uma maior variabilidade é esperada em propriedades que adquirem seus animais de um maior número de locais. O sistema de produção nas propriedades onde as 84 amostras foram obtidas era o semi-intensivo, porém dados referentes ao sistema de aquisição dos animais são desconhecidos.

Até o presente momento, apenas quatro trabalhos utilizando o MLST em isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de amostras de bovinos com mastite foram publicados no Brasil, nos quais os STs 1 (CC1), 97 (CC97), 126 (CC126) e 1624 (CC97) também foram observados, estando o ST97 e o ST126 entre os mais frequentes também nesses estudos (RABELLO *et. al*, 2007; AIRES-DE-SOUSA *et. al*, 2007; SILVA *et. al*, 2013, OLIVEIRA *et. al*, 2015). Os outros quatro STs, identificados pela primeira vez no presente trabalho, apresentam relação com os quatro STs já descritos na literatura, fazendo parte de dois dos complexos clonais também observados nos outros estudos brasileiros, o CC97 e o CC126. Esses resultados reforçam a ideia de que a maioria dos casos de mastite bovina por *S. aureus* seja causada por um grupo limitado de clones especializados e que estes sejam amplamente distribuídos entre rebanhos de diferentes regiões geográficas (MATTHEWS *et al.*, 1994; FITZGERALD *et al.*, 1997; ZADOKS *et al.*, 2000; SABOUR *et al.*, 2004; RABELLO *et al.*, 2007; SILVEIRA-FILHO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014).

O CC1 (ST1) é comum entre isolados humanos (ARGUDÍN *et. al*, 2011; LOZANO *et al*, 2013), mesmo assim foi possível observar nesse estudo, isolados de origem animal com um ST que faz parte desse complexo clonal (ST1). Acessando-se o banco de dados do MLST, pode-se observar que das 59 cepas registradas do ST1 com epidemiologia conhecida (acesso ao banco de dados em 25/01/16), 50 eram de humanos e nove eram de origem animal. Outros estudos realizados no Brasil e em outras partes do mundo também permitiram observar isolados de origem animal pertencentes a esse CC (RABELLO *et. al*, 2007; HUBER *et. al*, 2010; NAM *et. al.*, 2011; PILLA *et. al*, 2012).

Os CCs 97 (STs 97, 1624, 3257 e 3258) e 126 (STs 126, 2987 e 2988) não são comuns entre isolados de humanos, sendo frequentemente observado em isolados de ruminantes (SMITH *et. al*, 2005; AIRES-DE-SOUSA *et. al*, 2007; RABELLO *et. al*, 2007; BERGONIER *et. al*, 2014; KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014) sugerindo que os mesmos são reservatórios para estes CCs. Contudo o ST97, ancestral do CC97, foi encontrado em outro trabalho do grupo, mas em um estudo realizado com amostras clínicas em Pernambuco (ANDRADE; LEAL-BALBINO, 2016). O mesmo estudo também identificou o ST1. Esses resultados reforçam que embora alguns clones de *S. aureus* sejam mais frequentes em humanos ou animais, é possível observar alguns que são comuns a ambos. Esta observação merece atenção, uma vez que o ordenhador pode atuar como reservatório e ter função na disseminação desses clones entre os rebanhos, bem como pelo fato de que a ingestão de leite e queijo coalho contaminados pode carrear bactérias patogênicas e suas toxinas aos humanos, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública.

A rede de haplótipos (Figura 7) mostra a relação entre os três CCs identificados neste estudo. É possível observar um maior compartilhamento entre os CCs comumente identificados em animais (CC97 e CC126), que por sua vez estão separados do CC1, mais comum em humanos.

### **6.3.2 Correlação do MLST com as outras ferramentas de tipagem**

Foram testadas três diferentes associações utilizando-se os resultados do presente estudo com o MLST e os obtidos em um trabalho anterior (Silveira-Filho *et al*, 2014) com outras três ferramentas de tipagem (PFGE, ITS-PCR e PCR-coa). A primeira associação englobou as quatro ferramentas (DI: 0,95), gerou 39 perfis e

permitiu que fosse observada a correlação entre isolados obtidos a partir de leite de vaca com mastite e isolados obtidos a partir de queijo coalho e ordenhadeira, reforçando a ideia do perigo da contaminação cruzada e possibilidade de dispersão de bactérias patogênicas e suas toxinas para consumo humano; porém comprometeu a observação da dispersão clonal entre os diferentes municípios estudados (Quadro 10).

O resultado da segunda associação (MLST, ITS-PCR e PCR-coa) apresentou um DI de 0,84 e gerou 15 perfis, permitindo igualmente observar a correlação entre isolados obtidos a partir de leite de vaca com mastite e isolados obtidos a partir de queijo coalho e ordenhadeira, além de permitir identificar a dispersão clonal entre os diferentes municípios (Quadro 10). O perfil PG5 (126/R1/Coa1A), por exemplo, mostrou-se disseminado entre os quatro municípios estudados. A predominância de determinados clones sugere que alguns têm propriedades que o habilitam a superar as defesas do hospedeiro e estabelecer a infecção (Silveira-Filho *et al.*, 2014). Embora essa associação tenha concentrado a maioria dos MRSA (61%) no perfil PG4, não parece haver relação entre os perfis genotípicos e de resistência. Todos os perfis que englobaram isolados MRSA também apresentaram isolados MSSA (PG4, PG5, PG7, PG9 e PG10), ou representaram um único isolado MRSA (PG11 e PG13). Dos sete perfis envolvidos com isolados MRSA (PG4, PG5, PG7, PG9, PG10, PG11 e PG13), apenas três (PG4, PG5 e PG7) continham apenas MRSA e eram perfis representantes de amostras únicas, sugerindo que a resistência necessariamente não determina a maior disseminação de um clone.

A última associação testada foi entre o MLST e ITS-PCR. Apesar de apresentar um índice discriminatório menor que o observado com a associação usando as quatro ferramentas, o DI e os perfis, assim como a interpretação dos resultados se mantiveram mesmo com a retirada de uma das ferramentas (PCR-coa) (Quadro 10). Essa associação, portanto, mostrou-se mais apropriada uma vez que permitiu observar a relação clonal entre isolados de diferentes fonte de isolamento, e confirmar a disseminação de alguns genótipos entre diferentes municípios. Além disso, associar o MLST à ITS-PCR, que foi a ferramenta que de acordo com Silveira-Filho e colaboradores (2014) pareceu a melhor abordagem para estabelecer a relação clonal entre os isolados de *S. aureus* de diferentes propriedades leiteiras, traz mais robustez às análises visto que trata-se de uma ferramenta que não se baseia apenas no padrão de bandejamento, mas em sequenciamento, permite uma análise comparativa dos resultados obtidos em diferentes estudos pelo fato dos STs terem nomenclatura

padronizada mundialmente e facilmente comparável pela internet (saureus.mlst.net), permite ainda o agrupamento dos STs em CCs tornando mais clara a interação entre os diferentes STs e, até certo ponto, consegue distinguir isolados de origem humana de isolados de origem bovina.

Os resultados mostram que o cálculo do DI isoladamente não consegue determinar a melhor abordagem, uma vez que de nada adianta uma ferramenta, ou associação de ferramentas, se apresentar como a mais discriminatória se não permite observar a dinâmica entre os isolados; desta forma, o DI deve ser utilizado como um guia na determinação da melhor abordagem, juntamente com a epidemiologia. Esse resultado corrobora a ideia de Tenover e colaboradores (1994) de que a utilização de mais de uma técnica para estabelecer relação entre isolados bacterianos pode ser necessário para aumentar a eficiência e o poder discriminatório das mesmas.

**Quadro 10:** Características observadas a partir da correlação do MLST com outras ferramentas de tipagem.

<b>Associação</b> <b>Observações</b>	<b>PFGE, ITS-PCR, PCR-coa e MLST</b>	<b>ITS-PCR, PCR-coa e MLST</b>	<b>ITS-PCR e MLST</b>
<b>Nº de perfis</b>	39 (P1-P39)	15 (PG1-PG15)	15 (PG1'-PG15')
<b>Correlação isolados ≠ fontes</b>	Permitiu	Permitiu	Permitiu
<b>Dispersão clonal entre os municípios</b>	Comprometeu	Permitiu	Permitiu
<b>DI</b>	0,95	0,84	0,84

## 7. CONCLUSÕES

- Foi observada uma elevada frequência de *S. aureus* portadores da maioria dos genes de virulência investigados com diversas combinações aptos à causar mastite, o que mostra o elevado potencial de virulência desses isolados;
- A resistência observada não pode ser explicada pela pesquisa do gene *mecA* ou seu homólogo, o *mecA*<sub>LGA251</sub>, evidenciando que há outros mecanismos, além desses genes, que levam à resistência e que precisam ser investigados;
- Foi possível observar uma dispersão clonal de isolados de *S. aureus* relacionados ou idênticos em diferentes propriedades de municípios distintos ou num mesmo município utilizando o MLST como ferramenta única; os resultados obtidos demonstraram alguns isolados relacionados a clones raramente descritos nos bancos de dados internacionais e cepas comportando novos tipos de sequência multilocus.
- Dentre as associações testadas, a combinação do MLST e ITS-PCR apresentou maior poder discriminatório do que quando essas ferramentas são usadas isoladamente, mostrando-se útil para um estudo mais coerente, robusto e aprofundado do patógeno.

## REFERÊNCIAS

- Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM (1995) Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. Canadian journal of veterinary research. **Revue canadienne de recherche veterinaire** 59:124-128.
- Aires-de-Sousa M, Parente CESR, Vieira-da-Mota O, Bonna ICF, Silva DA, Lencastre H (2007) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.** 73(12): 3845-3849.
- Alibayou B, Baba-Moussa L, Sina L, Zdenková K, Demnerová K (2014) *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. **Molecular Biology Reports.** 41 (8): 5005-5018.
- Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC (2016) Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology** (Online). 16:2- 9.
- Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. (2015) Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Cellular and infection microbiology** 5:1-10.
- Argudín MA, Mendoza MC, Vázquez F, Guerra B, Rodicio MR (2011) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from geriatric patients attending a long-term care Spanish hospital. **Journal of Medical Microbiology** 60:172–179.
- Ba X, Harrison EM, Edwards GF, Holden MT, Larsen AR, Petersen A, Skov LR, Peacock SJ, Parkhill J, Paterson GK, *et. al* (2014) Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. **J Antimicrob Chemother** 69:594-597.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution.** 16: 37 – 48.
- Banerjee R, Gretes M, Harlem C, Basuino L, Chambers HF (2010) A *mecA*-negative strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level beta-lactam resistance contains mutations in three genes. **Antimicrob Agents Chemother** 54:4900-4902.
- Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graberd H, Moronie P, Taminiug B, Mainila JG (2016) Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. **Vet Microbiology.** 185:1-6.
- Bekir K, Haddad O, Grissa M, Chaieb K, Bakhrouf A, Ibrahim Elgarssdi S (2012) Molecular detection of adhesins genes and biofilm formation in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research.** 6:4908-4917.
- Bergonier D, Sobral D, Feßler AT, Jacquet E, Gilbert FB, Schwarz S, Treilles M, Bouloc P, Pourcel C, Vergnaud G (2014), *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **BMC Veterinary Research,** 45:97.
- Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae I, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthan GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, *et al.* (2008) Genotypic

- characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. **Journal of Clinical Microbiology** 46(2): 678-684.
- Camussone C, Rejf P, Pujato N, Schwab A, Marcipar I, Calvinho LF (2012) Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology** 43(3):1010-1014.
- Camussone CM, Calvinho LF (2013) Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. **Revista Argentina de Microbiología** 45(2):119-130.
- Cerca N, Brooks JL, Jefferson KK (2008) Regulation of the Intercellular Adhesin Locus Regulator (icaR) by SarA, B, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology** 190: 6530–6533.
- Chambers HF, DeLeo FR (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat Rev Microbiol** 7:629-641.
- Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. **Thrombosis and Haemostasis** 94: 278-85.
- CLSI - Clinical and laboratory standards institute. 2012. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Second Informational Supplement. M100/ S22, v.32, n.3.
- CLSI - Clinical and laboratory standards institute. 2015. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100/ S25, v.35, n.3.
- Cocchiaro JL, Gomez MI, Risley A, Solinga R, Sordelli DO, Lee JC (2006) Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology** 59(3): 948–960.
- Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MMS (2011) Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Dairy Sci.** 94:3305-3310.
- Coser SM, Lopes MA, Costa, GM (2012) **Mastite bovina: controle e prevenção**. Boletim Técnico 93: 1-30.
- Cuny C, Leyer F, Strommenger, Witte W (2011) Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany **Plos One** 6(9):e24360.
- Deb R, Kumar A, Chakraborty S, Verma AK, Tiwari R, Dhama K, Singh U, Kumar S (2013) Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. **Pak J Biol Sci.** 16(23):1653-61.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution** 8(6):747-63.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews** 13:16-34.
- Dossett JH, Kronvall G, Williams RC, Quie PG (1969) Antiphagocytic effects of Staphylococcal Protein A. **The Journal of Immunology** 103: 1405-1410.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol** 38:1008-1015.

- Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. Error probabilities. **Genome res** 8:186-194.
- Fabres-Klein MH, Aguilar AP, Silva MP, Silva DM, Ribon AOB (2014) Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. V.33, 12: 2095-2104.
- Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V (1997) Fine structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiol. Infect.** 119: 261-269.
- Fluit AC (2012) Livestock-associated *Staphylococcus aureus* **Clin Microbiol Infect** 18:735-744.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK 2014, Höök M (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus* **Nature** 12:49-62.
- Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM, Júnior WPJ, Stamford TLM, Mota RA, Sena MJ, Almeida AMP, Balbino VQ, Leal-Balbino TC (2008) Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 28: 617-621.
- Gao J, Stewart GC (2004) Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* Protein A (Spa) promoter. **Journal of Bacteriology** 186: 3738-3748.
- García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, *et al* (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infect Dis** 11 (8): 595-603.
- Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M (2016) Comparison of Biofilm Formation between Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Iranian Biomedical Journal** 20(3): 175–181.
- Gogoi-Tiwari J, Waryah B, Sunagar R, Veeresh HB, Nuthanalakshmi V, Preethirani PL, Sharada R, Isloor S, Bhat A, Al-Salami H, *et al* (2015) Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Australia and India. **Australian Veterinary Journal** 93:278-282.
- Gordon D, Abajian C, Green P (1998) *Consed*: A graphical tool for sequence finishing. **Genome res** 8:195-202.
- Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ (1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. **Molecular Microbiology** 17(6):1143-1152.
- Guidry A, Fattom A, Patel A, O'Brien C, Shepherd S, Lohuis J (1998) Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **Am J Vet Res** 59: 1537–1539.
- Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH (2005) Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. **Journal of Dairy Science** 88:3149-3154.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U (2003) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for *spa* Repeat Determination and Database Management. **Journal of Clinical Microbiology** 41:5442-5448.
- Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K, Eguchi M (2010) Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their

- relevance to methicillin-resistant isolates from humans. **Journal Clinical Microbiology**. 48:2130-2139.
- Holmes MA, Zadoks RN (2011) Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastites. **Journal Mammary Gland Biol Neoplasia** 16:373-382.
- Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. (2010) Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Euro Surveill**. 15:pil: 19542.
- Hunter, PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J. Clin. Microbiol**. 26:2465–2466.
- Hwang SY, Park YK, Koo HC, Park YH (2010) *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Veterinary Science** 11(2):125-131.
- IBGE (2014) **Produção da Pecuária Municipal**, 42: 1-39.
- Jacques M, Aragon V, Tremblay YDN (2010) Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Animal Health Research Reviews** 11:97–121.
- Jensen MA, Webster JA, Straus N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p. 945-952.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D (2014) *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. **BioMed Research International**, 2014.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic Acids Res** 33:511-518.
- Khoramian B, Jabalameli F, Niasari-Naslaji A, Taherikalani M, Emaneini M (2015) Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. **Microbial Pathogenesis** 88:73-77.
- Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR (2011) Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE** 6(11):1-16.
- Klein RC, Fabres-Klein MH, Brito MAVP, Fietto LG, Ribon AOB (2012) *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology** 160:183-188.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K (2007) Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 51: 264-274.
- Kot B, Szweda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K (2016) Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **Journal of Dairy Research** 83 228-235.
- Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P (2011) Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*

- secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. **Annals of Intensive Care** 1:52.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, *et al.* (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet** 357:1225-1240.
- Li L, Zhou, L, Wang L, Xue H, Zhao X (2015) Characterization of methicillin-resistant and -susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in Northwestern China. **PLoS ONE** 10(3):e0116699.
- Lin MH, Shu JC, LinLP, Chong K, Cheng YW, Du JF, Liu S (2015) Elucidating the crucial role of poly n- acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in cellular adhesion and pathogenesis. **PLoS ONE** 10(4):e0124216.
- Lindsay JA, Holden MT. (2006) Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. **Funct Integr Genomics** 6(3):186–201.
- Linke D, Goldman A (eds.) (2011) **Bacterial Adhesion, Advances in Experimental Medicine and Biology** 715 7:105-123.
- Liu M, Liu J, Guo Y, Zhang Z (2010) Characterization of virulence factors and genetic background of *Staphylococcus aureus* isolated from Pekin university people's hospital between 2005 and 2009. **Curr microbiology** 61:435-443.
- Lozano C, Porres-Osante N, Crettaz J, Rojo-Bezares B, Benito D, Olarte I, Zarazaga M, Sáenz Y, Torres C (2012) Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. **J Infect Chemother** 19(2):233–242.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, *et al.* (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc natl acad sci USA** 95:3140-3145.
- Malachowa N, DeLeo FR (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and molecular life sciences** 67:3057-3071.
- Matthews KR, Kumar SJ, O'conner AS, Harmon RJ, Pankey JW, Fox LK, Oliver SP (1994) Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Epidemiol infect** 112:177-186.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, tenover FC (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology** 41: 5113-5120.
- Melo DA, Coelho IS, Motta CC, Rojas ACCM, Dubenczuk FC, Coelho SMO, Souza MMS (2014) Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology** 45(3):1075-1082.
- Mitra SD, Velu D, Bhuvana M, Krithiga N, Banerjee A, Shome R, Rahman H, Ghosh SK, Shome BR (2013) *staphylococcus aureus* mastitis in India. **Journal Applied Microbiology**. 144:1604-1615.
- Moore PCL, Lindsay JA (2001) Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. **Journal of clinical microbiology** 39(8):2760-2767.
- Nam HM, Lee AL, Jung SC, Kim MN, Jang GC, Wee SH, Lim SK (2011). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and Characterization

- of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Korea. **Foodborne pathogens and disease**. 8 (2) 231:238.
- Nishifuji K, Sugai M, Amagai M (2008) Staphylococcal exfoliative toxins: “molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. **Journal of dermatological Science** 49:21-31.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet infectious diseases** 2: 180-189.
- Oliveira CJB, Tiao N, Sousa FGC, Moura JFP, Santos-Filho L, Gebreyes WA (2015) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and Identification of Novel Sequence Types. **Zoonoses and Public Health** 63:97-105.
- Ote, I.; Taminau, B.; Duprez, J.; Dizier, I.; Mainil, JG. (2011) Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**. 153: 285-292.
- Payne DE, Boles BR (2016) Emerging interactions between matrix components during biofilm development. **Current Genetics** 62:137–14.
- Peacock SJ, Day NPJ, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ (2000) Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. **Journal of Infection** 41: 23–31.
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NPJ (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.** 70:4987-4996.
- Peacock SJ and Paterson GK (2015) Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annu. Rev. Biochem.** 84:577-601.
- Pereyra EA, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, Calvinho LF, Diez C, Dallard BE (2016) Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization i bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology** 183: 69-77.
- Pilla R, Castiglioni V, Gelain ME, Scanziani E, Lorenzi V, Anjum M, Piccinini R (2012) Long-term study of MRSA ST1, t127 mastitis in a dairy cow. **Veterinary Records**. 170, 312a.
- Prashanth K, Rao KR Reddy PVV, Saranathan R, Makki AR (2011) Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Obtained from Humans and Bovine Mastitis Samples in India. **Journal of Global Infectious Diseases** 3:115-122.
- Rabello RF, Moreira BM, Lopes RMM, Teixeira LM, Riley LW, Castro ACD (2007) Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. **Journal of Medical Microbiology**. 56:1505-1511.
- Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R e Leslie K (2004) Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **J. Clin. Microbiol.** 42: 3449-3455.
- Salmon SA (2002) Use of antimicrobial susceptibility data to assist in the determining the best therapy for clinical mastites. Anais do **41º National mastites council**, madson.

- Scali F, Camussone C, Calvinho LF, Cipolla M, Zecconi A (2015) Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? **Research in Veterinary Science** 100:88–99.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Radström (2011) The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence** 2(6):580-592.
- Schwartz KL, Nourse C (2011) Panton-valentine leukocidin-associated *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia in infants: a report of four cases and review of the literature. **Eur J Pediatr**, 171: 711-717.
- Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC (2011) Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type XI Carrying Highly Divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy** 55:3765–3773.
- Silva NCC, Guimarães FF, Manzi MP, Budri PE, Gómez-Sanz E, Benito D, Langoni H, Rall VLM, Torres C (2013) Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **J. Dairy Sci.** 96:6856-6862.
- Silveira-Filho VM, Luz IS, Campos APF, Silva WM, Barros MPS, Medeiros ES, Freitas MFL, Mota RA, Sena MJ, Leal-Balbino TC (2014) Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in northeast Brazil. **Journal of Food Protection** 77(4):583-591.
- Sitkiewicz I, Babiak, I, Hryniewicz, W (2011) Characterization of transcription with *sdr* region of *Staphylococcus aureus*. **Antonie Van Leeuwenhoek** 99:409-416.
- Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Kruze JV, Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG (2005) Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 43:4737-4743.
- Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z (1985) Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. **Journal of Clinical Microbiology**, 22:828-834.
- Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, *et al.* (2000) Capsule Expression by Bovine Isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: Genetic and Epidemiologic Analyses. **Journal of Clinical Microbiology** 38:846–850.
- Spratt BG, 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. **Current opinion in microbiology** 2:312-316.
- Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ (2004) Displaying the relatedness among isolates of bacterial species - The eBURST approach. **FEMS Microbiology Letters** 241:129–134.
- Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, MacKenzie (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of antimicrobial agents** 39:273-282.

- Stefani S, Goglio A (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. **International journal of infectious diseases** 14S4:S19–S22.
- Sutra L, Poutrel B (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **J. med. Microbiol.** 40:79-89.
- Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A (2012) Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. **Polish Journal of Microbiology** 61:65–69.
- Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** 32:407-415.
- Tong SYC, Luke FC, Fowler VGJr (2012) Colonization, pathogenicity, host susceptibility and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? **Semin Immunopathol.** 34(2):185-200.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2005) **Microbiologia**. 8. ed. Artmed, Porto Alegre. pp 894.
- Trabulsi, LR, Alterthum, F (2008) **Microbiologia**. 5. ed. Atheneu, São Paulo, pp. 760.
- Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G (2003) Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesin involved in human hematogenous infections. **Journal of clinical microbiology** 41:4465-4467.
- TURLEJ, A; HRYNIEWICZ, W; EMPEL, J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. **Pol J Microbiol.** 60(2): 95-103.
- Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS (2003) Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary microbiology** 92:179-185.
- Wang SC, Wu CM, Xia SC, Qi YH, Xia LN, Shen JZ (2009) Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. **Veterinary microbiology** 137:276-281.
- Wang W, Yu X, Yang X, Mei L, Guan W, Ma G, Li W, Guo Y (2014) Antimicrobial resistance profiles and genetic diversity of bovine *Staphylococcus aureus* isolated in 5 provinces of China in 2013. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.** 48(5):406-11.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics** 25(9):1189-1191.
- Xu J, Tan X, Zhang X, Xia X, Sun H (2015) The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. **Microbial Pathogenesis** 88:29-38.
- Xue H, Lu H, Zhao X (2011) Sequence diversities of serine-aspartate repeat genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different hosts presumably by horizontal gene transfer. **PLoS ONE** 6(5):e20332.

- Yang FL, Li XS, Liang XW, Zhang XF, Qin GS, Yang BZ (2012) Detection of virulence-associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. **Trop Anim Health Prod** 44:1821–1826.
- Yu F, Li T, Huang X, Xie J, Xu Y, Tu J, Qin Z, Parsons C, Wang J, Hu L, *et al.* (2012) Virulence genes profiling and molecular characterization of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 74:363-368.
- Zadoks R, Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH & van Belkum, A (2000) Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Clin. Microbiol.** 38:1931-193.
- Zanella GN, Mikcha JMG, Bando E, Siqueira VLD, Machinski M (2010) Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. **Journal of Food Protection**. 9:1596-1773.

### RECURSOS DA INTERNET

- EMBRAPA Gado de Leite (2016) Controle da Mastite. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/sistemaproducao/410216-controle-de-mastite>>  
Acesso em 27 set. 2016.
- Mendonça LC; Guimarães AS, Brito MAVP (2012) Práticas para o controle da mastite. Comunicado técnico 66. Disponível em : <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/62923/1/COT-66-Praticas-para-o-controle-da-mastite-Leticia-Mendonca-n-66.pdf>>.  
Acesso em 01 dez. 2015.
- NCBI – NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. (2013) TaxBrowser, Washington Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>>.  
Acesso em: 01 fev. 2013.
- NCBI – NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. (2014) TaxBrowser, Washington Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=90964&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>>.  
Acesso em: 06 fev. 2014.
- Rosso, G. Mastite bovina prejudica qualidade de leite. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1831530/mastite-bovina-prejudica-qualidade-de-leite>>  
Acesso em: 01 set. 2014.
- Science Photo Library. London (2014). Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/>>.  
Acesso em: 1 set. 2014.
- Simões TVMD, Oliveira AA (2012) Mastite bovina, considerações e impactos econômicos. Documento 170. Disponível em: [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2012/doc\\_170.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf).  
Acesso em: 1 set. 2014.

## ANEXOS

ANEXO A- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS EM QUATRO MUNICÍPIOS DA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO, PERFIS DE SENSIBILIDADE À METICILINA, PERFIS GENOTÍPICOS GERADOS PELO MLST, PFGE, ITS-PCR E PCR-Coa, E PERFIS DE VIRULÊNCIA (PGV).

ISOLADOS (Município)	FONTE DE ISOLAMENTO	PROPRIEDADE (tipo de ord.)	SUSC. À METIC.	MLST (ST/CC)	PFGE (pulsotipo)	ITS-PCR (tipo ITS)	COA (coagulotipo)	Genes de virulência													PGV	
								Fatores de adesão						Fatores de evasão				Fatores de lesão				
								<i>cifA</i>	<i>CifB</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>ebpS</i>	<i>sdrC</i>	<i>spa</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>pvl</i>	<i>hla</i>		<i>hlb</i>
19A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	G1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV5	
20A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
21A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	G1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	PGV8
22A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
25A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
26A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
31A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV2	
38A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
40A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
51A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	<b>MRSA</b>	#2988/126	B1	R4	Coa1A	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	PGV14
53A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B3	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
57A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	<b>MRSA</b>	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
59A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R4	Coa1A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
61A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
62A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B2	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
63A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
70A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B2	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
76A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	<b>MRSA</b>	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
81A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	<b>MRSA</b>	#2988/126	I3	R5	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
82A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	<b>MRSA</b>	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	PGV12
83A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	<b>MRSA</b>	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6

84A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
85A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MRSA	#2988/126	I2	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
86A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I2	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
87A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
88A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	J3	R6	Coa1A	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	PGV15
90A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MRSA	#2988/126	I1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	PGV9
92A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
95A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
96A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
1A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
4A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
99A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
100A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
101A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
102A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
103A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
104A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
26B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MRSA	97/97	C2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
14B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MSSA	126/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	PGV11
22B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MSSA	126/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
27B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MRSA	126/126	C1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
28B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MRSA	126/126	E	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
1B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
4B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
5B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
6B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
8B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
9B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MSSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3

10B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
11B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
13B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
17B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
18B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	C2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV1</b>
19B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MSSA	97/97	H	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV1</b>
20B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<b>PGV7</b>
21B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<b>PGV7</b>
23B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	B5	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
29B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	J1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
32B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	J1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
34B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	B4	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV1</b>
35B (S. B. Una)	Ordenhadeira	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	J2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
36B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	97/97	J2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
12B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	1624/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
3B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	<b>MRSA</b>	#2988/126	C1	R10	Coa2	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV13</b>
1C (Caetés)	Leite	5 (MEC)	MSSA	97/97	D3	R7	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
2C (Caetés)	Leite	5 (MEC)	MSSA	3257/97	D3	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV3</b>
11C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	97/97	D3	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV1</b>
3C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV6</b>
4C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A2	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV6</b>
5C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV6</b>
6C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<b>PGV6</b>
7C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV4</b>
8C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV4</b>
9C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV4</b>
12C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	1624/97	D3	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV1</b>
10C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	#2987/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<b>PGV4</b>

13C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	#2987/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
1D (Correntes)	Leite	7 (MEC)	MSSA	#3258/97	C3	R7	Coa2	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	PGV10
2D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	1/1	G3	R3	Coa1B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV5
3D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	97/97	G2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
8D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	97/97	G2	R9	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
4D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	126/126	F	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
10D (Correntes)	Leite	9 (MEC)	MSSA	1/1	G3	R3	Coa1B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV5

**Nota:** O quadro está ordenado em função das propriedades. Cada cor representa um ST. #STs novos. MAN - Ordenha manual; MEC - Ordenha mecânica.

## ANEXO B - EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS PELO KIT DA QIAGEN (DNEASY® BLOOD & TISSUE KIT) – COM ALTERAÇÕES

- Reservar a placa (ou banho-maria);
  - Ligar a centrífuga

- 1- Identificar tubos de 1,5 ml para cada isolado, colocar 1ml da cultura em caldo BHI. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm, 4°C. Descartar o sobrenadante com bomba a vácuo.
- 2- Ligar a placa ou banho-maria. Ressuspender o pellet em 200ul de TE :1. Adicionar 15ul de lisozima (10mg/ml) e 10ul de proteinase K (do kit) e homogeneizar no vórtex. Colocar na placa térmica (ou banho-maria) a 60°C por 20min.
- 3- Adicionar 100ul de STE (EDTA + SDS + TRIS + H<sub>2</sub>O) e depois 200ul de tampão AL. Mistura no vórtex. Incuba a 56° em banho-maria por 30 minutos.

STE p/ 20 amostras: 480ul de H<sub>2</sub>O  
 1ml de EDTA  
 20ul de TRIS  
 500ul de SDS

p/30 amostras: 720ul de H<sub>2</sub>O  
 1,5ul de EDTA  
 30ul de TRIS  
 750ul de SDS

- 4- Adicionar 200ul de etanol 100% para cada amostra e misturar no vórtex.
- 5- Pipetar todo o volume ( $\pm 600\mu\text{l}$ ) de cada amostra na coluna dentro de um tubo coletor de 2ml.. Centrifugar a  $\geq 8000$  (14000) rpm por 1 minuto. Usar uma velocidade mais alta, caso as amostras sejam viscosas a fim de empurrar o líquido pela membrana. Descartar o tubo coletor.
- 6- Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2ml, adicionar 500ul de tampão AW1 e centrifugar por 1 minuto a  $\geq 8000$  rpm. Descartar o tubo coletor.
- 7- Colocar a coluna em um novo tubo coletor de 2ml, adicionar tampão AW2 e centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm para secar a membrana. Descartar o tubo coletor. Ter cuidado quando for remover o tubo da centrífuga para que a membrana não entre em contato com o líquido do tubo coletor.

- 8- Colocar a coluna em um novo tubo de 1,5µl. Cortar a tampa. Pipetar 200µl do tampão AE diretamente na membrana. Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar por 1 minuto a  $\geq 8000$  rpm e descartar a coluna.
- 9- Pipetar o eluído em novos tubos e identificar a amostra com a data de extração. Estocar a 4°C para uso imediato, a -20°C para uso posterior ou ainda a -70°C para estocagem em longo prazo.

\*Tampão de lise (estocar a temperatura ambiente)

20mM Tris-Cl, pH8,0

2mM EDTA sódio

1,2% Triton X-100

Adicionar lisozima em pequenas alíquotas de tampão para ter solução nova para cada extração.

Ex.: 2ml de tampão + 0,02g lisozima (estocar a -20°C no dissecador)

10mg/ml de lisozima.

\*Adicionar 0,01g lisozima + 1µl de lisostafina 10mg/ml por cada 1ml de tampão de lise.



**RESUMO**

28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

*Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina. Neste estudo, foram investigadas a presença de 14 genes de virulência, mecanismos de resistência à meticilina e a diversidade genética em isolados de leite e queijo da Região Agreste de Pernambuco. Os genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *ebpS*, *sdrC*, *cap5*, *spa*, *icaA*, *icaD*, *hla* e *hlb* foram analisados nos 84 isolados, estando presentes em pelo menos 94% desses; os genes *fnbB*, *cap8* e *pvl* apresentaram frequência de 46%, 5% e 21%, respectivamente. Mesmo os isolados fenotipicamente resistentes apresentaram-se genotipicamente sensíveis à meticilina. A análise de sequências multilocus (MLST) revelou oito perfis e três complexos clonais revelando a interação entre os diferentes tipos de sequência. Os dados do MLST mostraram a dispersão clonal entre diferentes municípios, e a relação clonal entre amostras de queijo e leite da mesma propriedade, inclusive com o mesmo perfil de virulência, evidenciando o risco da contaminação cruzada, provavelmente decorrente da manipulação, e também da dispersão da bactéria para consumo. Estes achados revelam um sério problema de Saúde Pública para os consumidores dos produtos dessa região. A associação de diferentes técnicas de tipagem (MLST e ITS-PCR) apresentou maior poder discriminatório que quando estas são usadas isoladamente, mostrando-se útil para um estudo mais coerente, robusto e aprofundado do patógeno.

**Palavras-chave: Genotipagem; MLST; mecanismo de resistência à meticilina; genes de virulência.**

## 53 1. INTRODUÇÃO

54           Microorganismos do gênero *Staphylococcus* spp. são os mais frequentemente  
55 isolados em amostras de leite provenientes de vacas com mastite contagiosa, sendo *S.*  
56 *aureus* a espécie mais observada. Deve-se assinalar a importância da doença na saúde  
57 pública, pela veiculação aos humanos de microrganismos patogênicos e suas toxinas,  
58 assim como resíduos de antibióticos. São significativos também os prejuízos causados  
59 às indústrias pela redução na quantidade e qualidade do leite produzido.

60           *Staphylococcus aureus* produz vários fatores de virulência que contribuem de  
61 diversas maneiras para sua patogenicidade. Seu alto nível de resistência antimicrobiana,  
62 especialmente a beta-lactâmicos, favorece falhas no tratamento e sua persistência no  
63 rebanho. A aquisição do gene *mecA* pelo *S. aureus* pode conferir à bactéria resistência  
64 ao antibiótico meticilina e a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos utilizados no tratamento da  
65 mastite.

66           Definir, do ponto de vista epidemiológico, a origem dos organismos envolvidos  
67 na etiologia de uma doença é importante, já que a adequada identificação do patógeno é  
68 um requisito indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção, e também  
69 para monitorar sua dispersão dentro e entre as populações estudadas. Os resultados de  
70 vários estudos sugerem que a maioria dos casos de mastite bovina por *S. aureus* seja  
71 causada por um grupo limitado de clones e que estes sejam amplamente distribuídos em  
72 diferentes regiões geográficas. Várias técnicas de tipagem molecular de *S. aureus* já  
73 foram desenvolvidas e apresentam um alto valor epidemiológico, podendo auxiliar no  
74 conhecimento mais detalhado sobre a dinâmica das infecções causadas por *S. aureus*.

75           O objetivo do trabalho foi realizar uma caracterização molecular dos *S. aureus*  
76 isolados de leite mastítico e queijo coalho de diferentes municípios da região agreste de  
77 Pernambuco para melhor compreender os fatores de virulência, a dispersão e

78 diversidade desses isolados, buscando a ferramenta ou associação de ferramentas que  
79 forneça a melhor abordagem para tal, além do melhor entendimento sobre a  
80 susceptibilidade antimicrobiana à meticilina e sua relação com a mastite bovina.

81

## 82 **2. MATERIAL E METÓDOS**

### 83 **2.1. Isolados de *Staphylococcus aureus***

84 Foram analisados um total de 84 isolados de *S. aureus* provenientes de leite  
85 obtido de vacas com mastite, e queijo coalho de quatro municípios da região Agreste de  
86 Pernambuco (Gravatá, São Bento do Una, Caetés e Correntes) (Figura 1) dos quais, 31  
87 eram *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes (MRSA). Os isolados foram obtidos  
88 em 2005 e estavam estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  em glicerol-BHI na bacterioteca do Centro de  
89 Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM). O DNA genômico para uso em ensaios  
90 baseados em PCR foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico de  
91 acordo com Freitas e colaboradores (2008).

92

### 93 **2.2. Pesquisa dos mecanismos de resistência à meticilina: *mecA* e *mecC***

94 O gene *mecA* (286pb) foi pesquisado em todos os isolados com *primer* descrito  
95 por Kondo e colaboradores (2007). As cepas MRSA3231 e ATCC 25923 foram  
96 utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. A pesquisa do gene  
97 *mecC* (fragmento de 304pb) foi realizada utilizando *primers* e condições de reação de  
98 acordo com Cuny e colaboradores (2011). Os amplicons foram analisados em gel de  
99 agarose 1,5% (m/v), corados com SYBR<sup>®</sup> Green (PROMEGA), visualizados e  
100 fotografados no sistema de fotodocumentação L-PIX ex (Loccus Biotecnologia).

101

102

### 103 **2.3. Investigação dos genes de virulência**

104 Foram investigados 14 genes de virulência responsáveis pela adesão ao tecido do  
105 hospedeiro, evasão do sistema imune e lesão tecidual, pela técnica de PCR. Os *primers*  
106 utilizados bem como as condições das reações estão descritos na tabela 1. Os amplicons  
107 foram analisados como descrito anteriormente.

108

### 109 **2.4. Genotipagem**

#### 110 2.4.1. Tipagem de sequência multilocus (MLST)

111 A técnica do MLST foi realizada segundo Enright e colaboradores (2000). A  
112 análise dos cromatogramas e montagem dos contigs foi realizada utilizando o pacote  
113 PHRED/PHRAP/CONSED (versões 0.071220.c, 1.090518, e 23.0, respectivamente)  
114 (EWING; GREEN, 1998; GORDON *et al.*, 1998). O alinhamento foi realizado  
115 utilizando o programa Mafft (versão 6.815b) (KATOH *et al.*, 2005) e sua análise com o  
116 Jalview (versão 2.8) (WATERHOUSE *et al.*, 2009). As sequências obtidas foram  
117 submetidas ao banco de dados público internacional MLST (<http://saureus.mlst.net>),  
118 para obtenção do perfil alélico e determinação do ST dos isolados. Como controle, além  
119 da ATCC25923, também foi utilizada a cepa MRSA02928, gentilmente cedida pelo  
120 laboratório PHIDL da Universidade de Pittsburgh.

121

#### 122 2.4.1.1 Rede de haplótipos

123 Para verificar a dispersão e compartilhamento dos haplótipos entre as  
124 populações estudadas foi criada uma rede de haplótipos utilizando o programa  
125 NETWORK, versão 4.6 (Bandelt *et al.*, 1999).

126

127

### 128 3. RESULTADOS

#### 129 3.1. Pesquisa dos mecanismos de resistência à meticilina: genes *mecA* e *mecC*

130 A pesquisa por PCR do gene *mecA*, responsável pelo principal mecanismo de  
131 resistência à meticilina e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, assim como do seu  
132 homólogo, *mecC* ou *mecA<sub>LGA251</sub>*, foi realizada nos 84 *S. aureus* estudados. Todos os  
133 isolados, mesmo os 31 MRSA, foram negativos para ambos os genes.

134

#### 135 3.2. Investigação dos genes de virulência

136 As frequências dos 14 genes de virulência (*clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *sdrC*,  
137 *spa*, *cap5*, *cap8*, *icaA*, *icaD*, *pvl*, *hla* e *hlb*) cuja presença foi pesquisada em todos os 84  
138 isolados de *S. aureus* dos quatro municípios podem ser vistas nas tabelas 2, 3 e 4. Nos  
139 municípios de Gravatá, Caetés e Correntes, com exceção do gene *fnbB*, todos os genes  
140 pesquisados com a função de adesão apresentaram uma alta frequência (95% ou mais)  
141 (Tabela 2). No município de São Bento do Una os genes *fnbB* e *sdrC* apresentaram  
142 frequência de 89% (Tabela 2).

143 Os genes com função de evasão estiveram presentes em, pelo menos, três dos  
144 cinco genes estudados. Os quatro municípios apresentaram frequência superior à 80%  
145 para todos os genes pesquisados com função de evasão ao sistema imune do hospedeiro  
146 com exceção do gene *cap8* que não estava presente nos isolados dos municípios de São  
147 Bento do Una e Caetés; em Gravatá, apenas 5% dos isolados apresentaram o *cap8* e no  
148 município de Correntes, a frequência observada foi de 33% (Tabela 3).

149 Dentre os três genes com função de lesão ao tecido do hospedeiro, o menos  
150 frequente foi o *pvl*. Todos os isolados foram positivos para pelo menos um dos genes. A  
151 frequência foi superior à 90% em todos os municípios para *hla* e *hlb*, enquanto que o *pvl*

152 variou entre os municípios: 10,5% - Gravatá, 22% - São Bento do Una, 54% - Caetés, e  
153 17% - Correntes (Tabela 4).

154

### 155 **3.3. Genotipagem de *S. aureus***

#### 156 3.3.1. Tipagem de sequência multilocus (MLST)

157 Os 84 isolados deste estudo foram analisados pelo MLST e agrupados em oito  
158 tipos de sequências (STs), definidos pela combinação dos alelos de cada um dos sete  
159 genes *housekeeping* (Tabela 5). Das 84 amostras estudadas, 34 (40%) foram agrupadas  
160 em quatro STs (ST2987, ST2988, ST3257 e ST3258) descritos pela primeira (Tabela 5).  
161 Dois dos novos STs (ST2987 e ST2988) foram relacionados ao ST126 já descrito;  
162 outros dois STs (ST3257 e ST3258) foram relacionados ao ST97. As diferenças alélicas  
163 entre eles podem ser observadas na tabela 5.

164 O tipo de sequência mais frequente nos isolados foi o ST2988 (36%), seguido do  
165 ST97 (30%) e ST126 (25%); juntos esses três STs representaram 91% dos isolados  
166 estudados (Tabela 5). ST126 foi o único presente em todos os municípios. O ST97 foi  
167 observado em três municípios (São Bento do Una, Caetés e Correntes), os STs 1624 e  
168 2988, em dois municípios (São Bento do Una e Caetés, e Gravatá e São Bento do Una,  
169 respectivamente), e os demais STs em apenas um município (ST1 - Correntes; ST2987 -  
170 Caetés; ST3257 - Caetés e ST3258 - Correntes, sendo os três últimos, STs novos). O  
171 ST2988, também novo, foi observado em Gravatá e São Bento do Una (Tabela 5).

172 Na propriedade 2 (Gravatá) foi possível observar cepas de diferentes fontes de  
173 isolamento (queijo e leite) pertencendo ao mesmo perfil de ST (Tabela 6). Caetés foi o  
174 município que abrigou o maior número de isolados com STs diferentes (ST97, ST126,  
175 ST1624, ST2987 e ST3257), seguido por São Bento do Una e Correntes, ambos  
176 abrigando isolados que apresentaram quatro STs (ST97, ST126, ST1624 e ST2988;

177 ST1, ST97, ST126 e ST3258, respectivamente). Gravatá abrigou apenas isolados que  
178 apresentaram dois STs (ST126 e ST2988) (Tabela 5).

179 O ST1, quando comparado aos outros STs, diferiu em pelo menos três dos sete  
180 genes, não sendo, portanto, relacionado a nenhum outro ST encontrado neste estudo.  
181 Esse tipo de sequência foi observado em apenas dois isolados (2D e 10D - município de  
182 Correntes) (Tabela 6).

183 Os oito STs foram incluídos em três complexos clonais: CC1 (ST1), CC97  
184 (ST97, ST1624, ST3257 e ST3258) e CC126 (ST126, ST2987 e ST2988) (Tabela 5;  
185 Figura 1). O nível de compartilhamento de nucleotídeos entre os STs identificados neste  
186 estudo e suas frequências de distribuição entre os municípios podem ser vistos na rede  
187 de haplótipos (Figura 1). O menor número de diferença entre dois STs foi de um  
188 nucleotídeo (ST97-ST3257, ST97-ST3258, e ST126-ST2988) (Figura 1). Alguns STs  
189 diferiram entre si em mais de um polimorfismo, porém dentro do mesmo gene, como foi  
190 o caso dos ST97 e ST1624, e ST126 e ST2987, ambos com três polimorfismos no gene  
191 *yqiL* (Figura 1). Os STs 97 e 2987 apresentaram polimorfismo nos genes *arcC* (1  
192 nucleotídeo) e *gmk* (5 nucleotídeos) (Figura 1). Nos STs 126 e 1624, as diferenças  
193 foram nos genes *aroE* (1 nucleotídeo) e *gmk* (5 nucleotídeos) (Figura 1). O ST1 foi o  
194 que mais diferiu dos demais, estando mais próximo do ST1624, porém com nove  
195 polimorfismos distribuídos em três genes (3 - *arcC*; 5 - *tpi*; 1 - *yqiL*) (Figura 1).

196 3.3.1.1 Comparação do MLST com outras ferramentas de tipagem molecular em *S.*  
197 *aureus*

198 Os mesmos isolados deste estudo foram analisados em um trabalho anterior  
199 realizado por Silveira-Filho *et al.* (2014) para avaliar a distribuição clonal de *S. aureus*  
200 utilizando diferentes métodos de tipagem. Os resultados do MLST foram comparados  
201 com os obtidos por estas técnicas. Foi possível observar que o MLST, assim como as

202 outras três ferramentas, permitiu estabelecer uma relação clonal entre isolados obtidos  
203 de diferentes fontes de isolamento (leite, queijo e ordenhadeira), além de permitir  
204 observar a dispersão clonal entre propriedades do mesmo município e entre municípios  
205 diferentes.

206 A análise com a associação das quatro ferramentas de tipagem (PCR-coa, ITS-  
207 PCR, PFGE e MLST) mesmo apresentando um alto índice discriminatório permitiu  
208 observar uma correlação entre isolados obtidos de leite de vaca com mastite e isolados  
209 obtidos de queijo coalho e ordenhadeira. Por outro lado, não foi possível observar a  
210 dispersão clonal entre os diferentes municípios estudados.

211 A associação do MLST, ITS-PCR e PCR-Coa também permitiu observar a  
212 correlação entre isolados obtidos a partir de leite de vaca com mastite e isolados obtidos  
213 a partir de queijo coalho e ordenhadeira, além da dispersão clonal entre os diferentes  
214 municípios. O mesmo resultado foi obtido com a associação das ferramentas MLST e  
215 ITS-PCR, mostrando que a PCR-coa não contribuía para os resultados.

216

## 217 **4. DISCUSSÃO**

### 218 **4.1. Pesquisa dos mecanismos de resistência à meticilina: *mecA* e *mecC***

219 Os 84 isolados estudados (SILVEIRA-FILHO *et al*, 2014) quanto à  
220 suscetibilidade à meticilina, identificou resistência em 31 (37%) isolados. A pesquisa do  
221 gene *mecA* e do seu homólogo, *mecC*, revelou que mesmo os isolados fenotipicamente  
222 resistentes foram negativos para ambos, sugerindo não ser o mecanismo responsável  
223 pela resistência a meticilina nos mesmos. Resultados semelhantes, tanto em isolados  
224 humanos quanto de origem animal, foram observados em outros estudos no Brasil  
225 (MELO *et al*, 2014), na China (LI *et al*, 2015) e na Escócia (BA *et al*, 2014).

226 Embora ainda não estejam claras, algumas hipóteses foram levantadas sobre  
227 possíveis mecanismos de resistência: substituições de aminoácidos encontradas nos  
228 domínios transpeptidase das PBPs 1, 2 e 3 que são alvos da ação de antibióticos  $\beta$ -  
229 lactâmicos (BA *et al*, 2014), polimorfismos de nucleotídeo único em três genes,  
230 especificamente, aqueles que codificam PBP 4 (BANERJEE *et al*, 2010) e diferenças  
231 nucleotídicas pontuais entre os genes *mecA* de origem humana e animal na região de  
232 anelamento do primer *Foward* impedindo sua amplificação quando se utiliza primers  
233 desenvolvidos para humanos em animais (MELO *et al*, 2014).

234

#### 235 **4.2. Investigação dos genes de virulência**

236 A etapa de adesão ao tecido do hospedeiro pelo *S. aureus* é o primeiro evento  
237 crítico no estabelecimento de uma infecção por esse patógeno (LINKE; GOLDMAN,  
238 2011), e alguns fatores de superfície são cruciais para o seu sucesso tanto como  
239 comensal, quanto como agente patogênico (FOSTER *et al*, 2014). Seis fatores de  
240 superfície responsáveis pela adesão ao tecido do hospedeiro investigados, dos quais  
241 cinco apresentaram frequência igual ou superior a 89% independente do município  
242 estudado, mostrando o alto potencial desses isolados em dar início à infecção. O gene  
243 *fnbB*, que só apresentou frequência acima de 50% no município de São Bento do Una, é  
244 responsável por codificar a proteína de ligação à fibronectina, mas também ao  
245 fibrinogênio e à elastina (LINKE; GOLDMAN, 2011), assim como o *fnbA*. A maioria  
246 dos isolados de *S. aureus* carregam ambos os genes, mas não parece haver nenhuma  
247 diferença na atividade de ligação à fibronectina entre as cepas que carregam apenas um  
248 ou os dois genes (GREENE *et al*, 1995), de maneira que a baixa frequência de *fnbB* nos  
249 outros municípios, certamente não compromete a eficiência dos isolados *fnbB* negativos  
250 na adesão ao tecido do hospedeiro, uma vez que apenas o isolado 88A foi negativo para

251 ambos os genes (*fnbA* e *fnbB*), mas positivo para outros dois genes de adesão (*ebpS* -  
252 adesão à elastina, e *sdrC* - adesão à sialoproteína e fibrinogênio).

253         Acredita-se que algumas propriedades do *S. aureus*, como formação de biofilme,  
254 sobrevivência intracelular e expressão capsular, sejam associadas com infecções  
255 crônicas, e geralmente a mastite subclínica (BARDIAU, *et al*, 2016); essas propriedades  
256 favorecem a evasão do sistema imune do hospedeiro. Semelhante ao que foi observado  
257 para os genes com função de adesão, quatro dos cinco genes responsáveis por  
258 mecanismos de evasão apresentaram alta frequência independente do município  
259 analisado (acima de 83%, chegando a 100% para os genes *cap5* e *icaD*. Dessa maneira,  
260 os isolados estudados apresentaram alto potencial também para a etapa de evasão,  
261 mesmo com a baixa frequência encontrada para o gene *cap8*, uma vez que *cap5*  
262 desempenha o mesmo papel e está presente em todos os isolados.

263         Uma vez colonizando o hospedeiro, *S. aureus* secreta várias citotoxinas,  
264 chamadas leucocidinas e hemolisinas, responsáveis pelas lesões observadas durante o  
265 desenvolvimento da infecção (DINGES *et al*, 2000). A frequência dos genes que  
266 codificam as hemolisinas  $\alpha$  (*hla*) e  $\beta$  (*hly*) foi superior a 90% independente do  
267 município estudado. O gene *pvl* apresentou uma frequência de 21%, porém bem variada  
268 entre os municípios. Embora outros trabalhos, como o realizado por Mitra e  
269 colaboradores (2013), também mostre a presença desse gene em isolados obtidos a  
270 partir de leite de vaca com mastite (41,6%), o *pvl* é geralmente associado à doenças em  
271 humanos como pneumonia necrozante (YU *et al*, 2012), sendo incomum em estudos  
272 realizados com isolados de mastite (PRASHANT *et al*, 2011; OTE *et al*, 2011).

273         Como foi observado, genes dos três grupos (adesão, evasão e lesão) foram  
274 identificados em todos os isolados, em sua maioria em uma alta frequência, o que  
275 mostra o grande arsenal e potencial de virulência de que dispõem esses isolados.

276 Diversas combinações desses genes são possíveis mantendo a habilidade de causar  
277 infecção intramamária em vacas. Isso também fica evidente quando comparamos as  
278 frequências desses genes neste e em outros estudos.

279

### 280 **4.3. Genotipagem de *S. aureus***

#### 281 4.3.1 Tipagem de sequência multilocus (MLST)

282 A análise do MLST identificou oito tipos de sequências dentre os 84 isolados,  
283 dos quais quatro foram descritos pela primeira vez neste estudo. Três dos quatro novos  
284 STs ficaram restritos a um único município. É possível que o evento que causou a  
285 mutação seja recente, não permitindo a disseminação e estabelecimento do clone em um  
286 novo município. O ST2988, também novo, foi observado em Gravatá e São Bento do  
287 Una, porém quando se leva em consideração a distância geográfica entre Gravatá, e os  
288 outros municípios estudados, São Bento do Una é o mais próximo, o que poderia  
289 justificar a presença desse ST em propriedades desse município e a ausência nos  
290 demais. O mesmo aconteceu com o ST1624, observado em isolados de São Bento do  
291 Una e Caetés, os mais próximos geograficamente.

292 Na propriedade 2 (Gravatá) foi possível observar cepas de diferentes fontes de  
293 isolamento (queijo e leite) pertencendo ao mesmo perfil genotípico e também de  
294 virulência, o que mostra o risco da contaminação cruzada, provavelmente decorrente  
295 das mãos dos manipuladores, e a possibilidade de dispersão da bactéria para consumo  
296 na preparação do queijo artesanal. O isolado obtido a partir da ordenhadeira também  
297 mostrou correlação com outros isolados obtidos a partir do leite na mesma propriedade  
298 e em propriedades de outros dois municípios (Caetés e Correntes), reforçando o perigo  
299 de contaminação cruzada e possibilidade de dispersão da bactéria para outros animais  
300 no rebanho também na ordenha mecanizada.

301 Caetés foi o município que abrigou o maior número de STs diferentes seguido  
302 dos municípios de São Bento do Una, Correntes e Gravatá. A variabilidade genotípica  
303 em uma propriedade pode ser explicada pelo tipo de sistema de produção adotado pela  
304 mesma; espera-se que isolados obtidos de animais em um sistema semi-intensivo ou  
305 extensivo apresente maior variabilidade de genótipos devido à sua exposição a um  
306 maior número de fontes ambientais (OLIVEIRA *et. al*, 2015). A mesma ideia é válida  
307 quando se considera o tipo de dinâmica de aquisição dos animais pelas propriedades:  
308 uma maior variabilidade é esperada em propriedades que adquirem seus animais de um  
309 maior número de locais.

310 O CC1 (ST1) é comum entre isolados humanos (ARGUDÍN *et. al*, 2011;  
311 LOZANO *et al*, 2013), mesmo assim foi possível observar nesse estudo, isolados de  
312 origem animal com um ST que faz parte desse complexo clonal (ST1). Os CCs 97 e 126  
313 são incomuns entre isolados de humanos, sendo frequentemente observado em isolados  
314 de ruminantes (AIRES-DE-SOUSA *et. al*, 2007; RABELLO *et. al*, 2007; BERGONIER  
315 *et. al*, 2014; KADARIYA *et al*, 2014) sugerindo que os mesmos são reservatórios para  
316 estes CCs. Contudo o ST97, ancestral do CC97, foi encontrado por ANDRADE; LEAL-  
317 BALBINO, (2016) em amostras clínicas, em Pernambuco. O mesmo estudo também  
318 identificou o ST1. É possível observar clones que são comuns a ambos. Esta observação  
319 merece atenção, uma vez que o ordenhador pode atuar como reservatório e ter função na  
320 disseminação desses clones entre os rebanhos, bem como pelo fato de que a ingestão de  
321 leite e queijo coalho contaminados poder carrear bactérias patogênicas e suas toxinas  
322 aos humanos, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública.

323 4.3.2. Comparação do MLST com outras ferramentas de tipagem molecular em *S.*  
324 *aureus*

325 Foram testadas três diferentes associações utilizando-se os resultados do  
326 presente estudo com o MLST e os obtidos por Silveira-Filho *et al*, 2014, com outras três  
327 ferramentas de tipagem (PFGE, ITS-PCR e PCR-coa). A associação das ferramentas  
328 MLST e ITS-PCR pareceu a melhor abordagem para estabelecer a relação clonal entre  
329 os isolados de *S. aureus* de diferentes propriedades leiteiras. O MLST, trouxe mais  
330 robustez às análises visto que trata-se de uma ferramenta que não se baseia apenas no  
331 padrão de bandeamento, mas em sequenciamento, permite uma análise comparativa dos  
332 resultados obtidos em diferentes estudos pelo fato dos STs terem nomenclatura  
333 padronizada mundialmente e facilmente comparável pela internet (saureus.mlst.net),  
334 permite ainda o agrupamento dos STs em CCs tornando mais clara a interação entre os  
335 diferentes STs e, até certo ponto, consegue distinguir isolados de origem humana de  
336 isolados de origem bovina.

337 A associação das ferramentas MLST e ITS-PCR permitiu observar a correlação  
338 entre isolados obtidos a partir de diferentes fontes de isolamento, reforçando a ideia do  
339 perigo da contaminação cruzada e possibilidade de dispersão de bactérias patogênicas e  
340 suas toxinas para consumo humano. Permitiu também identificar a dispersão clonal  
341 entre os diferentes municípios, identificando clones disseminados nos quatro municípios  
342 estudados. A predominância de determinados clones sugere que alguns têm  
343 propriedades que o habilitam a superar as defesas do hospedeiro e estabelecer a infecção  
344 (Silveira-Filho *et al.*, 2014). Embora essa associação tenha concentrado a maioria dos  
345 MRSA (61%), não parece haver relação entre os perfis genotípicos e de resistência  
346 (Tabela 6). Todos os perfis que englobaram isolados MRSA também apresentaram  
347 isolados MSSA, ou representaram um único isolado MRSA, sugerindo que a  
348 resistência, necessariamente, não determina uma maior disseminação (Tabela 6). Esses  
349 resultados corroboram com a ideia de Tenover e colaboradores (1994) de que a

350 utilização de mais de uma técnica para estabelecer relação entre isolados bacterianos  
351 pode ser necessário para aumentar a eficiência e o poder discriminatório das mesmas.

352

## 353 7. REFERÊNCIAS

354 1. Aires-de-Sousa M, Parente CESR, Vieira-da-Mota O, Bonna ICF, Silva DA,  
355 Lencastre H (2007) Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo,  
356 Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil.  
357 Appl. Environ. Microbiol. 73(12): 3845-3849.

358 2. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC (2016) Clonal diversity and  
359 epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-  
360 susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical  
361 isolates in Brazil. BMC Microbiology (Online). 16:2-9.

362 3. Argudín MA, Mendoza MC, Vázquez F, Guerra B, Rodicio MR (2011) Molecular  
363 typing of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from geriatric patients attending a  
364 long-term care Spanish hospital. Journal of Medical Microbiology 60:172–179.

365 4. Ba X, Harrison EM, Edwards GF, Holden MTG, Larsen AR, Petersen A, Skov RL,  
366 Peacock SJ, Parkhill J, Paterson GK and Holmes MA (2014) Novel mutations in  
367 penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are  
368 methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. J Antimicrob  
369 Chemother 69:594-597.

370 5. Bandelt Hj, Forster P, Rohl A (1999). Median-joining networks for inferring  
371 intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. 16: 37 – 48.

372 6. Banerjee R, Gretes M, Harlem C, Basuino L, Chambers HF (2010) A *mecA*-negative  
373 strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level beta-lactam

- 374 resistance contains mutations in three genes. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4900-  
375 4902.
- 376 7. Bardiau M, Caplinb J, Detilleuxc J, Graberd H, Moronie,P, Taminiaug B, Mainila JG  
377 (2016) Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine  
378 mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-  
379 typing. *Veterinary Microbiology*. 185:1-6.
- 380 8. Bergonier D, Sobral D, Feßler AT, Jacquet E , Gilbert FB , Schwarz S , Treilles M,  
381 Bouloc P, Pourcel C, Vergnaud G (2014), *Staphylococcus aureus* from 152 cases of  
382 bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of  
383 tandem repeat analysis (MLVA). *BMC Veterinary Research*, 45:97.
- 384 9. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae I, Stryjewski ME, Federspiel JJ,  
385 Tonthan GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R and Fowler VG Jr (2008) Genotypic  
386 characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of  
387 complicated skin and skin structure infections. *Journal of Clinical Microbiology* 46(2):  
388 678-684.
- 389 10. Cuny C, Layer F, Strommenger, Witte W (2011) Rare occurrence of methicillin-  
390 resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in  
391 Germany *Plos One* 6(9):e24360.
- 392 11. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000). Exotoxins of *Staphylococcus*  
393 *aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 13:16-34.
- 394 12. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus  
395 sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible  
396 clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38:1008-1015.
- 397 13. Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*.  
398 Error probabilities. *Genome res* 8:186-194.

- 399 14. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK 2014, Höök M (2014) Adhesion, invasion  
400 and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*  
401 Nature 12:49-62.
- 402 15. Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM, Júnior WPJ, Stamford TLM, Mota RA,  
403 Sena MJ, Almeida AMP, Balbino VQ, Leal-Balbino TC (2008) Staphylococcal toxin  
404 genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. Pesquisa Veterinária  
405 Brasileira 28: 617-621.
- 406 16. Gordon D, Abajian C, Green P (1998) *Consed*: A graphical tool for sequence  
407 finishing. Genome res 8:195-202.
- 408 17. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ (1995)  
409 Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-  
410 binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. Molecular Microbiology  
411 17(6):1143-1152.
- 412 18. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D (2014) *Staphylococcus aureus* and  
413 Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. BioMed  
414 Research International, 2014.
- 415 19. Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement  
416 in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Res 33:511-518.
- 417 20. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K  
418 (2007) Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*  
419 Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in  
420 Junkyard Regions. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 264-274.
- 421 21. Li L, Zhou, L, Wang L, Xue H, Zhao X (2015) Characterization of methicillin-  
422 resistant and -susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in Northwestern  
423 China. PLoS ONE 10(3):e0116699.

- 424 22. Linke D, Goldman A (eds.) (2011) Bacterial Adhesion, Advances in Experimental  
425 Medicine and Biology 715 7:105-123.
- 426 23. Lozano C, Porres-Osante N, Crettaz J, Rojo-Bezares B, Benito D, Olarte I, Zarazaga  
427 M, Sáenz Y, Torres C (2012) Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in  
428 clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. J Infect  
429 Chemother 19(2):233–242.
- 430 24. Melo DA, Coelho IS, Motta CC, Rojas ACCM, Dubenczuk FC, Coelho SMO,  
431 Souza MMS (2014) Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus*  
432 spp. Brazilian Journal of Microbiology 45(3):1075-1082.
- 433 25. Mitra SD, Velu D, Bhuvana M, Krithiga N, Banerjee A, Shome R, Rahman H,  
434 Ghosh SK, Shome BR (2013) *staphylococcus aureus* mastitis in India. Journal Applied  
435 Microbiology. 144:1604-1615.
- 436 26. Moore PCL, Lindsay JA (2001) Genetic variation among hospital isolates of  
437 methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of  
438 virulence genes. Journal of clinical microbiology 39(8):2760-2767.
- 439 27. Oliveira CJB, Tiao N, Sousa FGC, Moura JFP, Santos-Filho L, Gebreyes WA  
440 (2015) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and  
441 Identification of Novel Sequence Types. Zoonoses and Public Health 63:97-105.
- 442 28. Ote, I.; Taminiou, B.; Duprez, J.; Dizier, I.; Mainil, JG. (2011) Genotypic  
443 characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates  
444 associated with bovine mastitis. Veterinary Microbiology. 153: 285-292.
- 445 29. Prashanth K, Rao KR Reddy PVV, Saranathan R, Makki AR (2011) Genotypic  
446 Characterization of *Staphylococcus aureus* Obtained from Humans and Bovine Mastitis  
447 Samples in India. Journal of Global Infectious Diseases 3:115-122.

- 448 30. Rabello RF, Moreira BM, Lopes RMM, Teixeira LM, Riley LW, Castro ACD  
449 (2007) Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from  
450 cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology*. 56:1505-  
451 1511.
- 452 31. Silveira-Filho VM, Luz IS, Campos APF, Silva WM, Barros MPS, Medeiros ES,  
453 Freitas MFL, Mota RA, Sena MJ, Leal-Balbino TC (2014) Antibiotic resistance and  
454 molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in  
455 northeast Brazil. *Journal of Food Protection* 77(4):583-591.
- 456 32. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G (2003) Use of multiplex  
457 PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesin involved in human hematogenous  
458 infections. *Journal of clinical microbiology* 41:4465-4467.
- 459 33. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS (2003) Phenotypic  
460 and genotypic characterization of bovine mastites isolates of *Staphylococcus aureus* for  
461 biofilm formation. *Veterinary microbiology* 92:179-185.
- 462 34. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview  
463 Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench.  
464 *Bioinformatics* 25(9):1189-1191.  
465

**Tabela 1.** Genes alvo, sequência de *primers* e condições de PCR

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Tamanho (pb)	Desnaturação inicial (C° - tempo)	Desnaturação (C° - tempo)	Anelamento (C° - tempo)	Alongamento (C° - tempo)	Extensão (C° - tempo)	Nº de ciclos	Referência
Fatores de adesão ao tecido do hospedeiro									
<i>clfA</i>	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT CGTTCTCCGTAGTTGCATTTG	292	94°C - 5'	94°C - 1'	55°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 10'	25	Tristan <i>et al</i> (2003)
<i>clfB</i>	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC TTCGCACTGTTTGTGTTGCAC	205	94°C - 5'	94°C - 1'	55°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 10'	25	Tristan <i>et al</i> (2003)
<i>fnbA</i>	CTCAATCATATAACGCAACAGT GTACAGTTTTAGGGTCAATA	702	94°C - 5'	94°C - 30''	48,7°C - 30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>fnbB</i>	GTAACAGCTAATGGTCAATGATACT CAAGTTCGATAGGACTACTATGTTTC	524	94°C - 5'	94°C - 1'	55°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 10'	25	Tristan <i>et al</i> (2003)
<i>ebpS</i>	CACGAGACTATTAAGATGCAGAAA TTATGGAATAACGATTTGTTGACCG	1047	94°C - 5'	94°C - 30''	52,8°C - 30''	72°C - 1'30''	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>sdrC</i>	CAACATTGATTTTTGGGTAAAGTGG GCAAATGCGACTTGTTCAAA	802	94°C - 5'	94°C - 30''	51,3°C - 30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
Fatores de evasão do sistema imune									
<i>spa</i>	TATATCTGGTGGCGTAACAC GTTGAAGTTATTTGTTGCG	229	94°C - 5'	94°C - 30''	49,7°C - 30''	72°C - 30''	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>cap5</i>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CTC GGA TAA CAC CTG TTG	881	94°C - 3'	94°C - 30''	55°C - 30''	72°C - 1'	72°C - 7'	32	Moore e Lindsay (2001)
<i>cap8</i>	ATCGAAGAACATATCCAAGG TTCATACCAATACCTTTTA	834	94°C - 5'	94°C - 30''	46,4°C - 1'30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>icaA</i>	TCAGACACTTGCTGGCGCAGTC TCACGATTCTCTCCCTCTCTGCCATT	936	95°C - 15'	95°C - 1'	60°C - 1'30''	72°C - 1'	72°C - 10'	32	Campbell <i>et al</i> (2008)
<i>icaD</i>	AAACGTAAGAGAGGTGG GGCAATATGATCAAGATAC	381	94°C - 5'	95°C - 45''	49°C - 45''	72°C - 1'	72°C - 7'	30	Vasudevan <i>et al</i> (2003)
Fatores de lesão tecidual									
<i>pvl</i>	TGCCAGACAATGAATTACCCCATTT TCTGCCATATGGTCCCAACCA	894	95°C - 15'	95°C - 1'	60°C - 1'30''	72°C - 1'	72°C - 10'	35	Campbell <i>et al</i> (2008)
<i>hla</i>	TGCCGCAGATTCTGATATTAA TTTCTGAAGAACGATCTGTCCA	845	94°C - 5'	94°C - 30''	51,5°C - 1'30''	72°C - 1'	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)
<i>hly</i>	GCGGTTGTGGATTTCGATAAT GGCTTTGATTGGGTAATGATC	524	94°C - 5'	94°C - 30''	50,9 - 30''	72°C - 30''	72°C - 7'	35	Ote <i>et al</i> (2011)

467 **Tabela 2.** Frequência dos genes com função de adesão por município estudado

Município	<i>ebpS</i> (98%)		<i>clfA</i> (94%)		<i>clfb</i> (94%)		<i>fnbA</i> (99%)		<i>fnbB</i> (46%)		<i>sdrC</i> (94%)	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Gravatá (38 isolados)	37 (97%)	1 (3%)	36 (95%)	2 (5%)	36 (95%)	2 (5%)	37 (97%)	1 (3%)	2 (5%)	36 (95%)	38 (100%)	0 (0%)
São Bento do Una (27 isolados)	26 (96%)	1 (4%)	26 (96%)	1 (4%)	26 (96%)	1 (4%)	27 (100%)	0 (0%)	24 (89%)	3 (11%)	24 (89%)	3 (11%)
Caetés (13 isolados)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	4 (31%)	9 (69%)	13 (100%)	0 (0%)
Correntes (6 isolados)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	2 (33%)	4 (67%)	6 (100%)	0 (0%)
Total	82	2	81	3	81	3	83	1	32	52	81	3

468

469

470 **Tabela 3.** Frequência dos genes com função de evasão por município estudado

Município	<i>spa</i> (98%)		<i>cap5</i> (100%)		<i>cap8</i> (5%)		<i>icaA</i> (94%)		<i>icaD</i> (100%)	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Gravatá (38 isolados)	38 (100%)	0 (0%)	38 (100%)	0 (0%)	2 (5%)	36 (95%)	34 (89%)	4 (11%)	38 (100%)	0 (0%)
São Bento do Una (27 isolados)	26 (96%)	1 (4%)	27 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	27 (100%)	26 (96%)	1 (4%)	27 (100%)	0 (0%)
Caetés (13 isolados)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)
Correntes (6 isolados)	5 (83%)	1 (17%)	6 (100%)	0 (0%)	2 (33%)	4 (67%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
Total	82	2	84	0	4	80	79	5	84	0

471

472

473 **Tabela 4.** Frequência dos genes com função de lesão por município estudado

Município	<i>pvl</i> (21%)		<i>hla</i> (94%)		<i>hly</i> (100%)	
	+	-	+	-	+	-
Gravatá (38 isolados)	4 (10,5%)	34 (89,5%)	35 (92%)	3 (8%)	38 (100%)	0 (0%)
São Bento do Una (27 isolados)	6 (22%)	21 (78%)	25 (93%)	2 (7%)	27 (100%)	0 (0%)
Caetés (13 isolados)	7 (54%)	6 (46%)	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0 (0%)
Correntes (6 isolados)	1 (17%)	5 (83%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
Total	18	66	84	0	79	5

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

**Tabela 5.** Tipos de sequência (STs) observados, suas frequências, local de isolamento e comparação entre os STs fundadores de cada Complexo Clonal e os STs relacionados

CC (Nº isolados)	ST	Nº de isolados (%)	Sequência Alélica <i>arcC/aroE/glpF/gmk/pta/tpi/yqiL</i>	Local de isolamento	Gene (Alelos ≠ entre o ancestral e os outros STs do mesmo CC)	Dif. nucleotídicas/ Posição
CC1 (2 isolados)	<b>ST1</b>	2 (~2,4)	1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1	02 - Correntes	-	-
CC97 (29 isolados)	<b>ST97</b>	25 (~30)	3 / 1 <sup>a</sup> / 1 <sup>b</sup> / 1 / 1 / 5 / 3 <sup>c</sup>	21 - São Bento Una; 02 - Caetés; 02 Correntes	-	-
	ST1624	2 (~2,4)	3 / 1 / 1 / 1 / 1 / 5 / 40 <sup>c</sup>	01 - São Bento Una; 01 - Caetés	<i>yqiL</i> (3 - 40)	G - A/ 192 A - G/ 303 T - C/ 333
	*ST3257	1 (~1)	3 / 1 / 429 <sup>b</sup> / 1 / 1 / 5 / 3	01 - Caetés	<i>glpF</i> (1 - 429)	C - T/ 81
	*ST3258	1 (~1)	3 / 468 <sup>a</sup> / 1 / 1 / 1 / 5 / 3	01 - Correntes	<i>aroE</i> (1 - 468)	A - T/ 57
CC126 (53 isolados)	<b>ST126</b>	21 (~25)	3 <sup>d</sup> / 68 / 1 / 4 / 1 / 5 / 40 <sup>e</sup>	09 - Gravatá; 04 - São Bento Una; 07 - Caetés; 01 - Correntes	-	-
	*ST2987	2 (~2,4)	3 / 68 / 1 / 4 / 1 / 5 / 3 <sup>e</sup>	02 - Caetés	<i>yqiL</i> (40 - 3)	A - G/ 192 G - A/ 303 C - T/ 333
	*ST2988	30 (~36)	330 <sup>d</sup> / 68 / 1 / 4 / 1 / 5 / 40	29 - Gravatá; 01 - São Bento do Una	<i>arcC</i> (3 - 330)	C - T/ 111

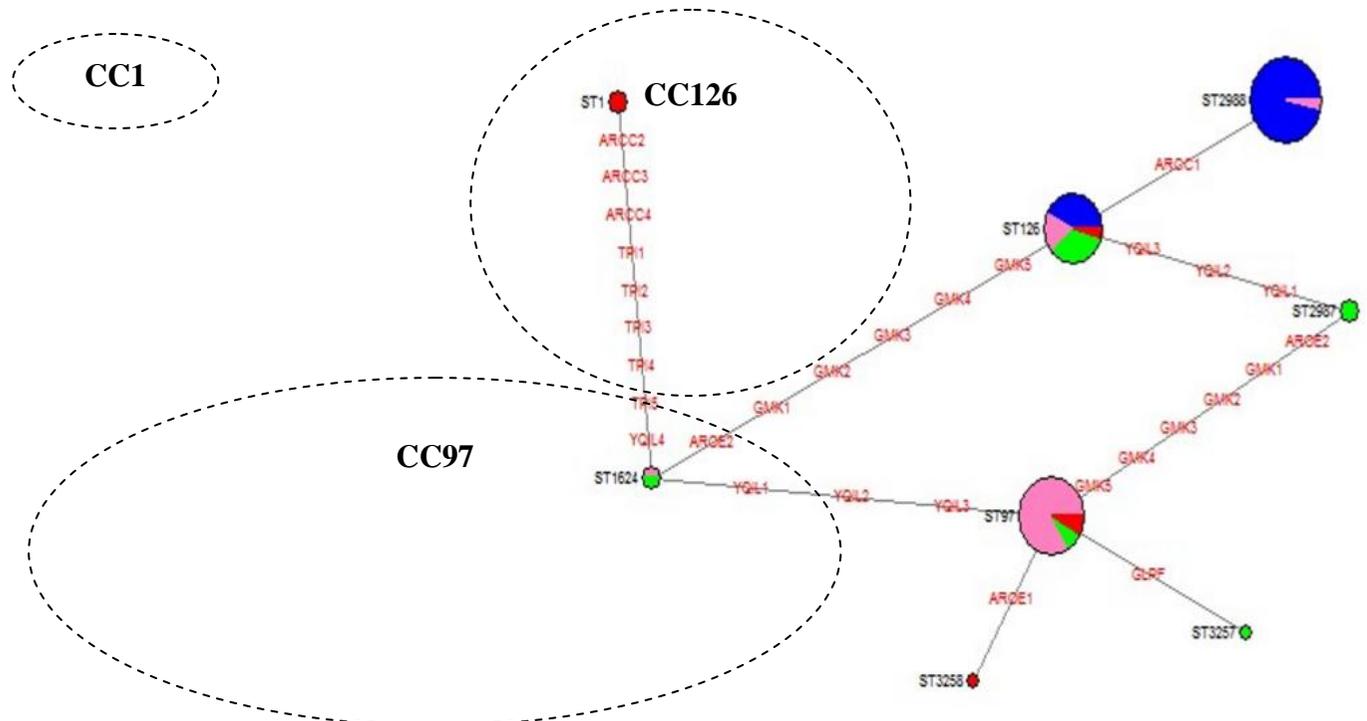
Nota: \*STs descritos pela primeira vez neste estudo. O ST ancestral de cada complexo clonal é o primeiro de cada grupo em negrito e que dá nome ao seu CC. <sup>a, b, c, d</sup> representam a diferença alélica entre os STs.

**Tabela 6.** Dados epidemiológicos, perfis genotípicos (MLST, PFGE, ITS-PCR e PCR-coa) e perfis de virulência (PGV) dos isolados estudados

ISOLADOS (Município)	FONTE DE ISOLAMENTO	PROPRIEDADE (tipo de ord.)	SUSC. À METIC.	MLST (ST/CC)	PFGE (pulsotipo)	ITS-PCR (tipo ITS)	COA (coagulotipo)	<i>Genes de virulência</i>														
								Fatores de adesão						Fatores de evasão					Fatores de lesão		PGV	
								<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>ebpS</i>	<i>sdrC</i>	<i>spa</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>pvl</i>	<i>hla</i>		<i>hly</i>
19A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	G1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV5
20A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
21A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	G1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	PGV8
22A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
25A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
26A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
31A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV2
38A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
40A (Gravatá)	Leite	1 (MEC)	MSSA	126/126	B3	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
51A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B3	R4	Coa1A	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	PGV14
53A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B3	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
57A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
59A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R4	Coa1A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
61A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
62A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B2	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
63A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
70A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B2	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
76A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
81A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
82A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
83A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
84A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
85A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
86A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
87A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
88A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
88A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	J3	R6	Coa1A	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	PGV15
90A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	PGV9

92A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
95A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
96A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
1A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
4A (Gravatá)	Leite	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
99A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
100A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
101A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
102A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
103A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
104A (Gravatá)	Queijo	2 (MAN)	MSSA	#2988/126	I1	R4	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
26B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MRSA	97/97	C2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
14B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MSSA	126/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	PGV11
22B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MSSA	126/126	B1	R1	Coa1A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
27B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MRSA	126/126	C1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
28B (S. B. Una)	Leite	3 (MAN)	MRSA	126/126	E	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
1B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
4B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
5B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
6B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
8B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
9B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MSSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
10B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
11B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
13B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
17B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
18B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
19B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MSSA	97/97	H	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
20B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	PGV7
21B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	PGV7

23B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	B5	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
29B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	J1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
32B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	J1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
34B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	B4	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
35B (S. B. Una)	Ordenhadeira	4 (MEC)	MRSA	97/97	J2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
36B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	97/97	J2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
12B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	1624/97	C1	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
3B (S. B. Una)	Leite	4 (MEC)	MRSA	#2988/126	C1	R10	Coa2	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	PGV13
1C (Caetés)	Leite	5 (MEC)	MSSA	97/97	D3	R7	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
2C (Caetés)	Leite	5 (MEC)	MSSA	3257/97	D3	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
11C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	97/97	D3	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
3C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
4C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A2	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
5C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
6C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R2	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
7C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
8C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
9C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	126/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
12C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	1624/97	D3	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
10C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	#2987/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
13C (Caetés)	Leite	6 (MEC)	MSSA	#2987/126	A1	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV4
1D (Correntes)	Leite	7 (MEC)	MSSA	#3258/97	C3	R7	Coa2	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	PGV10
2D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	1/1	G3	R3	Coa1B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV5
3D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	97/97	G2	R10	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	PGV1
8D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	97/97	G2	R9	Coa2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV3
4D (Correntes)	Leite	8 (MEC)	MSSA	126/126	F	R1	Coa1A	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	PGV6
10D (Correntes)	Leite	9 (MEC)	MSSA	1/1	G3	R3	Coa1B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	PGV5



**Figura 1:** Rede de haplótipos mostrando os oito STs interligados.

Nota: O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos observados no haplótipo a que o círculo se refere. Entre as linhas que ligam dois STs, pode-se observar o número de diferenças entre os mesmos e em quais genes essas diferenças estão presentes.

● Gravata ● São Bento do Una ● Petés ● rentes

## ANEXO D - ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE A TESE: CO-AUTORA



## Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis

M.P.S. Barros<sup>1,2</sup>, V.M. Silveira-Filho<sup>1,2</sup>, R.H.F.B. Lins<sup>1</sup>, M.B.M. Oliveira<sup>3</sup>,  
A.M.P. Almeida<sup>1</sup> and T.C. Leal-Balbino<sup>1,2</sup>

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

## Dynamics of CRISPR Loci in Microevolutionary Process of *Yersinia pestis* Strains



Maria Paloma S. Barros<sup>1\*</sup>, Camila T. França<sup>1</sup>, Rosanny Holanda F. B. Lins<sup>1,2</sup>, Milena Danda V. Santos<sup>3</sup>,  
Ednaldo J. Silva<sup>1</sup>, Maria Betânia M. Oliveira<sup>3</sup>, Vladimir M. Silveira-Filho<sup>4</sup>, Antônio M. Rezende<sup>1</sup>,  
Valdir Q. Balbino<sup>2</sup>, Tereza Cristina Leal-Balbino<sup>1</sup>

## **CURRICULUM VITAE**

**Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins**  
Curriculum Vitae

Setembro/2016

## Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins

### Curriculum Vitae

---

#### Dados pessoais

**Nome** Rosanny Holanda Freitas Benevides Lins  
**Filiação** Raimundo Marques Benevides e Anita Holanda Freitas  
**Nascimento** 25/08/1978 - Quixeramobim/CE - Brasil  
**Carteira de Identidade** 5471215 SDS - PE - 17/03/2012  
**CPF** 009.964.624-22

---

#### Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE E QUEIJO COALHO DO ESTADO DE PERNAMBUCO  
Orientador: Tereza Cristina Leal-Balbino  
Co-orientador: Mariana de Azevedo Andrade  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2011** Mestrado em Mestrado em Saúde Pública.  
Centro Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM\*, Brasil  
Título: Avaliação dos locos CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) em estudos epidemiológicos de cepas de *Yersinia pestis*, Ano de obtenção: 2011  
Orientador: Tereza Cristina Leal Balbino  
Bolsista do(a): Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
- 2002 - 2008** Graduação em Medicina Veterinária.  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil  
Título: Padronização da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) para tipagem molecular de cepas de *Yersinia pestis*  
Orientador: Tereza Cristina Leal Balbino  
Bolsista do(a): Fundação Oswaldo Cruz
- 

#### Prêmios e títulos

- 2015** Menção Honrosa, Programa de Pós Graduação Da Universidade Federal de Pernambuco
- 

#### Produção

##### Produção bibliográfica

##### Artigos completos publicados em periódicos

1. BARROS, M.P.S.; SILVEIRA-FILHO, V.M.; **LINS, R.H.F.B.**; OLIVEIRA, M.B.M.; ALMEIDA, A.M.P.; LEAL-BALBINO, T.C.  
Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Genetics and Molecular Research*, v.12, p.1294 - 1302, 2013.

## Eventos

### Eventos

#### Participação em eventos

1. **V Jornada de pós-graduação em genética da UFPE**, 2015. (Outra)  
Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo coalho no Estado de Pernambuco..
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Jornada de pós-graduação em genética da UFPE**, 2013. (Outra)  
Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de leite e produtos derivados no Estado de Pernambuco..
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Jornada de pós-graduação em genética da UFPE**, 2012. (Outra)  
Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de leite e produto derivados no Estado de Pernambuco..

## Bancas

### Bancas

#### Participação em banca de trabalhos de conclusão

#### Graduação

1. BALBINO, Tereza Cristina Leal; REIS, C. R. S.; **LINS, R.H.F.B.**  
Participação em banca de Emanuelle Cordeiro Azevedo Souza. **Investigação molecular de fatores de virulência em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus***, 2015  
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco