

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM  
RELAÇÃO À RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE  
ESTIRPES ISOLADAS DE LEITE BOVINO MASTÍTICO**

**Mylena Karoline Valmorbida  
Médica Veterinária**

**2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM  
RELAÇÃO À RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE  
ESTIRPES ISOLADAS DE LEITE BOVINO MASTÍTICO**

**Discente: Mylena Karoline Valmorbida  
Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila  
Co-Orientadora: Dra. Marita Vedovelli Cardozo**

**Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias – Unesp, Câmpus de  
Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Microbiologia  
Agropecuária.**

V196c

Valmorbida, Mylena Karoline

Caracterização de *Staphylococcus aureus* em relação à resistência e virulência de estirpes isoladas de leite bovino mastítico / Mylena Karoline Valmorbida. -- Jaboticabal, 2021

43 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Fernando Antônio de Ávila

Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Microbiologia. 2. Mastite bovina. 3. *Staphylococcus aureus*. I.  
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

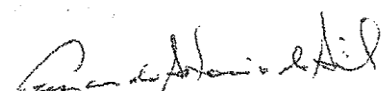
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM RELAÇÃO À RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE ESTIRPES ISOLADAS DE LEITE BOVINO MASTÍTICO

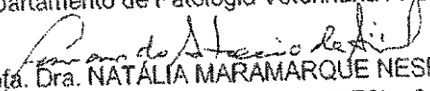
AUTORA: MYLENA KAROLINE VALMORBIDA

ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

P/   
Profa. Dra. NATÁLIA MARAMARQUE NESPOLO (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Sergipe (UFS) - Campus Sertão / Nossa Senhora da Glória/SE

7/   
Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI (Participação Virtual)  
Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP

Jaboticabal, 18 de fevereiro de 2021

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MYLENA KAROLINE VALMORBIDA** – nascida no dia 4 de novembro de 1996, natural de Chapecó – Santa Catarina. Iniciou o curso de Medicina Veterinária no ano de 2014, no Instituto Federal Catarinense – Câmpus Concórdia, concluiu o curso em dezembro de 2018. Em março de 2019, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV– UNESP), concluindo em fevereiro de 2021.

## EPÍGRAFE

“A recompensa que se ganha da realização de um trabalho são as experiências, os conhecimentos que adquirimos e a sensação de ter contribuído para alguma mudança.” Sânia T. Costa

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Corte pela realização da técnica de MALDI-TOF.

Ao Instituto Federal Catarinense – Câmpus Concórdia, em especial à equipe do Laboratório de Microbiologia Veterinária (LMV) por ter cedido as estirpes para a realização das análises.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Ávila por todos os ensinamentos e orientação durante esse período.

À minha co-orientadora Dra. Marita Vedovelli Cardozo pela enorme ajuda desde o projeto de Mestrado, sempre disposta a ajudar em tudo o que fosse necessário.

Aos meus colegas de laboratório, Natália, Camila, Mareliza, Mariana, Lucas e Gabriel por todo auxílio e apoio oferecido durante todo o trabalho.

A todos os funcionários, alunos e professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária por toda dedicação e amparo para quando fosse necessário.

À cidade de Jaboticabal por ter me acolhido durante esses dois anos de Mestrado.

À minha família e namorado por todo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho que exigiu horas de dedicação.

Obrigada!

## SUMÁRIO

|                                                                     | Página |
|---------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO.....                                                         | ii     |
| ABSTRACT .....                                                      | iii    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                 | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                      | 2      |
| 2.1 Mastite .....                                                   | 2      |
| 2.2 <i>Saphylococcus aureus</i> .....                               | 3      |
| 2.3 Hemolisinas .....                                               | 4      |
| 2.4 Enterotoxinas .....                                             | 5      |
| 2.5 Toxinas da Síndrome do Choque Tóxico .....                      | 6      |
| 2.6 Coagulase .....                                                 | 6      |
| 2.7 Resistência aos antimicrobianos.....                            | 7      |
| 3. OBJETIVOS .....                                                  | 8      |
| 3.1 Geral .....                                                     | 8      |
| 3.2 Específicos .....                                               | 9      |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                                         | 10     |
| 4.1 População analisada .....                                       | 10     |
| 4.2 Extração de DNA bacteriano .....                                | 10     |
| 4.3 Coagulase livre em tubo .....                                   | 11     |
| 4.4 Técnica de PCR.....                                             | 11     |
| 4.5 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....                | 13     |
| 4.6 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos (Antibiograma)..... | 14     |
| 4.7 MALDITOF- MS .....                                              | 14     |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                      | 15     |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                 | 24     |
| 7. REFERÊNCIAS.....                                                 | 25     |

## CARACTERIZAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM RELAÇÃO À RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE ESTIRPES ISOLADAS DE LEITE BOVINO MASTÍTICO

**RESUMO** - A mastite é umas das mais importantes enfermidades que acometem a bovinocultura leiteira e pode ser causada por diferentes patógenos amplamente difundidos, sendo que o mais importante deles é a bactéria *Staphylococcus aureus*. O *S. aureus* possui diferentes mecanismos para conseguir sobreviver no organismo dos animais infectados, dentre eles, diversos fatores de virulência e de resistência, produzidos respectivamente, para tentar evoluir o processo infeccioso e resistir aos diferentes princípios ativos de antimicrobianos utilizados numa tentativa de tratamento. Mediante essas informações os principais objetivos deste trabalho foram pesquisar genes de virulência e resistência a antimicrobianos de 65 estirpes de *S. aureus* de amostras de leite mastítico provenientes da cidade de Concórdia - Santa Catarina, assim como caracterizar a similaridade genética entre as estirpes. Essas estirpes inicialmente foram testadas quanto à presença da coagulase livre e logo depois foram submetidas à PCR para confirmação do gênero bacteriano, pela presença do gene *tstA*, e confirmação da espécie, pela pesquisa do gene *cydB*. Para a confirmação final da espécie bacteriana foi realizada a técnica de MALDI-TOF. Pesquisou-se os genes de virulência relacionados ao choque tóxico (*tsst-1*), enzima coagulase (*coa*) e enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*). Posteriormente, foram pesquisados genes de resistência aos antimicrobianos, como os genes de resistência a aminoglicosídeos (*mecA*), a betalactâmicos (*blaZ*), a tetraciclina (*tet*) e o gene da resistência à eritromicina (*ery*). A caracterização da resistência fenotípica, foi realizado o Teste de Susceptibilidade aos antimicrobianos (Antibiograma). A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) foi realizada para investigação da similaridade genética das estirpes. Neste trabalho, 88% dos isolados amplificaram o gene *cydB* e o gene *coa* apresentou 93,84% de amplificação. Cinco das oito enterotoxinas pesquisadas foram amplificadas, sendo elas: *sec* 3,07%, *seg* 6,15%, *see* 7,69%, *seh* 23,07% e *sei* 53,84%. Esses achados reforçam o alarme sobre as intoxicações alimentares que possuem alta prevalência nos seres humanos. As estirpes apresentaram alto grau de resistência no teste de antibiograma, sendo a Penicilina e a Tetraciclina com os maiores índices de resistência apresentados. Porém, na pesquisa dos genes de resistência relacionados, foi observada baixa frequência desses genes. Os isolados também apresentaram alto grau de variabilidade genética quando analisado o teste de PFGE. Os resultados obtidos são fundamentais para mostrar a importância desse agente no sistema produtivo leiteiro que possui alta prevalência, causando graves prejuízos. Fato que alerta sobre a tomada das devidas medidas de controle e prevenção da doença.

**Palavras-chave:** Mastite, PFGE, produção leiteira, resistência, toxinas.

## CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN RELATION TO THE RESISTANCE AND VIRULENCE OF STRAINS ISOLATED FROM BOVINE MILK

**ABSTRACT** - Mastitis is one of the most important diseases that affect dairy cattle and can be caused by different pathogens that are widespread, the most important of which is the bacterium *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* has different mechanisms to survive in the organism of infected animals, among them, several virulence and resistance factors, produced respectively, to try to evolve the infectious process and resist the different active principles of antimicrobials used in an attempted treatment. Based on this information, the main objectives of this work were to search for virulence and resistance genes of 65 strains of *S. aureus* from mastitic milk samples from the city of Concórdia - Santa Catarina, as well to characterize the genetic similarity between the strains. These strains were initially tested for the presence of free coagulase and afterwards they underwent PCR to confirm the bacterial genus, through the presence of the *tstA* gene, and to confirm the species, through the *cydB* gene search. For the final confirmation of the bacterial species, the MALDI-TOF technique was made. Then, virulence genes related to toxic shock (*tsst-1*), coagulase enzyme (*coa*) and enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sec*, *sem*, *seh*, *sej*) were investigated. After that, antimicrobial resistance genes such as the aminoglycoside resistance gene (*mecA*), beta-lactam (*blaZ*), tetracycline (*tet*) and the erythromycin resistance gene (*ery*) were investigated. And for the characterization of phenotypic resistance, the Antimicrobial Susceptibility Test (Antibiogram) was performed. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) was performed to investigate the genetic similarity of these strains. In this study, 88% of the isolates amplified the *cydB* gene and the *coa* gene showed 93.84% amplification. Five of eight enterotoxins surveyed were amplified, namely: *sec* 3.07%, *seg* 6.15%, *see* 7.69%, *seh* 23.07% and *sei* 53.84%. These findings reinforce the alarm about food poisoning that has a high prevalence in humans. The strains showed a high degree of resistance in the antibiogram test, with Penicillin and Tetracycline having the highest levels of resistance. However, in the search for resistance genes, the frequency of these related genes was observed. Strains also showed a high degree of genetic variability when analyzing the PFGE test. The results obtained are fundamental to show the importance of this agent in the dairy production system, which has a high prevalence, causing serious losses. Fact that warns about taking appropriate measures to control and prevent the disease.

**Key words:** dairy production, mastitis, PFGE, resistance, toxins.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção leiteira no Brasil vem crescendo desde 1974 até os dias atuais, comprovando o grande avanço que esse setor agropecuário obteve no país (Maia et al., 2013). De acordo com a Pesquisa Trimestral do Leite (IBGE, 2020), no primeiro trimestre de 2020 foram produzidos mais de 6 mil litros de leite cru, demonstrando grande aumento na produção trimestral em comparação com anos anteriores. Entretanto, algumas enfermidades podem acarretar sérios prejuízos para a cadeia produtiva do leite levando a diminuição na produção de leite, tendo a mastite como uma das doenças mais recorrentes.

A mastite é uma das doenças que mais causa prejuízos na pecuária leiteira, ocasionando decréscimo da produção, descarte do leite, gastos com medicamentos, redução da qualidade do produto, reposição de fêmeas e aumento da mão-de-obra (Megid et al, 2016). A bactéria da espécie *Staphylococcus aureus* é responsável por cerca de 40% dos casos de mastite em todo o mundo (Tenhagen et al., 2006), além de ser o agente que mais gera danos ao animal, devido aos seus fatores de virulência (Dias et al., 2011). Fatores de virulência, como as hemolisinas, toxinas esfoliativas, enterotoxinas, toxinas da síndrome do choque tóxico e a coagulase, dificultam o tratamento e o controle dos *S.aureus* nos rebanhos acometidos (Megid et al, 2016; Luo et al., 2018).

Sobre as toxinas produzidas pelo *S. aureus*, as hemolisinas são de grande importância, pois apresentam alta patogenicidade, sendo que a alfa-hemolisina é uma das mais importantes desse grupo, capaz de destruir células como os eritrócitos, células endoteliais e células de defesa como os linfócitos T e B (Duan et al., 2018). As enterotoxinas são as principais causadoras de intoxicações alimentares em seres humanos e os principais sintomas causados são vômito, diarreia, dor de cabeça, cólicas abdominais e prostração (Dias et al., 2011). Segundo Vitale et al., (2017), são conhecidas até hoje mais de 20 enterotoxinas produzidas por cepas de *S.aureus*.

Ainda, as toxinas da síndrome do choque tóxico produzem sinais clínicos como hipotensão, febre, erupção cutânea e depois de uma ou duas semanas de infecção

causa descamação da pele (Tam; Torres, 2019). Já a coagulase é um dos principais fatores de virulência produzidos por *S.aureus*, causando coagulação do plasma sanguíneo do hospedeiro. Os *S.aureus* que produzem a coagulase são em sua maioria os causadores de mastite bovina no mundo inteiro (Javid et al., 2018).

Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, as cepas de *S. aureus* ao longo dos anos foram desenvolvendo mecanismos para sobreviver com a presença desses agentes químicos. Um exemplo dessa resistência adquirida são os *S.aureus* resistentes à metilina (MRSA) e também à vancomicina (VRSA). Esses mecanismos não são muito conhecidos nessa espécie, entretanto, não são os únicos, pois existem diversos outros tipos de resistência que conferem insensibilidade a várias classes de antimicrobianos. A característica de apresentar resistência pode ser transferida das estirpes que acometem os animais as que acometem os humanos, acarretando um grande problema de saúde pública (Dan et al., 2018).

A ingestão de alimentos contaminados com *S.aureus*, pode causar intoxicação provocando sintomas como vômito, diarreia e inapetência (Käppeli et al., 2019). Sendo assim, é de extrema relevância o estudo das cepas de *S.aureus*, isoladas de casos de mastite bovina, provenientes da cidade de Concórdia – Santa Catarina, Brasil, com o propósito de caracterizar as estirpes isoladas, avaliar a sua similaridade genética, por meio da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), bem como determinar os antimicrobianos mais eficazes para futuros tratamentos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Mastite**

A mastite é caracterizada por inflamação da glândula mamária, podendo ocorrer em inúmeras espécies de animais, porém na espécie bovina essa enfermidade se manifesta na sua forma mais agressiva e resulta nos principais prejuízos que irão se alastrar em toda a cadeia produtiva leiteira (Fursova et al., 2020).

Um dos principais prejuízos ao animal é relacionado a diminuição dos índices de bem-estar devido ao desconforto pelas fortes dores provocadas no teto e no úbere, que acarretarão diminuição do apetite, aumento de gastos com medicamentos para o tratamento, além de gastos com mudanças de manejo. Todos esses fatores resultarão na redução da produção de leite (Gabli et al., 2019).

Geralmente as mastites causadas por bactérias da espécie *S.aureus* são as chamadas mastites subclínicas. Neste tipo de mastite, não são observadas alterações aparentes no animal, ou seja, os sinais clínicos não são perceptíveis, porém existem testes que são capazes de avaliar e detectar a presença deste tipo de mastite, como o teste California mastitis test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite. Os dois testes mensuram a quantidade de células de defesa presentes no leite, podendo indicar a presença de um processo inflamatório na glândula mamária. Ambos precisam ser realizados juntamente com outros testes mais sensíveis e específicos como o teste microbiológico ou testes moleculares, para obtenção do diagnóstico e realização do tratamento correto (Paterna et al., 2014).

O leite mastítico não pode ser consumido, este representa risco de intoxicações, podendo trazer gastroenterites, febre, choque septicêmico e morte. É devido a esse fator a grande preocupação com essa enfermidade que afeta grande parte dos animais destinados a produção leiteira mundial (Gabli et al., 2019).

## **2.2 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* são bactérias comensais oportunistas do corpo humano e animal, ou seja, vivem sem causar danos ao organismo hospedeiro, habitam a pele e mucosas, entretanto em casos de diminuição do sistema imune ou lesões, estas bactérias podem adentrar a corrente sanguínea e causar infecções generalizadas levando a sepse, (Hardy et al., 2019; Fursova et al., 2020). A bacteremia causada por *S.aureus* possui altas taxas de mortalidade, sendo de 11 a 43% (Otto; Deleo; Diep, 2009), demonstrando grande importância o conhecimento sobre suas características de patogenicidade e virulência.

As cepas de *S.aureus* causadoras de mastite bovina geralmente estão distribuídas na microbiota da pele dos animais, assim como na microbiota da pele dos ordenhadores, que estão em contato direto com os animais. Diante dessas informações, sabe-se que a principal forma de dispersão dessas bactérias é durante o processo de ordenha, podendo causar as conhecidas mastites crônicas, que irão perdurar por toda a vida produtiva do animal. A mastite crônica caracteriza o pior tipo de mastite apresentada pelo animal, pois é refratária aos diversos tipos de tratamentos e a única forma de eliminar a doença é com o descarte do animal acometido (Naushad et al., 2020).

As mastites causadas por *S.aureus* são as mastites com menores índices de cura do animal infectado, justamente devido aos inúmeros fatores de virulência e resistência associados a esse agente (Javid et al., 2018).

Os fatores de virulência produzidos pelos *S.aureus* são os principais fatores associados à patogenicidade e à facilidade de evasão do sistema imune do hospedeiro infectado, prolongando e dificultando o tratamento da doença (Katsarou et al., 2019). Esses fatores de virulência podem ser descritos como toxinas produzidas pelos *S.aureus* no momento de invasão no hospedeiro, tendo como principais exemplares as hemolisinas, as enterotoxinas, as toxinas da Síndrome do Choque Tóxico e a enzima coagulase (Monistero et al., 2020). Esses fatores de virulência irão facilitar a invasão do micro-organismo no hospedeiro agravando o processo de infecção (Otto, 2014).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* e principalmente da espécie *Staphylococcus aureus* são também, as principais causadoras de doenças veiculadas por alimentos ao redor do mundo, essas ocorrências estão geralmente associadas a surtos da doença, caracterizando as intoxicações alimentares (Deng et al., 2019). Os alimentos envolvidos nas intoxicações são contaminados geralmente durante o processo de manipulação e preparo do alimento sem a correta higienização das mãos por manipuladores de alimentos.

## 2.3 Hemolisinas

As hemolisinas são toxinas citolíticas secretadas no momento da invasão da bactéria no hospedeiro. São capazes de produzir poros na membrana das células

hospedeiras e de destruir células, como hemácias, células endoteliais e células de defesa. Podem ser do tipo alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) ou delta ( $\delta$ ) (Burnside et al., 2010). As hemolisinas assim como os demais fatores de virulência produzidos são mecanismos utilizados para a bactéria invadir o organismo hospedeiro, visto que a beta-hemolisina age nas células ricas em lipídios, fato que facilita a entrada e a aderência bacteriana nas células epiteliais presentes na glândula mamária do animal (Berube; Wardenburg, 2013; (Magro et al., 2017).

## 2.4 Enterotoxinas

As enterotoxinas são toxinas secretadas pelas estirpes de *S.aureus* dentro do organismo do hospedeiro e correspondem a um dos fatores de virulência mais importantes produzidos pelos *S.aureus*, visto que são as principais causadoras das famosas intoxicações alimentares. A intoxicação alimentar, na maior parte dos casos apresenta-se na forma autolimitante e causa sintomas como vômito, diarreia e prostração, e pode se tornar grave em pessoas imunodeprimidas, idosos e crianças. A ingestão de alimentos derivados do leite contaminados por *S.aureus* são os grandes vilões desse tipo de intoxicação alimentar (Argudín; Mendoza; Rodicio, 2010). A enterotoxina A é a mais prevalente encontrada nas cepas de *S.aureus* (Saidi et al., 2019). Os sintomas provocados foram observados apenas em humanos e primatas. As enterotoxinas A (sea) e E (see) são sintetizadas durante a fase logarítmica do crescimento bacteriano, já a B (seb), C (sec) e E (see) são produzidas no final da fase estacionária (Micusan e Thibodeau, 1993; Derzelle et al., 2009).

A contaminação dos *S.aureus* produtores de enterotoxinas pode ocorrer durante a manipulação de alimentos, através de secreções nasais de pessoas infectadas, ou ainda através da ingestão de leite materno contaminado pela bactéria (Argudín et al., 2010).

*S.aureus* são destruídos pela ação do calor e alterações de pH, entretanto suas enzimas produzidas, como é o caso das enterotoxinas, sobrevivem perante esses processos e permanecem viáveis no alimento. Outra característica das enterotoxinas é

que elas agem no hospedeiro como superantígenos, estimulam os linfócitos T e a liberação de grande quantidade de citocinas, causando inflamação grave (Magro et al., 2017).

## 2.5 Toxinas da Síndrome do Choque Tóxico

As toxinas causadoras da Síndrome do Choque Tóxico são sintetizadas pela expressão do gene *tsst*, presente em algumas cepas de *Staphylococcus aureus*. Pode gerar sintomas como febre, erupção cutânea, descamação e em casos graves necrose da pele. Essa toxina está associada a infecções de pele, tecidos moles e em casos raros em afecções no trato respiratório. Pode estar associada a casos de complicações em cirurgias e demais procedimentos de pele e sistema respiratório (Sharma et al., 2019).

A ocorrência da Síndrome do Choque Tóxico é rara, porém, quando ocorre, pode ser grave. Inicialmente à infecção, ocorre proliferação exacerbada de estirpes de *S.aureus* produtoras de toxina e após a instalação no local, começa a produção de toxinas. Essas bactérias podem atravessar a pele e entrar na corrente sanguínea, onde irão se ligar com linfócitos do tipo T (Pierson et al., 2018).

Uma maneira de evitar a infecção por estirpes de *S.aureus* produtoras desse tipo de enzima é mantendo uma microbiota competitiva nos locais onde geralmente ocorrem as infecções, assim impedindo a aderência bacteriana ao epitélio da pele, bloqueando o processo de infecção (Sharma et al., 2019).

## 2.6 Coagulase

A enzima coagulase é utilizada para diferenciar *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus* coagulase negativos, que são conhecidos como menos patogênicos (Vanassche et al., 2010). Essa enzima é produzida pelas cepas de *S.aureus* e promovem a coagulação do plasma sanguíneo, possuem ação similar à ocorrida na cascata de coagulação. Age ligando-se à protrombina presente no plasma sanguíneo, que em seguida é convertida a trombina que irá converter o fibrinogênio em fibrina, resultando

no coágulo sanguíneo. Esse coágulo formado serve como proteção do processo de fagocitose, evadindo o sistema imune, podendo causar a formação de abscessos (Otto, 2014). Os coágulos formados por *S.aureus* poderão virar trombos sépticos que ocasionalmente irão se alojar nas valvas cardíacas gerando um quadro de endocardite bacteriana e em casos graves pode levar o animal a óbito (Farkas et al., 2019).

A enzima coagulase é conhecida como um fator de virulência potente e os *S.aureus* produtores dessa enzima são os principais agentes relacionados aos casos de intoxicação alimentar em humanos. A presença dessa enzima é utilizada como principal indicativo dessa espécie bacteriana (De Fátima et al., 2006).

## **2.7 Resistência aos antimicrobianos**

Umas das principais causas conhecidas de falhas no tratamento da mastite bovina e de inúmeras doenças infecciosas é a resistência antimicrobiana (Barkema et al., 2006; Naushad et al., 2020). Sabe-se que a escolha do antimicrobiano ideal para o tratamento deve ser respaldada em testes de susceptibilidade a antimicrobianos, por meio do método de disco difusão que é essencial para saber qual antimicrobiano é realmente eficaz para tratar determinado caso de mastite. Pode ser realizado paralelamente às análises moleculares para pesquisa de genes associados à resistência a diferentes classes de antimicrobianos, principalmente os genes associados à resistência aos beta-lactâmicos que são amplamente utilizados no tratamento da mastite bovina (Monistero et al., 2020). Dessa forma, identificam-se os antimicrobianos efetivos para realizar o tratamento do animal, evitando gastos excessivos com tratamentos refratários (Naushad et al., 2020).

Os primeiros *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos foram registrados no ano de 1940, onde essa espécie começou a apresentar resistência frente à penicilina. E, como tentativa de solucionar o problema dessa resistência criou-se um novo antimicrobiano derivado da penicilina, a meticilina, porém um ano após a sua criação, algumas cepas de *Staphylococcus aureus* já apresentaram sinais de resistência em tratamentos realizados com esse princípio ativo, sendo posteriormente conhecido como *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) (Tahmasebi et al., 2019). Esse fato demonstrou que as bactérias possuem a capacidade de desenvolver

mecanismos para evadir ao tratamento e criam barreiras para sobreviver e se tornarem cada vez mais fortes frente os princípios ativos de antimicrobiano.

Outro mecanismo utilizado por *S.aureus* para evadir o sistema imune e a tentativa de tratamento com antimicrobianos, é a formação de biofilmes, onde as células bacterianas se unem em diversas camadas protegidas por lipopeptídeos, ficando seguras da ação dos princípios ativos. A estrutura presente mais conhecida que atua favorecendo a formação dos biofilmes é a adesina que facilita a ligação entre os *S.aureus*, deixando-os agregados uns aos outros (Otto; 2009.) *S.aureus* são capazes de sobreviver dentro de neutrófilos induzindo a formação de microabscessos, caracterizando forte resistência ao tratamento, protegendo a bactéria da ação do antimicrobiano, essa atividade de formação dos microabscessos é comumente associado a casos de mastite crônica, que raramente respondem aos tratamentos instituídos (Barkema et al., 2006).

A tarefa de encontrar antimicrobianos ideais para o tratamento tem se tornado árdua. É necessário encontrar ativos que combatam de forma eficaz as infecções bacterianas, principalmente as causadas pela espécie *Staphylococcus aureus*. Segundo Otto, (2014) cepas de MRSA causam mais mortes fatais por ano, nos Estados Unidos do que o vírus do HIV.

O uso desenfreado de antimicrobianos sem critérios de escolha, resulta nas falhas de tratamento, na produção de mecanismos de resistência e no agravamento da doença, visto que, a infecção não foi tratada com o medicamento realmente efetivo, prolongando o estado de doença do animal (Monistero et al., 2020).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Pesquisar genes de virulência e resistência a antimicrobianos em estirpes de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite bovino mastítico, provenientes da cidade de Concórdia – Santa Catarina.

### 3.2 Específicos

- Detectar a presença da enzima coagulase por meio do teste da coagulase livre em tubo;
- Confirmar a identificação do gênero *Staphylococcus* pela presença do gene *tstA*;
- Confirmar a identificação de *S. aureus* pelo gene *cydA*;
- Confirmação final da espécie bacteriana por meio da técnica de MALDI-TOF;
- Detectar produção de enterotoxinas pelos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* e *sej*;
- Detectar presença de toxinas da síndrome choque tóxico por meio do gene *tsst-1*;
- Detectar presença de enzima coagulase por meio da presença do gene *coa* e do teste da Coagulase Livre em Tubo;
- Detectar resistência aos aminoglicosídeos pela presença dos genes *mecA* e *gen*;
- Detectar resistência aos betalactâmicos pela presença do gene *blaZ*;
- Detectar resistência à tetraciclina pela presença do gene *tet*;
- Detectar resistência à eritromicina pela presença do gene *ery*.
- Detectar a resistência fenotípica por meio do Teste de Susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA);
- Realizar Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) para caracterizar a similaridade genética dessas estirpes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 População analisada

Foram utilizadas 65 isolados de leite provenientes da região do Sul do Brasil, Concórdia-SC, colhidas no período de 2016 a início de 2019, recebidas no laboratório de Microbiologia Veterinária, do Instituto Federal Catarinense – Câmpus Concórdia. Essas amostras, previamente identificadas foram semeadas em ágar-sangue ovino a 5% desfibrinado e, em seguida para identificação fez-se a realização de testes específicos como o teste da catalase, teste da coagulase conjugada (lâmina), semeadura em ágar sal-manitol e uma série de açúcares específicos até se sugerir a espécie *Staphylococcus aureus*. Os isolados, foram congelados em tubos “eppendorfs” contendo caldo BHI acrescido de glicerol a 1% e armazenados em freezer a -20°C. Esses isolados congelados foram trazidos para a Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus Jaboticabal, para dar continuidade às identificações e realização dos procedimentos descritos a seguir.

### 4.2 Extração de DNA bacteriano

Para a extração de DNA, inicialmente foi preparado um inóculo em caldo BHI para crescimento bacteriano, para então realizar a extração do DNA bacteriano através do método de Kuramae-Izioka (1997) com modificações. Um mL da cultura bacteriana foi transferida para microtubos de 2mL, centrifugados a 13.400 rpm por 2 minutos e o pellet de células foi ressuspendido em 700µL de tampão de extração [160mM Tris-HCL pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 20mM NaCl e SDS 0.5% (p/v)]. A suspensão de células foi homogeneizada através de agitação e incubada em banho de água a 65°C por 40 minutos e agitada a cada 10 minutos. Em seguida, 300µL de acetato de potássio 5M foi

adicionado e a solução homogeneizada e incubada em gelo por 30min com inversões a cada 15 minutos. Após essa incubação, as amostras foram retiradas do gelo e 650 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isomálico [24:1 (v/v)] foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 13.400 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 1000µL de etanol absoluto refrigerado. A mistura de etanol e sobrenadante foi misturada por inversão e acondicionada a -20°C “overnight”. Em seguida, foi centrifugada a 13.400 rpm por 10 min a 10°C. Os “pellets” de DNA resultante foram secos em temperatura ambiente por 30 min e ressuspensos em 30µL de Tampão TE (10µM Tris-HCl, pH 7.3, 0.1 µM EDTA).

#### **4.3 Coagulase livre em tubo**

Para a realização do teste da coagulase livre em tubo, foi utilizado o kit comercial Coagu-Plasma (Laborclin, Pinhais, Brasil). As amostras foram previamente semeadas em ágar sangue bovino a 5% desfibrinado e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, realizou-se a diluição do plasma de coelho liofilizado acrescentando 3mL de solução fisiológica a 0,85% e então pipetou-se 500µL do plasma diluído em tubos de ensaio e emulsionou-se de 3 a 4 colônias bacterianas em cada tubo, sendo utilizada a estirpe *S.aureus* ATCC 25293 como controle positivo da reação e *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo. Os tubos correspondentes a cada amostra foram incubados em banho-maria a 37°C por 24 horas, sendo que as primeiras 4 horas foram observadas cuidadosamente, pois algumas estirpes de *S. aureus* coagulam o plasma de coelho nas primeiras 4 horas do teste.

#### **4.4 Técnica de PCR**

Para realização da técnica, uma alíquota de DNA (2µL) foi acrescentada à mistura contendo 0,4 µL de dNTP (10 mM), 2µL de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40), 0,8 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µL de cada “primer” 10 pM, e uma unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas, Europe). Água MilliQ foi adicionada até completar o volume total de 20µL. Os ciclos consistiam em um estágio inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos, cada um contendo desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento a 55°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 30 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 7 minutos.

Após cada PCR, foi acrescentado 5µL de corante de front (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) no produto da reação e foi aplicado marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, EUA) em um gel de agarose a 1,5% contendo SYBR safe (Thermo Fisher Scientific) (1 µg/mL) em tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) e separados por eletroforese (70V/1h). Os produtos de amplificação foram visualizados por exposição do gel em luz UV e fotografado.

Na tabela abaixo está a descrição dos genes pesquisados através da técnica de PCR.

**Tabela 1:** Lista de “primers” e condições utilizadas na PCR.

| Gene          | Sequência de nucleotídeos<br>(5'- 3')                        | Tamanho<br>(pb) | Referência                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| <i>tstag</i>  | F GGCCGTCTTGAACGTGGTCAAATCA<br>R TIACCATTTTCAGTACCTTCTGGTA   | 370             | (Martineau et al., 1998)          |
| <i>cydB</i>   | F CCCATTTGCTTGGTCTGTAGTA<br>R GTCCAGCCCATTCTGGATTA           | 432             | (Almeida, 2018)                   |
| <i>coa</i>    | F GTCTTGAAAGTAGCTCATCTAAACTTG<br>R ATCCAAATGTTCCATCGTTGTATTC | 228             | (Almeida, 2018)                   |
| <i>tsst-1</i> | F AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA<br>R CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG | 306             | (Paniagua-Contreras et al., 2012) |
| <i>sea</i>    | F CCTTTGGAAACGGTTAAAACG<br>R TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC          | 127             | (Kim, 2011)                       |
| <i>seb</i>    | F TCGCATCAAACGACAAACG<br>R GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC           | 477             | (Kim, 2011)                       |

|             |                                                                  |     |                                   |
|-------------|------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------|
| <i>sec</i>  | F CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG<br>R TCAAATCGGATTACCATTATCC         | 271 | (Kim, 2011)                       |
| <i>sed</i>  | F CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG<br>R TTAATACTATATCTTATAGGGTAAACATC | 318 | (Kim, 2011)                       |
| <i>see</i>  | F CAGTACCTATACATAAAGTTAAACAAGC<br>R TAACTTACCGTGGACCCTTC         | 178 | (Kim, 2011)                       |
| <i>seg</i>  | F CGTCTCCACCTGTTGAAGG<br>R CCAAGTGATTGTCTATTGTCG                 | 327 | (Kim, 2011)                       |
| <i>seh</i>  | F CATTACATCATATGCGAAAGCAGAAG<br>R GCACCAATCACCCCTTTCCTGTGC       | 358 | (Paniagua-contreras et al., 2012) |
| <i>sej</i>  | F CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG<br>R CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC           | 142 | (Kim, 2011)                       |
| <i>mecA</i> | F ACTGCTATCCACCCTCAAAC<br>R CTGGTGAAGTTGTAATCTGG                 | 163 | (Mehrotra, 2000)                  |
| <i>aacc</i> | F TAATCCAAGAGCAATAAGGGC<br>R GCCACACTATCATAACCACTA               | 227 | (Kumar, 2010)                     |
| <i>blaZ</i> | F ACTTCAACACCTGCTGCTTTC<br>R TGACCACTTTTATCAGCAACC               | 173 | (Duran et al, 2012)               |
| <i>tet</i>  | F AGTGGAGCGATTACAGAA<br>R CATATGTCCTGGCGTGTCTA                   | 158 | (Duran et al, 2012)               |
| <i>ery</i>  | F AAGCGGTAAACCCCTCTGA<br>R TTCGCAAATCCCTTCTCAAC                  | 190 | (Duran et al, 2012)               |

#### 4.5 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

As amostras isoladas foram caracterizadas pelo protocolo padrão de PFGE da “PulseNet”, conforme descrito por Ribot et al. (2006) com pequenas modificações. O sistema utilizado foi o CHEF DR-III (Bio-Rad, EUA), o DNA cromossomal foi digerido com a enzima SmaI (Invitrogen, EUA) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose “Pulsifield Certified” 1% (Bio-Rad, EUA), com voltagem de 6V cm<sup>-1</sup>, em um ângulo de 120°, com tempo inicial de mudança de polaridade de 2.2 segundos e tempo inicial de mudança de polaridade de 54.2 segundos. A estirpe *Salmonella* Braenderup (H9812) foi utilizada como padrão e os géis foram submetidos à eletroforese por 21h a uma temperatura de 14°C. As semelhanças de fragmentos foram comparadas utilizando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização. O dendograma foi calculado

pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o Software BioNumerics, versão 7.1 (Matemática Aplicada, Sint-Mastens-Latem, Bélgica).

#### 4.6 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos (Antibiograma)

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada pelo método de disco difusão estabelecido por Kirby Bauer (1966). As cepas de *Staphylococcus aureus* armazenadas em freezer a -80°C foram semeadas em Ágar nutriente para crescimento e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para a realização dos inóculos.

Os inóculos foram preparados em tubos contendo 3 mL de solução salina 0,85%, turvando-se a solução com a cultura, até atingir OD<sub>625nm</sub> de 0,1 a 0,2 nm. Posteriormente, semeou-se esse inóculo com auxílio de um suabe estéril em placas de Mueller-Hinton (MH, Himedia – Índia), logo após distribuiu-se nessa placa os discos contendo os princípios ativos de antimicrobianos selecionados, sendo eles: Amoxicilina + ácido clavulânico 30 µg (AMC), Ampicilina 10 µg (AMP), Cefepima 30µg (COM), Cefazolina 30 µg (CFZ), Ceftriaxona 30 µg (CRO), Cefoxitina 30 µg (CFO), Ciprofloxacina 5 µg (CIP), Cloranfenicol 30 µg (CLO), Clindamicina 2mg (CLI), Eritromicina 15 µg (ERI), Gentamicina 10mg (GEN), Oxacilina 1 µg (OXA), Penicilina G 10UI (PEN), Rifampicina 30 µg (RIF), Sulfazotrin 25 µg (SUT), Tetraciclina 30 µg (TET) e Teicoplanina 30 µg (TEC).

As placas foram incubadas por 18 horas em estufa a 37°C, os halos de inibição formados foram medidos e as cepas foram classificadas como sensíveis, resistentes ou de sensibilidade intermediária para o respectivo princípio ativo, utilizando os parâmetros adotados pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

#### 4.7 MALDITOF- MS

A identificação de *Staphylococcus aureus* foi realizada através da técnica de espectrofotometria de massa, utilizando software MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no setor de Sanidade Animal

– Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande – Mato Grosso do Sul (MS) – Brasil. O protocolo utilizado para preparo das bactérias para realização da técnica foi de acordo com o estabelecido por Freiwald & Sauer, (2008 e 2009).

Para iniciar o preparo dos inóculos para identificação dessas cepas foram transferidos 0,5 mL da cultura bacteriana em caldo BHI para microtubos e centrifugados por 2 minutos a 13.000 rpm, desprezado o sobrenadante e ressuspendido cuidadosamente com 500 µL com água estéril, homogeneizou-se e centrifugou-se novamente por 2 minutos a 13.000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. Novamente ressuspendeu-se com 200 µL de água estéril, após essa etapa adicionou-se 700 µL de etanol 100% (PA) e os microtubos foram homogeneizados manualmente. Centrifugou-se novamente a 13.000 rpm por 2 minutos, removeu-se o etanol residual com micropipeta e deixou-se a amostra secar por aproximadamente 1 minuto. Adicionou-se 10 µL de ácido fórmico a 70% em cada amostra e foram agitadas em agitador para dissolução do “pellet” formado. Adicionou-se 10 µL de acetonitrila pura e centrifugou-se a 13.000 rpm por 2 minutos e foi transferido o sobrenadante a novos microtubos.

Utilizando uma alça descartável, uma pequena quantidade do inóculo bacteriano foi transferida para uma placa alvo “BC” de aço polido “MSP 96” (Microflex LT, Bruker Daltonics/ BD, Alemanha, EUA), em seguida, 1 mL de Matriz [ácido  $\alpha$ -ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA)] foi adicionado e as placas foram secas em temperatura ambiente entre 1-2 minutos. Os espectros de massa resultantes foram analisados e comparados com os espectros de referência. A identificação bacteriana a nível de gênero e espécie foi analisada de acordo com valores em escores; se o valor do escore resultasse entre 2.300-3.000 a amostra possuía alta probabilidade de ser a espécie identificada, valores de 2.000-2.299, a identificação do gênero era segura e a espécie era provável, valores de 1.700-1.999, a identificação do gênero era provável e valores de 0,000-1.699 a identificação não era confiável.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O gene *tstag* amplificou em 93,84% (Gráfico 1) dos isolados, esse gene é utilizado para confirmação do gênero bacteriano *Staphylococcus*. O gene *cydB* (gene do citocromo oxidase) foi desenhado para ser utilizado na identificação da espécie *Staphylococcus.aureus*, sendo um gene específico para esse tipo de identificação (De Almeida et al., 2018). Neste trabalho, 87,69% dos isolados obtiveram a amplificação deste gene. O gene *coa* apresentou 93,84% de amplificação, este gene está presente nas cepas de *Staphylococcus* produtores da enzima coagulase, que são em sua maioria os *S.aureus*, representando a maior porcentagem em relação aos achados de fatores de virulência em nosso estudo.

Ainda, 75,38% dos isolados foram reativos ao teste da coagulase livre em tubo, porém no teste da coagulase conjugada (em lâmina) todos os isolados foram positivos, fato que realça a diferença entre ambos os testes. Enquanto a coagulase conjugada, também chamada de fator de aglutinação, mensura a coagulase que está aderida à parede celular bacteriana, a coagulase livre em tubo mensura a coagulase que é secretada extracelularmente pela bactéria no momento da infecção, a qual provoca a formação de coágulos (Farkas et al., 2019). Essa diferença nos resultados demonstra a importância da realização de ambos os testes diagnósticos, pois enquanto uma é secretada no momento que entra em contato com a superfície do corpo do hospedeiro, a outra é secretada quando entra em contato com o organismo do animal e mais tardiamente.

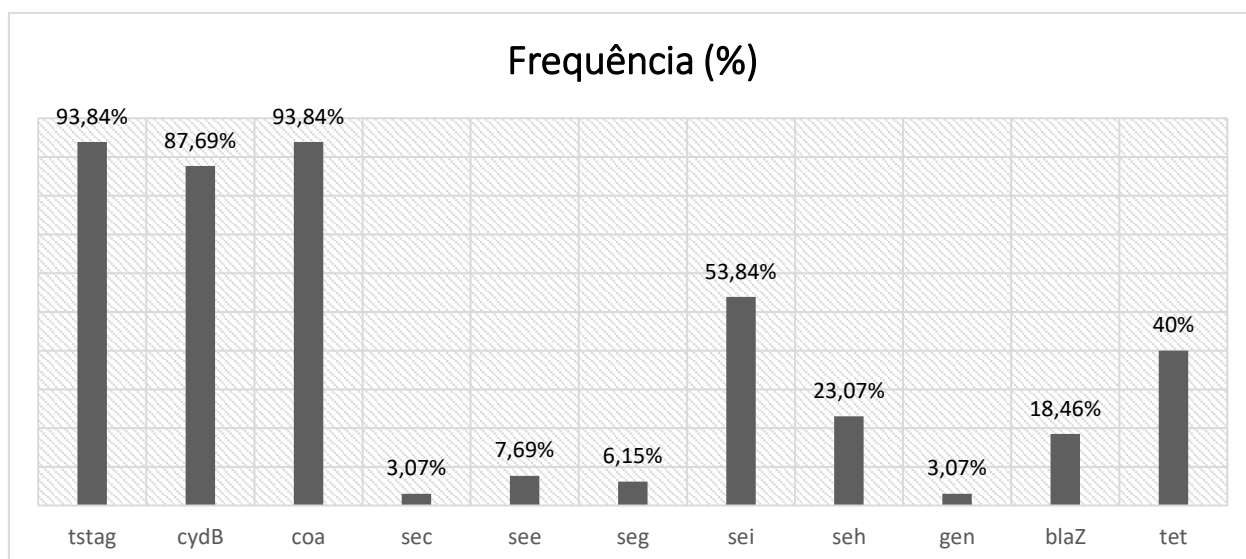
A identificação da presença de coagulase nas estirpes de *Staphylococcus* spp. é fundamental, visto o grau de patogenicidade apresentado pelas cepas produtoras dessa proteína. Estirpes consideradas coagulase positivas são consideradas mais patogênicas, por se tratar de um fator de virulência potente, capaz de evadir o sistema de fagocitose, formando trombos sépticos e até endocardite nos hospedeiros infectados (Farkas et al., 2019; Viana et al., 2010). O gene *coa* que corresponde ao gene da coagulase, foi encontrado em 93,84% (61) dos isolados, indicando que algumas cepas podem possuir o gene da coagulase, porém não o expressam quando instalados no hospedeiro, dado também encontrado por (De Almeida et al., 2018), onde cepas de *Staphylococcus* spp, tipicamente coagulase negativa apresentaram o gene *coa*.

Sabe-se que cerca de 90% das intoxicações alimentares em humanos estão associadas a algum tipo de enterotoxina produzida por *S.aureus* e que mais de 80% das

amostras provenientes de casos de mastite bovina possuem um ou mais genes de enterotoxinas associados (Ren et al., 2020; Wang et al., 2018). Em nosso trabalho, foram identificadas cinco de oito enterotoxinas pesquisadas, sendo elas: *sec* 3,07%, *seg* 6,15%, *see* 7,69%, *seh* 23,07% e *sei* 53,84%, (Gráfico 1). Os genes *seh* e *sei* foram os mais frequentes respectivamente, resultado que corrobora com o encontrado em um trabalho que avaliou leite mastítico na China (Ren et al., 2020).

Segundo Liu et al, (2017) a enterotoxina E é raramente encontrada em amostras de leite cru, porém, no presente estudo, sua prevalência foi de 7,69%. Ainda, é sabido que as enterotoxinas A e D são as principais causadoras de intoxicações alimentares em humanos e em nosso estudo essas enterotoxinas não foram identificadas, diferentemente do trabalho de Ren et al, (2020), que encontrou 4,6% e 27,7% de ambas as toxinas, respectivamente.

Não houve amplificação do gene *tsst* conhecido por causar a Síndrome do Choque Tóxico. Isso pode ser devido ao fato de que este gene está presente na maior parte dos casos, em afeções de pele, onde ocorre a proliferação de *S.aureus* produtores de enzimas da Síndrome do Choque Tóxico, causando sintomas como febre, descamação cutânea e hipotensão (Tam; Torres, 2019).



**Gráfico 1:** Frequência dos genes específicos de *Staphylococcus aureus* e seus genes de virulência e resistência pesquisados.

Neste estudo testamos os principais antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite, assim como outros mais utilizados na terapêutica humana, justamente para

analisar a possível transferência de genes de resistência à cepas que infectam, majoritariamente, os humanos.

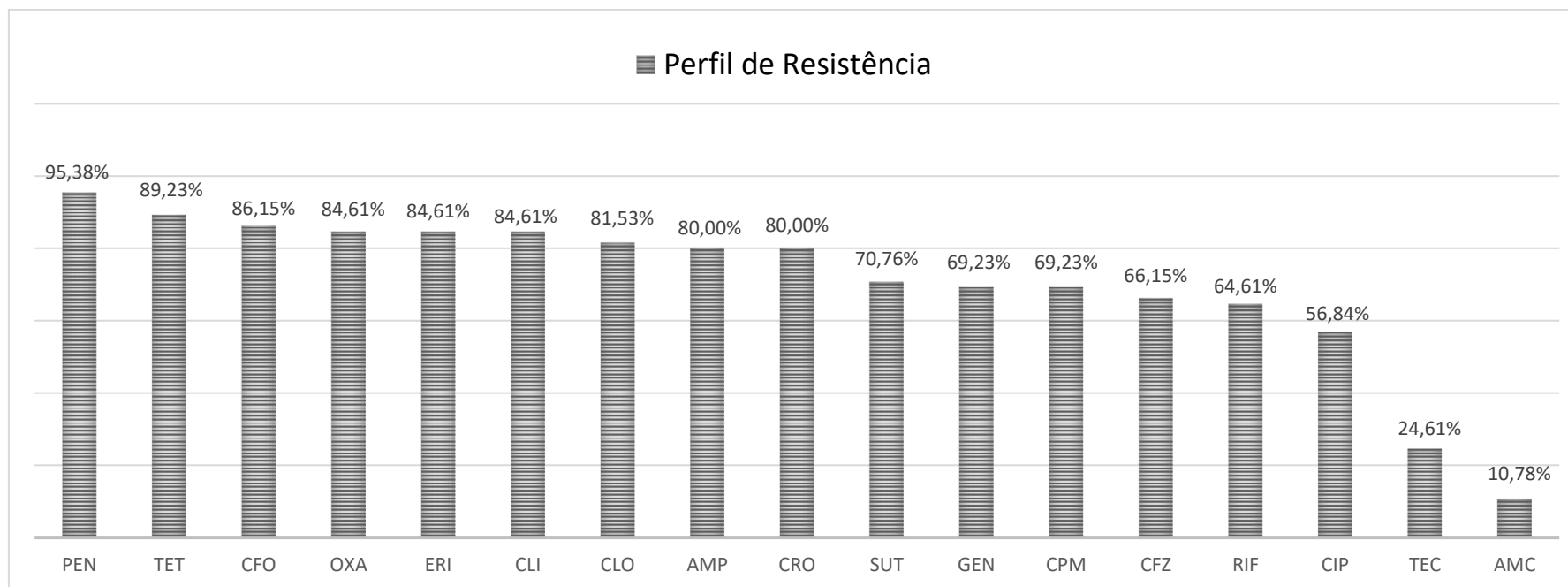
Os achados de perfil de resistência estão descritos no Gráfico 2. Sendo em ordem decrescente de resistência apresentada, penicilina 95,38% (62), tetraciclina 89,23% (58), cefoxitina 86,15% (56), oxacilina 84,61% (55), eritromicina 84,61% (55), clindamicina 84,61% (55), cloranfenicol 81,53% (53), ampicilina 80% (52), ceftriaxona 80% (52), sulfazotrim 70,76% (46), gentamicina 69,23% (45), cefepime 69,23% (45), cefazolina 66,15% (43), rifampicina 64,61% (42), ciprofloxacina 56,84% (35), teicoplanina 24,61% (16) e amoxicilina e ácido clavulânico 10,78% (7).

Os altos percentuais de resistência frente à penicilina e tetraciclina, foram condizentes, pois são antimicrobianos usados de forma indiscriminada no tratamento da mastite nos sistemas de produção leiteira. Ren et al (2020) e Liu et al (2017) também relataram altos índices de resistência à penicilina em amostras de leite em pesquisas conduzidas na China, com 58,5% e 85,2% respectivamente. Na China, assim como no Brasil este antimicrobiano é fortemente utilizado no tratamento da mastite bovina, bem como apresenta insucesso nos tratamentos devido à alta resistência. Portanto, penicilina e tetraciclina devem ser utilizadas com cautela, devido aos achados alarmantes de resistência neste e nos demais estudos encontrados no Brasil e no mundo.

Nossos isolados apresentaram 86,15% de resistência à Cefoxitina, sendo o terceiro antimicrobiano com o maior índice de resistência apresentado, ficando atrás apenas da Penicilina 95,38% e da Tetraciclina 89,23%. Este antimicrobiano é utilizado para estimar a resistência à metilicina, porém o gene *mecA* não foi detectado. Do total, 94% (61) dos isolados apresentaram resistência a múltiplas drogas (MDR), caracterizada pela resistência bacteriana a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo as chamadas bactérias multirresistentes (Basak et al., 2016; Magiorakos et al., 2012). Fato este, que torna a mastite a principal causa do uso excessivo de antimicrobianos na pecuária leiteira (Piessens et al., 2012). Esse uso exacerbado pode estar provocando forte pressão de seleção, transformando bactérias resistentes aos princípios ativos utilizados, aumentando os insucessos terapêuticos e reduz os índices de produção leiteira.

A resistência dos *S.aureus* às diferentes classes de antimicrobianos dificulta ainda mais o tratamento da doença, que além do tratamento via medicamentos, necessita de mudanças de manejo no ambiente de ordenha (Hardy et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), (2017) os *S.aureus* encontram-se na lista de alta prioridade para o desenvolvimento de novos antimicrobianos que sejam eficazes no combate às infecções por essa classe bacteriana. Esse microrganismo se encontra nessa categoria devido à alta resistência apresentada em diversos estudos e nas mais diversas tentativas de tratamento às enfermidades, muito se deve às cepas resistentes à metililina. Esses dados ressaltam sobre a gravidade em que a resistência aos antimicrobianos se encontra, como também a necessidade emergente do desenvolvimento de novos princípios ativos que poderão ser utilizados em substituição aos que não estão mais causando efeito. Está cada vez mais clara a necessidade da correta implementação e supervisão dos programas de conscientização e vigilância sobre o uso racional de antimicrobianos, a fim de diminuir os percentuais de resistência nos insucessos de tratamentos.



**Gráfico 2:** Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite bovino mastítico.

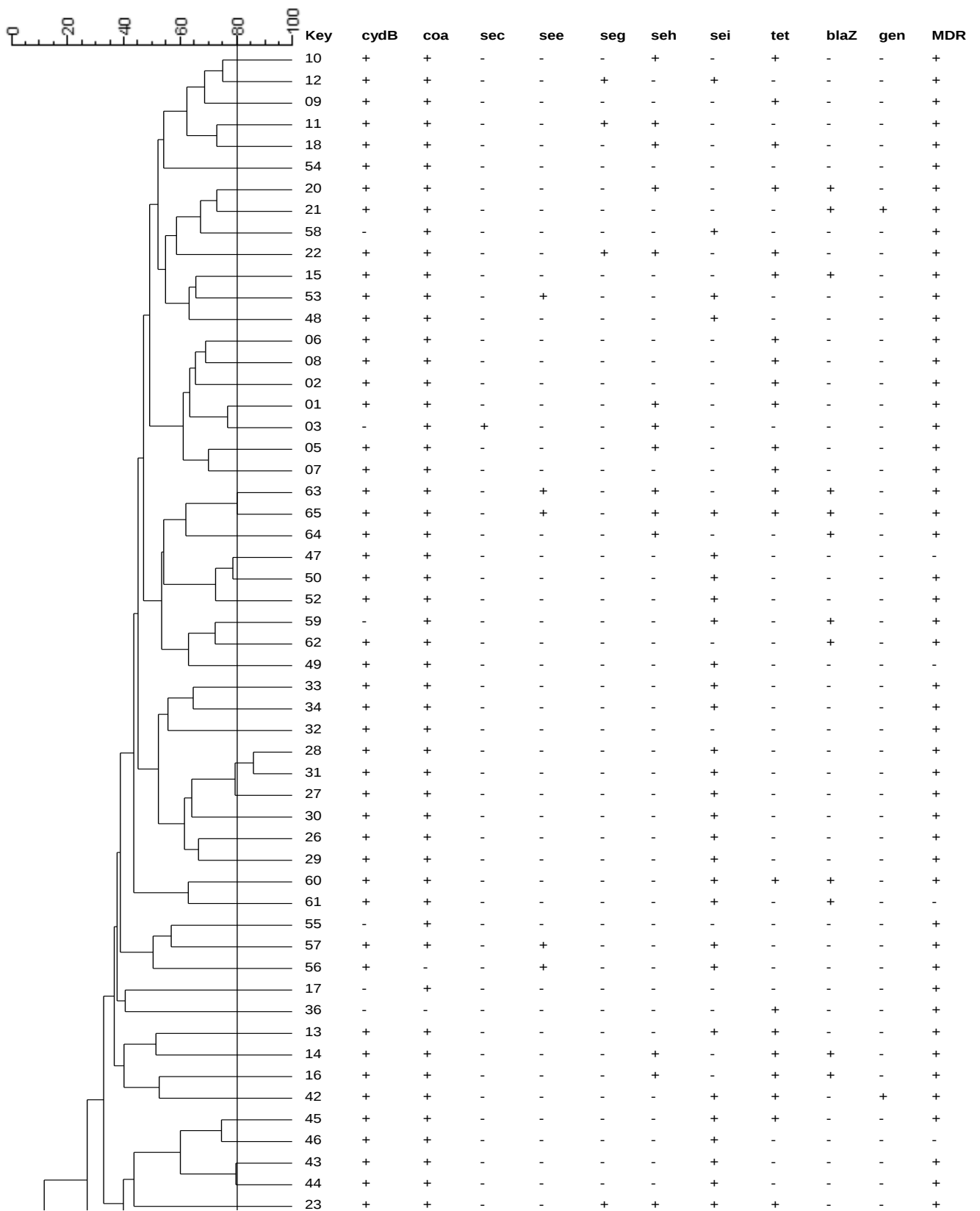
PEN= Penicilina, TET= Tetraciclina, CFO= Cefoxitina, OXA= Oxacilina, ERI= Eritromicina, CLI= Clindamicina, CLO= Cloranfenicol, AMP= Ampicilina, CRO= Ceftriaxona, SUT= Sulfazotrin, GEN= Gentamicina, CPM= Cefepime, CFZ= Cefazolina, RIF= Rifampicina, CIP= Ciprofloxacina, TEC= Teicoplanina, AMC= Amoxicilina + ácido clavulânico.

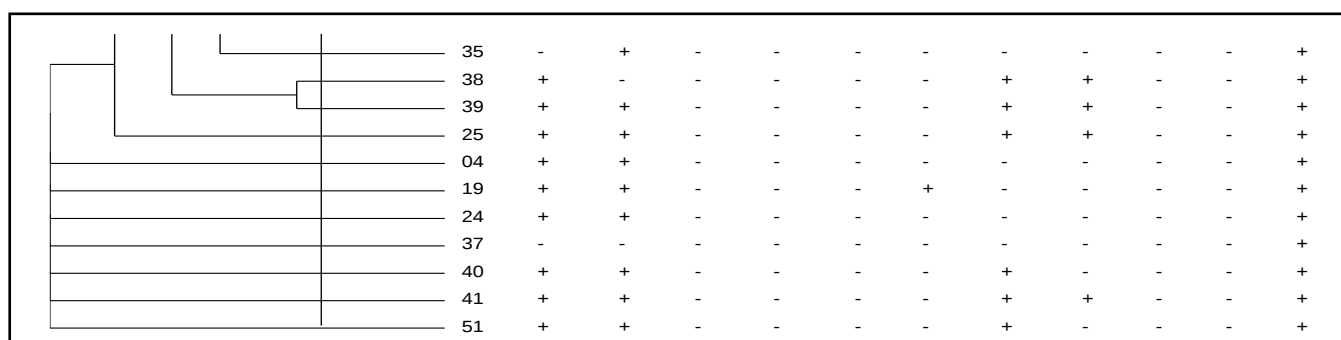
A técnica de MALDI-TOF confirmou a espécie *S.aureus* em todas as amostras testadas. Esse resultado demonstrou a grande especificidade desta técnica em comparação com os resultados obtidos na PCR convencional.

O presente trabalho mostrou baixa frequência dos genes de resistência *blaZ* 18,42% e *gen* 3,07%, porém essas classes antimicrobianas apresentaram fortes índices de resistência no teste de susceptibilidade a antimicrobianos como demonstrado no Gráfico 1. O gene *ery* não foi amplificado. O gene *tet* apresentou 40% de positividade na técnica de PCR, já no teste de suscetibilidade a antimicrobianos apresentou 89,23% de resistência. Esse acontecimento pode ser explicado, pelo fato de que existem diferentes tipos de genes relacionados à resistência, além de variações de um mesmo tipo de gene, por esse fator, estes que foram pesquisados não estavam presentes nas estirpes avaliadas. Outros estudos também obtiveram resultados parecidos, onde fenotipicamente a estirpe apresenta resistência aquele antimicrobiano, porém no teste genotípico ele não é detectado (Liu et al., 2017; Zhao et al., 2016). Outros autores citam que a resistência fenotípica, na grande maioria das vezes, não é proporcional à resistência genotípica e que essa discrepância nos resultados indica que a detecção do gene não influencia na sua expressão (Monistero et al., 2020). Esse achado, reforça a importância em sempre realizar e avaliar os dados obtidos no teste genotípico associados aos resultados obtidos no teste fenotípico (antibiograma).

Na técnica de PFGE (Figura 1) foi possível observar alto grau de diversidade genética entre as estirpes estudadas, devido ao alto número de clusters formados no dendrograma. Isso demonstra que diferentes estirpes de *S.aureus* estão infectando os animais de ordenha e podem estar compartilhando entre si fatores de virulência e resistência, tornando-as mais resistentes às medidas de controle e tratamento.

## PFGE





**Figura 1:** Dendrograma demonstrando a diversidade genética e frequência dos genes de virulência e resistência entre as 65 cepas de *Staphylococcus aureus*.

Os resultados da técnica de MALDITOF demonstraram grande especificidade, pois todas as cepas analisadas apresentaram valores acima de 2.000, que representa alta probabilidade de ser a espécie procurada. A técnica de MALDITOF é uma ferramenta de extrema valia quando se busca rapidez no resultado, entretanto, é uma técnica cara, devido ao custo do equipamento. Os resultados da técnica de MALDITOF e os achados da técnica de PCR apresentaram algumas discrepâncias, visto que, nem todos os isolados resultaram em positividade quando testados para o gene específico de *S.aureus* (*cydB*) na PCR, este fato demonstra possivelmente, que esse gene não seja tão específico para identificação da espécie. Dingle, (2013), comparou a técnica de identificação bacteriana por MALDITOF com métodos convencionais utilizados na rotina de laboratórios de bacteriologia, que levam em consideração o fenótipo bacteriano e as reações bioquímicas desempenhadas, e comprovou que a técnica de MALDITOF, apresenta maior especificidade, rapidez e acurácia nos resultados obtidos. O autor concluiu também que a técnica de MALDITOF identifica mais rapidamente em nível de espécie, enquanto as técnicas convencionais, no mesmo tempo decorrido, identificam apenas em nível de gênero, e essa identificação, apresenta grandes riscos de estar equivocada, devido a alterações fenotípicas da espécie, como comportamentos anormais em testes bioquímicos, por exemplo.

## 6 CONCLUSÕES

- Amostras de leite bovino mastítico podem conter diferentes tipo de fatores de virulência e resistência;
- A realização do teste da coagulase livre em tubo em amostras de leite é de extrema importância, visto o grau de patogenicidade apresentado por essas cepas positivas neste teste;
- O teste de MALDI-TOF apresentou alta especificidade em comparação ao teste de PCR convencional;
- Os dados epidemiológicos referentes aos achados de enterotoxinas no presente trabalho contribuem sobre o alarme das doenças transmitidas por alimentos como é o caso das intoxicações alimentares, enfermidade que merece maior atenção, devido a sua prevalência.
- Os resultados sobre a resistência bacteriana encontradas são alarmantes, visto a dificuldade de tratamento bem como a alta prevalência da doença nos rebanhos leiteiros, fato que exalta o alerta sobre a conscientização, prevenção e adoção de medidas de controle no intuito de evitar o alastramento dessa infecção e a disseminação dos seus genes de virulência e resistência.
- A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) se torna necessária para a identificação do grau de variabilidade de cepas que estão infectando a bovinocultura leiteira.
- Os dados apresentados demonstram o estado de patogenicidade em que se encontra o agente pesquisado e a urgência de tomada de medidas de controle e prevenção da Mastite Bovina.

## 7 REFERÊNCIAS

Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR (2010) Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins** 2:1751-1773.

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN (2006) Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science** 89:1877-1895.

Basak S, Singh P, Rajurkar M (2016) Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. **Journal of Pathogens** 2016:1-5.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology** 45:493-496.

Berube BJ, Wardenburg JB (2013) *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: Nearly a century of intrigue. **Toxins** 5:1140-1166.

Burnside K, et al. (2010) Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. **Plos One** 5:5-6

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2018). Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; 364 Approved Standard – 28th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 365 Wayne, PA.

Dan M, Wu Y, et al. (2018) Antimicrobial resistance, virulence gene profile and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows in Xinjiang Province, northwest China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 16:98-104.

De Almeida CC, Pizauro LJL, Soltes GA, Slavic D, De Ávila FA, Pizauro JM, MacInnes JM (2018). Some coagulase negative *Staphylococcus* spp. isolated from buffalo can be misidentified as *Staphylococcus aureus* by phenotypic and Sa442 PCR methods. **BMC Research Notes** 11:4-9.

De Fátima MA, Simeão do Carmo L. Zeppone Carlos I (2006) Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 65:46-49.

Deng Y, et al. (2019) A multiplex loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. **BioScience Trends** 13:510-515.

Dias NL, et al. (2011) Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 63:1547-1552.

Dingle TC, Butler-Wu SM (2013) MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. **Clinics in Laboratory Medicine** 33:589-609.

Duan J, et al. (2018) Subinhibitory concentrations of resveratrol reduce alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates by downregulating *saRS*. **Emerging Microbes and Infections** 7:136-142.

Duran NB, Ozer B, Duran B, Onlen Y, Demir C (2012) Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci. **Indian Journal of Medical Research** 135:389-396.

Farkas ÁZ, Farkas VJ, Szabó L, Wacha A, Bóta A, Csehi L, Kolev K, Thelwell C (2019) Structure, Mechanical, and Lytic Stability of Fibrin and Plasma Coagulum Generated by Staphylocoagulase From *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Immunology** 10.

Freiwald A, Sauer S (2009) Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Protocol** 4:732-742.

Fursova K, et al. (2020) Virulence Factors and Phylogeny of *Staphylococcus aureus* Associated with Bovine Mastitis in Russia Based on Genome Sequences. **Frontiers in Veterinary Science** 7:1-10.

Gabli Z, Djerrou Z, Gabli AE, Bensalem M (2019) Antimicrobial Activity of Clinically Isolated Bacterial Species Against *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology** 10:1-15.

Gabli Z, Djerrou Z, Gabli AE, Bensalem M (2019) Prevalence of mastitis in dairy goat farms in Eastern Algeria. **Veterinary World** 12:1563-1572.

Grace D, Fetsch A (2018) *Staphylococcus aureus* – A Foodborne Pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention, and Control: An Overview. **Academic Press** 1:314-316.

Hardy BL, Bansal G, Hewlett KH, Arora A, Schaffer SD, Kamau E, Bennett JW, Merrell DS (2019) Antimicrobial Activity of Clinically Isolated Bacterial Species Against *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology** 10:1-15.

Javid F, Taku A, Bhat MA, Badroo GA, Mudasir M, Sofi TA (2018) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. **Veterinary World** 11:423-430.

Käppeli NM, Morach M, Corti S, Eicher C, Stephan R, Johler S (2019) *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: Clonal diversity, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. **Journal of Dairy Science** 102:3274-3281.

Katsarou I, et al. (2019) Fatality of *Staphylococcus aureus* infections in a Greek university hospital: role of inappropriate empiric treatment, methicillin resistance, and toxin genes' presence. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** 39:443-450.

Kim NH, Yun AR, Rhee MS (2011) Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology** 111:1456-1464.

Kumar R, Yadav BR, Singh RS (2010) Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Current Microbiology** 60:379-386.

Kuramae-Izioka EE (1997) A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Unimar** 19:683-689.

Liu H, Li S, Meng L, Dong L, Zhao S, Lan, X, Wang J, Zheng N (2017) Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. **Journal of Dairy Science** 100:8796-8803.

Luo K, Shao F, Kamara KN, Chen S, Zhang R, Duan G, Yang H (2018) Molecular characteristics of antimicrobial resistance and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* isolates derived from clinical infection and food. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** 32:2-9.

Magiorakos AP, et al. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection** 18:268-281.

Magro G, Biffani S, Minozzi G, Ehricht R, Monecke S, Luini M, Piccinini R (2017) Virulence genes of *S. aureus* from dairy cow mastitis and contagiousness risk. **Toxins** 9:1-12.

Maia GBS, Pinto, Marques CYT, Roitman FB, Lyra DD (2013) Produção Leiteira no Brasil. **BNDES** 37:371-398.

Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1998) Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** 36:618-623.

Megid J, Ribeiro MG, Paes AC: Doenças Infecciosas em Animais de Produção e Companhia: Mastite em Animais Domésticos (2016). Rio de Janeiro: Roca. 1296 p.

Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology** 38:1032-1035.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio exterior (2013) **Produção Leiteira no Brasil**. BNDS Setorial 37, p. 371-398.

Monistero V, et al. (2020) Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. **Journal of Dairy Science** 103:3431-3446.

Naushad S, Nobrega DB, Naqvi A, Barkema HW, De Buck J (2020) Genomic analysis of bovine *Staphylococcus aureus* isolates from milk to elucidate diversity and determine the distributions of antimicrobial and virulence genes and their association with mastitis. **mSystems** 5:1-23.

Organização Mundial da Saúde, OMS (2017) OPAS Brasil. Brasília – DF.

Otto M (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology** 17:32-37.

Otto M, Deleo FR, Diep BA (2009) Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. **Infectious Disease Clinics of North America** 23:17-34.

Paniagua-Contreras G, Sáinz-Espuñes T, Monroy-Pérez E, Raymundo RMJ, Arenas-Aranda D, Negrete-Abascal E, Vaca S (2012) Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Hemodialysis Catheters of Mexican Patients. **Advances in Microbiology** 02:476-487.

Paterna A, Contreras A, Gómez-Martín A, Amores J (2014) The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. **Small Ruminant Research** 121:36-41.

Pierson JD, Hansmann MA, Forney LJ (2018) The effect of vaginal microbial communities on colonization by *Staphylococcus aureus* with the gene for toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1): A case-control study. **Pathogens and Disease** 76:1-8.

Piessens V, De Vliegher S, Verbist B, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, Van Coillie E (2012) Characterization of coagulase-negative *staphylococcus* species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. **Journal of Dairy Science** 95:7027-7038.

Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, Chen W (2020) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. **Journal of Dairy Science** 103:3368-3380.

Ribot EM, Fair MA, Gautam R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barret TJ (2006) Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease** 3:59-67.

Saidi N, Owlia P, Marashi SMA, Sadari H (2019) Inhibitory effect of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* on biofilm formation and expression of  $\alpha$ -hemolysin and enterotoxin A genes of *Staphylococcus aureus*. **Iranian Journal of Microbiology** 11:246-254.

Sharma H, Turner CE, Siggins MK, El-Bahrawy M, Pichon B, Keams A, Sriskandan S (2019) Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Evaluation and Antibiotic Impact in a Transgenic Model of Staphylococcal Soft Tissue. **mSphere** 4:1-12.

Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K (2008) Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. **PlosOne** 3:2843-2853.

Tabatabaei S, Najafifar A, Badouei MA, Salehi TZ, Tamai IA, Khaksar E, Abbassi MS, Ghazisaeedi F (2018) Genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in pets and veterinary personnel in Iran: new insights into emerging methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP). **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 16:6-10.

Tahmasebi H, Dehbashi S, Jahantigh M, Arabestani MR (2019) Relationship between biofilm gene expression with antimicrobial resistance pattern and clinical specimen type based on sequence types ( STs ) of methicillin - resistant *S . aureus*. **Molecular Biology Reports**. 7:1-34.

Tam K, Torres VJ (2019) *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiology Spectrum** 7:1-34.

Tenhagen B, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W (2006) Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science** 89:2542-2551.

Vanassche T, Verhaegen J, Peetermans WE, Hoylaerts MF, Verhamme P (2010) Dabigatran inhibits *Staphylococcus aureus* coagulase activity. **Journal of Clinical Microbiology** 48:4248-4250.

Viana D, et al. (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. **Molecular Microbiology** 77:1583-1594.

Vitale M, Gaglio S, Galluzzo P, Cascone G, Piraino C, Lo Presti VDM, Alduina R (2017) Antibiotic Resistance Profiling, Analysis of Virulence Aspects and Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolated in Sicily, Italy. **Foodborne Pathogens and Disease** 15:177-185.

Wang W, Lin X, Jiang T, Peng Z, Xu J, Yi L, Li F, Fanning S, Baloch Z (2018) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology** 9:1123-1132.

Zhao S, et al. (2016) Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology** 82:459-466.