

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/07/2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Caracterização molecular e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica no estado de São Paulo.

ERIKA CAROLINA ROMÃO BONSAGLIA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia dos Micro-organismos.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU – SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização molecular e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica no estado de São Paulo.

ERIKA CAROLINA ROMÃO BONSAGLIA

PROFA. DRA. VERA LUCIA MORES RALL

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia dos Micro-organismos.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bonsaglia, Erika Carolina Romao.

Caracterização molecular e diversidade clonal de Staphylococcus aureus, isolados de leite de vacas com mastite subclínica no estado de São Paulo / Erika Carolina Romao Bonsaglia. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lucia Mores Rall

Capes: 20100000

1. Bovino de leite - Doenças. 2. Staphylococcus aureus.
3. Mastite. 4. Diagnóstico molecular.

Palavras-chave: MLST; S. aureus; agr; spa typing; t321.

Dedicatória

Aos meus pais,

Lúcia e Benedito

(in memoriam)

Agradecimentos

À Deus, pela saúde, por me fazer sentir sua presença nos momentos mais difíceis e me reerguer todas as vezes que pensei em desistir.

À minha filha Heloisa, pelos sorrisos e abraços que carregam minhas energias e me dão forças para continuar e ao meu marido Rafael, por estar sempre presente, muitas vezes abrindo mão de seus propósitos para que eu realizasse meus.

À Prof^a. Dra. Vera Lucia, minha orientadora, pelos ensinamentos, amizade, risadas, paciência e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos Fernando e Wesley, por sempre apoiarem minhas decisões.

À minha amiga Bruna Rossi, obrigada por fazer parte dos meus dias e torná-los mais leves e divertidos.

A Nathalia Cirone e Ivana Castilho, grandes companheiras desde o mestrado, sou muito grata pelo que me ensinam a cada dia, pela amizade e happy hours.

Aos meus queridos, Ricardinho, Livia, Stéfanie, Fernanda, Paulo, pela convivência e pelos momentos de alegria que continuam em meu coração.

Aos funcionários do departamento de Microbiologia/Imunologia e a todas as pessoas que estiveram presentes, embora não nomeadas individualmente, que me apoiaram e contribuíram para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro, processos nº 2013/12831-4, 2013/18338-8 e BEPE nº2015/15208-1

Epígrafe

*“Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar
as velas do barco para chegar aonde quer”*

Confúcio

SUMÁRIO

Resumo	04
Abstract.....	05
1. Introdução	06
1.1. Mastite e <i>S. aureus</i>	07
1.2. Toxinas estafilocócicas.....	09
1.3. Resistência a antimicrobianos	10
1.4. Caracterização molecular dos grupos agr, spa typing, MLST e PFGE	11
2. Objetivos.....	14
3. Referências Bibliográficas.....	15
Capítulo I- Epidemiology molecular and virulence genes of methicillin- susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) isolated from milk of subclinical mastitis cows	24
Abstract.....	26
Introduction	27
Material and Methods.....	28
Results	30
Discussion.....	35
References	40

RESUMO

Staphylococcus aureus é um agente comum de mastite bovina, responsável por grandes perdas econômicas na pecuária mundial. Esse micro-organismo possui fatores de virulência bastante conhecidos como a produção de hemolisinas, leucotoxinas e superantígenos como a toxina do síndrome do choque tóxico e enterotoxinas. O objetivo do estudo foi caracterizar molecularmente os isolados de *S. aureus* provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, de várias regiões do estado de São Paulo, através de Multilocus Sequence Typing (MLST), *spa* typing, Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) e *agr*. Também fizeram parte dos objetivos, testes fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos, além da pesquisa de genes de alguns fatores de virulência como o *pvl* (toxina de Panton Valentine), *tst* (toxina da Síndrome do Choque Tóxico), *sea*, *seg*, *seh* e *sei*, a fim de verificar quais os fatores de virulência mais envolvidos nesse quadro. Todos os isolados de *S. aureus* foram sensíveis a meticilina (MSSA), pois os genes *mecA* e *mecC* não foram encontrados. Entre os 12 antibióticos testados, observou-se resistência intermediária à eritromicina e nenhuma das cepas foram resistentes à oxacilina, vancomicina e gentamicina. Os isolados resistentes à tetraciclina apresentaram o gene *tetK*. Na caracterização molecular, observou-se 23 *spa* types diferentes com prevalência dos tipos t605 e t127. A maioria das cepas (48,1%) eram pertencentes ao grupo *agr* II, seguido de 20,1% do grupo III e 8,1%, do I, sendo que o grupo *agr* IV não foi encontrado. Entre os fatores de virulência estudados, o gene *pvl* não foi observado. Em relação aos superantígenos, o gene *tst* foi observado em 105 das 285 cepas (37,1%) e a distribuição de genes que codificavam a produção de enterotoxinas foi muito variável. Entre os 285 isolados, 126 (44,2%) foram positivos para, pelo menos, um dos genes pesquisados e o mais frequente foi *seg*, ocorrendo isoladamente ou em combinações diferentes em 275 (96,5%), seguido por *seh* (25,9%), *sec* (227/79,6%), *sei* (44; 15,4%), *sea* (31; 10,8%) e *sed* (10; 3,5%). Os genes *seb* e *see* não foram observados. Foram observados 23 *spa* type diferentes (t605, t127, t458, t521, t342, t318, t693, t177, t11659, t021, t2164, t1192, t7335, t114, t6811, t6980, t002, t3324, t559, t138, t321, t456, t2066). O mais frequente foi t605, ocorrendo em 168 cepas (58,9%), seguido t127, em 27 (9,5%) e a presença do t321 em vacas causando mastite não havia sido relatado anteriormente. Os *sequence types* (ST) mais frequentes foram o ST126, correspondendo a 59% dos isolados, seguidos por ST1 (9%), pertencentes ao complexo clonal (CC) 126 e 1, respectivamente. Os resultados mostraram diferenças entre os perfis entre as diversas técnicas moleculares, uma vez que o PFGE apresentou diferentes perfis entre cepas de mesmo *spa* type sugerindo que o *spa* typing não é um bom marcador molecular.

Palavras-chave: *S. aureus*, t321, *agr*, *Spa* typing, MLST.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a common agent of bovine mastitis, causing economic losses in Brazilian livestock. This microorganism has well known virulence factors such as the production of hemolysins, leukotoxins and superantigens such as toxic shock syndrome toxin and enterotoxins. The objective of the study was to characterize molecularly isolates of *S. aureus* from milk of cows with subclinical mastitis, of the several regions of São Paulo State, through *Multilocus sequence typing* (MLST), *spatyping*, *Pulse Field Electrophoresis Gel* (PFGE) and *agr*. Phenotypic and genotypic tests of antimicrobial resistance, as well as the search for genes of some virulence factors such as *pvl* (Panton Valentine toxin), *tst* (Toxic Shock Syndrome toxin). In the present study, all isolates of *S. aureus* were sensitive to methicillin (MSSA), as the *mecA* and *mecC* genes were not found. About 12 antibiotics tested, intermediate resistance to erythromycin was observed and none resistance to oxacillin, vancomycin and gentamicin. The tetracycline resistant isolates showed the *tetK* gene. Molecular characterization showed 23 different *spa* types with prevalence of t605 and t127. The most of the strains (48.1%) presented as belonging to the *agr* II group, followed by 20.1% of the *agr* III group and 8.1% of the *agr* I group, and the *agr* IV group was not found. About the virulence factors studied, the *pvl* gene was not observed. In relation to super antigens, the *tst* gene was observed in 105 of the 285 strains (37.1%) and the distribution of genes coding for enterotoxin production was very variable. Among the 285 isolates, 126 (44.2%) were positive for at least one of the genes. The most frequent was *seg*, occurring alone or in different combinations in 275 (96.5%) isolates, followed by *seh* (250/90%), *sec* (227/79.6%), *sei* (44/15.4%), *sea* (31/10.8) and *sed* (10/3.5%). The *seb* and *see* genes were not observed as well as *pvl* gene. There were observed 23 different *spa* types (t605, t127, t458, t521, t342, t318, t693, t177, t11659, t021, t2164, t1192, t7335, t114, t6811, t6980, t002, t3324, t559, t138, t321, t456, T2066). The most frequent was t605, occurring 168 strains (58.9%), followed by t127, in 27 (9.5%) and the presence of t321 in cows causing mastitis had not been previously reported. The most frequent sequence types (ST) were ST126, corresponding to 59% of the isolates, followed by ST1 (9%), belonging to the clonal complex (CC) 126 and 1, respectively. The results showed notable differences between profiles in PFGE compared to other techniques, strains of the same *spa* type with different profiles of PFGE suggesting that *spatyping* is not a good molecular marker.

Key words: *S.aureus*, t321, *agr*, *spa* typing, MLST.

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença com grande prevalência nos rebanhos leiteiros em todo o mundo e representa uma das mais significantes perdas econômicas na indústria leiteira, associadas à redução da qualidade do produto, redução da produção, descarte do leite, reposição de animais, além dos gastos com medicamentos e serviços veterinários (AIEMSAARD et al., 2011; JASIELSKI et al., 2014). Essa inflamação das glândulas mamárias de vacas que pode ser causada por traumas físicos ou infecção por micro-organismos gera alterações fisiológicas e metabólicas que leva a uma redução da área funcional do teto e, muitas vezes, à perda do teto ou descarte do animal (NAWROTEK, 2011). Para estabelecer a infecção, a bactéria precisa adentrar o úbere da vaca, vencendo as barreiras anatômicas, químicas e o sistema imunológico. Se as defesas imunes não forem capazes de eliminar o patógeno, a concentração de bactérias aumenta, passando a danificar o epitélio mamário e a produtividade leiteira é afetada negativamente (ZHAO & LACASSE, 2008).

A mastite pode ser classificada quanto à forma de manifestação em clínica ou subclínica. O primeiro tipo é caracterizado por alterações macroscópicas do leite e na glândula mamária, podendo evoluir para mastite crônica. O teste da caneca de fundo escuro é utilizado para detectar essa doença, sendo recomendado a cada início de ordenha (RIBEIRO e FURLONG 2007; COSER et al., 2012). A mastite subclínica não causa alterações macroscópicas no leite nem na glândula mamária, mas determina a elevação das contagens de células somáticas (CCS) e persistência das bactérias na glândula mamária, podendo ser diagnosticada pelo Califórnia Mastitis Tests (CMT) ou pela contagem eletrônica de CCS (HALASA et al., 2007).

Quanto à classificação baseada no agente causador, a mastite pode ser classificada em mastite ambiental e contagiosa. A mastite contagiosa é caracterizada pela maior ocorrência de casos subclínicos. São geralmente de longa duração, com alta CCS e causados por micro-organismos como *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp (OVERESCH et al., 2013) dos quais *S. aureus* é responsável por causar infecções persistentes (MARTINS et al., 2010). Já a mastite ambiental é causada por agentes cujo reservatório é o próprio ambiente, como os coliformes, *E. coli* e *Klebsiella* spp, podendo acometer vacas lactantes, secas ou novilhas, ao contrário da forma contagiosa, que é mais comum nas vacas em lactação. (SANTOS e FONSECA, 2007; SCHUKKEN et al., 2012).

1.1. Mastite e *S. aureus*

S. aureus está entre os três mais importantes patógenos causadores de mastite, com *E.coli* e *Streptococcus agalactiae* (HALASA et al., 2009). Pertence à família Staphylococcaceae, são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e se agrupam em formato semelhante a cachos de uva. (TRABULSI et al., 2015). É composto por 52 espécies e 29 subespécies (DSMZ, 2017), mas apenas *S. aureus*, *S. schleiferi* subesps. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* sintetizam a enzima coagulase, sendo denominados estafilococos coagulase positiva (ECP), enquanto os demais são considerados estafilococos coagulase negativa (ECN) (BANNERMAN, 2003).

S. aureus é considerada a espécie mais virulenta desse gênero, conseguindo sobreviver em ambientes variados, são mesófilos que se desenvolvem entre 7°C e 47,8°C, crescem em meios hipertônicos (em concentrações de até 15% NaCl) e numa ampla variação de pH (4,2 a 9,3). Apresenta natureza ubíqua, tendo como reservatório

primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves (LELOIR et al., 2003).

Estima-se que de 25 a 40% da população humana carregue *S. aureus*, representando importante indicador de higiene pessoal e da qualidade dos alimentos (INGAVALE et al., 2005; LUONG et al., 2006). É a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar, responsável por 98% dos surtos (SANTANA et al., 2010).

Embora *S. aureus* possa sobreviver por longo tempo no ambiente, é necessária a colonização de tecidos para garantir sua sobrevivência e multiplicação (PETON & Le LOIR, 2014). Esses patógenos são transmitidos entre as vacas durante a ordenha, que pode ser mecânica ou manual, entre os animais do rebanho, pelas mãos dos ordenhadores ou equipamentos de ordenha (SAKWINSKA et al., 2011). Em rebanhos leiteiros, *S. aureus* é responsável por um terço dos casos de mastite clínica e subclínica (BOTREL et al., 2010). No Brasil, a ocorrência de *S. aureus* em isolados de leite de vacas com mastite vem sendo descrito desde a década de 50 por Lacerda Jr. et al. (1953). Subsequentemente, vários estudos em diferentes estados foram registrados como Arcuri et al. (2006), no norte do estado do Rio de Janeiro, onde foi a espécie predominante em leite de tanque de refrigeração. Em 2012, Mendonça e colaboradores, avaliando *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina no estado do Rio de Janeiro, encontraram 36,2% de *S. aureus*. No estado de São Paulo, Rall et al. (2014) estudaram mastite por *Staphylococcus* spp. e encontraram a presença de *S. aureus* em 17,5% dos isolados.

A mastite causada por *S. aureus* é um problema para a saúde pública, pois, frequentemente, mais da metade das cepas isoladas de leite de glândulas infectadas apresentam, pelo menos, um gene que codifica para a produção de enterotoxinas, com

significantes variações, dependendo da região e país. A concentração bacteriana no leite de glândulas infectadas é geralmente moderada (menos de 10.000 UFC/mL), mas a contaminação do leite a granel pode levar à intoxicação estafilocócica, através dos produtos lácteos fabricados com leite cru. (Le LOIR et al., 2003; Le MARECHAL et al., 2011).

1.2. Toxinas estafilocócicas

Algumas cepas produzem exoproteínas responsáveis por manifestações clínicas específicas, como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), Toxina Esfoliativa e a Panton Valentine Leucocidina (PVL) (DINGES et al., 2000; BENÍĆ et al., 2012; RAHIMI & ALIAN, 2013).

Os superantígenos estafilocócicos (SAGs), incluindo SEs e TSST-1, foram originalmente identificados em *S. aureus*. As SEs foram nomeadas de acordo com as suas atividades eméticas, após a administração oral em um modelo primata. Por isso, várias SEs foram designadas como SE-like (SEI), uma vez que não apresentaram qualquer atividade emética, nos modelos animais já testados (LINA et al., 2004). Existem cinco SEs clássicas, SEA até SEE, antigenicamente distintas (BERGDOLL, 1989). Ao longo dos anos, novos tipos de SEs foram descritos e seus genes, sequenciados (SEG, SEH, SEI, SEJ, SeK, SEL, SEIM, SEIN, SEIO, SELP, SEIQ, SEIR, SES, SET, SEIU, SEIV e SEIX) (ONO et al., 2008; SEO & BOHACH, 2007; THOMAS et al., 2006, WILSON et al., 2011). Em 2017, Ono e colaboradores descreveram atividade emética em SeK, SeL, SeM, SeN e SeO, em modelos primatas. Os genes que codificam para a produção de SEs podem estar localizados nos cromossomos, plasmídeos, transposons ou integrados ao genoma de fagos, conferindo

uma vantagem seletiva às bactérias que os possuem (Le LOIR, BARON, & GAUTIER, 2003).

A PVL é uma toxina leucocitolítica associada com lesões necróticas e envolvida em severas infecções cutâneas e pneumonias (GILLET et al., 2002; KANEKO & KAMIO, 2004). Pode ser encontrada em cepas de *S. aureus* meticilina sensíveis (MSSA) ou resistentes (MRSA), de diferentes fontes como alimentos, infecções em humanos e animais (SUDAGYDAN e AYDIN 2010; CIRKOVIC et al., 2012; ROSSI et al., 2016).

A síndrome do choque tóxico (TST) é causada pela TSST-1 e pode estar presente simultaneamente às enterotoxinas, principalmente, as dos tipos B e C (Schmitz et al., 1998). Juntas (TSST-1 e enterotoxinas estafilocócicas) são capazes de atuar como superantígenos nas células do sistema imune bovino, contribuindo potencialmente com os mecanismos patogênicos da mastite bovina (YOKOMIZO et al., 1995; FERENS et al., 1998).

1.3. Resistência a Antimicrobianos

A resistência aos β -lactâmicos tem sido reportada na literatura como um dos principais problemas relacionados à mastite, principalmente pelas taxas elevadas de resistência à penicilina (SHI et al., 2010; KALMUS et al., 2011; JAGIELSKI et al., 2014). A multirresistência também vem ocorrendo e, recentemente, Wang et al. (2014) observaram que 69% dos isolados provenientes de mastite bovina foram resistentes a mais de 10 antimicrobianos utilizados no tratamento da doença. *Staphylococcus* spp é capaz de adaptar-se à pressão de seleção e sofrer mutações nos seus genes ou pode adquirir genes de outras espécies. Os mecanismos de resistência são variados, incluindo alteração da permeabilidade de membrana ou da parede celular, expulsão ativa do

antibiótico para o exterior da célula e inibição ou inativação do antibiótico (Paiva et al., 2010). A via mais usual de tratamento da mastite é a intramamária, pois se espera que o antimicrobiano atinja uma concentração no úbere maior ou semelhante à concentração inibitória mínima (CIM) para o patógeno. Porém, a CIM é definida com base em testes de suscetibilidade realizados *in vitro* e não simula as condições encontradas *in vivo* pelo patógeno, o que pode contribuir para diminuir o efeito do tratamento (APPARAO et al., 2009). Além disso, se nenhuma terapia com antibiótico é realizada no período seco, a maioria destas infecções ainda estará presente após o parto. A emergência da resistência aos antimicrobianos e a dificuldade na identificação de novas classes de agentes antimicrobianos tem impulsionado a investigação de novas estratégias terapêuticas, como o uso de moléculas capazes de silenciar genes de virulência e terapia gênica em infecções. A interferência na regulação dos fatores de virulência, como no locus *agr*, também parece ser uma abordagem promissora (COSTERTON et al., 2009).

1.4. Caracterização molecular dos grupos *agr*, *spa* typing, MLST e PFGE

Estudos com *S. aureus*, isolados do gado leiteiro com mastite, vem utilizando vários métodos de tipagem molecular como o *Mult Locus Sequence Typing* (MLST) *spa* typing e *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), que possibilitam caracterizar esse patógeno através de comparações entre sequências descritas em diferentes partes do mundo, sendo possível traçar rotas de dispersão e demonstrar a disseminação global de vários clones. Vários estudos revelaram que apenas alguns clones específicos são responsáveis pela maioria dos casos de mastite em uma única fazenda e que alguns destes clones podem ter uma ampla distribuição geográfica (ZADOCKS et al., 2000; KATSUDA et al., 2005; SMITH et al., 2005).

A expressão da virulência em *S. aureus* é estreitamente regulada e a intensidade da infecção, associada a algumas cepas, depende da sua capacidade de mobilizar e expressar seus fatores de virulência. (Le MARECHAL et al., 2011a). Esse patógeno pode causar doenças em humanos e animais, colonizando diferentes sítios do hospedeiro. Para que isso ocorra, o micro-organismo utiliza um sistema de detecção de *quorum sensing* que, por meio de comunicação célula-a-célula, controla a regulação de vários desses fatores de virulência. Este sistema, conhecido como *locus agr* secreta um peptídeo auto indutor (AIP) de maneira dependente da densidade celular e possibilita que uma população bacteriana possa responder em conjunto, quando a densidade celular crítica é atingida (CAFISO et al., 2007). O *locus agr* é constituído por quatro genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), sendo ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a fase estacionária (VUONG et al., 2004). São conhecidos quatro grupos distintos desse *locus*, I, II, III e IV, todos determinados pelo polimorfismo da sequência de aminoácido de *AgrD* e *AgrC* (SHOPSIN et al., 2003). Estudos relacionaram isolados nesses grupos com diversos fatores de virulência e infecções. O grupo *agr* I está associado com casos de mastite; a resistência a antimicrobianos, com os grupos II e III; a formação de biofilme, aos grupos *agr* I e III e o grupo *agr* IV parece estar relacionado com isolados produtores de esfoliatina, envolvidas na síndrome da pele escaldada (JARRAUD et al., 2000; SAKOULAS et al., 2003; MOISE-BRODER et al., 2004; VAUTOR et al., 2007).

Os tipos de *spa* podem ser determinados com a amplificação e o sequenciamento da região X do gene da proteína A (*spa*), que contém repetições polimórficas diretas. Atualmente encontram-se disponíveis 17.006 *spa* types diferentes, em um servidor de livre acesso (spaserver.ridom.de). Eventualmente, observou-se estreita relação entre o tipo de *spa* e doenças em hospedeiros específicos, como o t034, mais encontrado em

infecções ligadas a suínos (HASMAN et al., 2010) e o t605, mais frequentemente associados a bovinos (Silva et al., 2013). O *software* Ridom StaphType (versão 1.4; Ridom GmbH, Würzburg, Alemanha) fornece uma ferramenta de software que permite a análise direta de sequências e designação de tipos de *spa* por sincronização através de um servidor central (STROMMENDER et al., 2006)

A técnica de MLST detecta variações que definem linhas clonais relativamente estáveis, através da presença de sete genes conservados (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmK*, *pta*, *tpi* e *yqiL*) (ENRIGHT et al., 2000). Pela variabilidade e diversidade nas sequências desses nucleotídeos, o MLST apresenta mais de 2.400 ‘sequências tipo’ (ST) para *S. aureus* (<www.mlst.net>). A grande maioria desses STs é agrupada em um número limitado de complexos clonais (CC) ou linhagens, os quais parecem estar distribuídos mundialmente. Os CC predominantes em *S. aureus* são CC1, 5, 8, 15, 22, 30, 45, 59, 80, 97 e 121 (NUBEL et al., 2011).

A técnica de PFGE desenvolvida em 1984 por Scharwartz and Canter. Consiste na digestão do genoma total bacteriano com enzimas de restrição, seguido de eletroforese em campo pulsado, que apresenta alto poder discriminatório, pois a alternância entre os sentidos do campo elétrico permite separar fragmentos que não seriam diferenciados em gel de agarose convencional (MASLOW & MULLIGAN, 1996). O padrão de bandas gerado (pulsotipo) pode ser analisado através de comparações dos perfis visualmente (TENOVER et al., 1995) ou através de softwares específicos, como o Bionumerics (CHURCH et al., 2011). É uma técnica com alta reprodutibilidade e considerada “padrão ouro” para uso em estudos epidemiológicos (PETERS, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F. M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, and L. B. Jensen. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37:127-137.
- Aiemsard, J., S. Aiumlamai, C. Aromdee, S. Taweechaisupapong, and W. Khunkitti. 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res. Vet. Sci.* 91:31-37.
- Arcuri, E. F., M.A.V. P. Brito, J. R. F. Brito, S. M. Pinto, F.F. Ângelo, and G. N. Souza. 2006. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58: 440-446.
- Apparao, D. J., L. Oliviera, and P. L. Ruegg. 2009. Relationship between in vitro susceptibility test results and treatment outcomes for gram-positive mastitis pathogens following treatment with pirlimycin hydrochloride. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234:1437-46.
- Bannerman, T. L., P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. *The American Society of Microbiology*, 384-404.
- Bergdoll, M.S. *Staphylococcus aureus*. New York, NY: Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc.; 1989.
- Botrel, M. A., M. Haenni, E. Morignat, P. Sulpice, J. Y. Madec, and D. Calavas. 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. *Foodborne Pathog. Dis.* 7: 479–487.

Cafiso, V., T. Bertuccio, M. Santagati, V. Demelio, D. Spina, G. Nicoletti, and S. Stefani. 2007. agr -Genotyping and transcriptional analysis of biofilm producing *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 51: 220-227.

Church, D. L., B. L. Chow, T. Lloyd, and D. B. Gregson. 2011. Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 69:30-7.

Cirkovic, I., M. Sorum, D. Radenkovic, M. Svabic Vlahovic, and A. R. Larsen. 2012. National surveillance reveals the first findings of Panton Valentine leukocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Serbia. J. Med. Microbiol. 62: 342-344.

Coser, S. M., M. A. Lopes, and G. M. Costa. Mastite Bovina: Controle e Prevenção. 2012. Boletim Técnico – Lavras/MG, 93.1-30. <http://www.editora.ufla.br/adm/upload/boletim/Bol93.pdf>

Costerton, W. J., L. Montanaro, N. Balaban, and C. R. Arciola. 2009. Prospecting gene therapy of implant infections. Int J Artif Organs. 32: 689-695.

CRL-AR. Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance Multiplex PCR for the detection of the *mecA* gene and the identification of *Staphylococcus aureus* National Food Institute. Technical University of Denmark. Copenhagen, 2009.

Dinges, M. P., P. Orwin, and Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13:16-34.

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Coleção Alemã de Micro-organismos e Cultura de Células). Em <http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genu s=Staphylococcus>. Acesso: 05de junho de 2017.

- Ferens, W. A., W. C. Davis., M. J. Hamilton, Y. H. Park, C. F. Deobald, L. Fox., and G. Bohach. 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* 66: 573-580.
- Gillet, Y., B. Issartel., P. Vanhems., J. Fournet, G. Lina., and M. Bes. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 359: 753-759.
- Halasa, T., K. Huijps, O. Osteras, and H. Hogeveen. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Quarterly* 29:18–31.
- Halasa, T., Nielen, M., De Roos, A. P., Van, H. R., De, J. G., Lam, T. J., Van, W.T., Hogeveen, H., and Van, H. R. 2009. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J. Dairy Sci.* 92: 599–606.
- Hasman, H., A. Moodley, L. Guardabassi, M. Stegger, R.L. Skov, F. M. Aarestrup. 2010. spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet Microbiol* 141:326–33.
- Ingavale, S., W. Willem, T. Luong., C. Lee, and A. Cheung. 2005. Rat/MgrA, a Regulator of Autolysis, Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus* *Infection and Immunity.* 73:1423–1431.
- Jagielski, T., E. Puacz, A. Lisowski, P. Siedlecki, W. Dudziak, J. Międzobrodzki, H. Krukowski. 2014. Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. *J. Dairy Sci.* 97:6122–6128.
- Jarraud, S., G. Lyon, A. M. S. Figueiredo, L. Gerard, F. Vandenesch, J. Etienne, T. W. Muir, R. P. Novick. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 182: 6517–6522.

- Kalmus, P., B. Aasmae, A. Karssin, T. Orro, and K. Kask. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scand.* 53:4.
- Kaneko, J. and Y. Kamio. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:981-1003.
- Katsuda K., E. Hata, H. Kobayashi, M. Kohmoto, K. Kawashima, H. Tsunemitsu, M. Eguchi. 2005. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet Microbiol.* 105:301–305.
- Lacerda Jr.; P. M. G., L. Zani Neto, D. C. Freitas. 1953. Estudos feitos sobre as mastites bovinas- contribuição aos estudos sobre mastites bovinas. *Rev. Fac. Med. Vet.* 5:55-64.
- Le Loir, Y., F. Baron, M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2:63-76.
- Le Marechal, C., N. Seyffert, J. Jardin, D. Hernandez, G. Jan, L. Rault, V. Azevedo, P. Francois, J. Schrenzel, M. Van De Guchte, S. Even, N. Berkova, R. Thiery, J. R. Fitzgerald, E. Vautor, Y. Le Loir. 2011a. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One.* 6:27354.
- Le Marechal, C., R. Thiery, E. Vautor, Y. Le Loir. 2011b. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-a review. *Dairy Sci. Technol.* 91: 247–282.
- Lina, G., G. A. Bohach, S. P. Nair, K. Hiramatsu, E. Jouvin-Marche, R. Mariuzza. 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 189:2334–2336.

- Luong, T., P. M. Dunman, E. Murphy, S. J. Projan, C. Y. Lee. 2006. Transcription Profiling of the *mgrA* Regulon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 188:1899-1910.
- Martins R. P., J. A. G. Silva, L. Nakazato, V. Dutra and E. S. Almeida Filho. 2010. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Ciênc. Anim. Bras.* 11:181-187.
- Maslow, J., M. E. Mulligan. 1996. Epidemiologic Typing Systems. *Infect. Control and Hosp. Epidem.* 17: 595-604.
- Mendonça, E. C. L., V. F. Marques, D. A. Melo, T. A. Alencar, I. S. Coelho, S. M. O. Coelho, M. M. S. Souza. 2012. Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis as a subsidy for the implementation of control measures. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32:859-864.
- Moise-Broder, P.A., G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, J. J. Schentag, A. Forrest, R. C. Moellering. 2004. Accessory gene regulator group II polymorphism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* 38:1700-1705.
- Nawrotek, P.; D. Czernomysy-Furowicz, J. Borkowski, K. Fijalkowski, and P. Pobucewicz. 2011. The effect of auto-vaccination therapy on the phenotypic variation of one clonal type of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Vet Microbiol* 155:434-437.
- Nubel, U., B. Strommenger, F. Layer, and W. Witte. 2011. From types to trees: reconstructing the spatial spread of *Staphylococcus aureus* based on DNA variation. *Int. J. Med. Microbiol.* 301:614–618.

Ono, H. K., K. Omoe, K. Imanishi, Y. Iwakabe, D. L. Hu, H. Kato, N. Saito, A. Nakane. T. Uchiyama, and K. Shinagawa. 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* 76: 4999–5005.

Ono, H. K., S. Hirose, I. Naito, Y. Sato'o, K. Asano, D - L. Hu, K. Omoe, and A. Nakane. 2017. The emetic activity of staphylococcal enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a small emetic animal model, the house musk shrew. *Microbiol Immunol*, 61: 12–16. doi:10.1111/1348-0421.12460

Overesch G, R. Stephan, and V. Perreten. 2013. Antimicrobial susceptibility of gram-positive udder pathogens from bovine mastitis milk in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 155:339-50. doi: 10.1024/0036-7281/a000469.

Peters, T. M. 2009. Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Epidemiology of Food Pathogens. *Methods Mol Biol.* 551:59-70. doi: 10.1007/978-1-60327-999-4_6.

Peton, V., Y. Leloir. 2013. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infections, Genetics and Evolutions* 21:602-615.

Pol, M.; Ruegg, P. L. 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 90:262–273.

Rahimi, E., and F. Alian. 2013. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Vet. Archiv.* 83:23-30.

Rall, V. L. M., E. S. Miranda, I. G. Castilho, C. H. Camargo, H. Langoni, F. F. Guimarães, and A. Fernandes Júnior. 2014. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *Journal Dairy Science* 97:829–837.

Ribeiro, A.C.C.L., and J. Furlong. 2007. Controle da Mastite. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) EMBRAPA.

Roberson, J. R, and V. Tech. The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* on Dairy Farms. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, pg. 38. 1999. Disponível em: <http://www.nmconline.org/articles/staphepid.htm> acesso: 17/07/2015.

Rossi, B.F.; Caracterização molecular e fenotípica de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina subclínica. 66 páginas. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências Botucatu-SP 29/06/2016.

Santana, E. H. W, V. Beloti, L. C. Aragon-Alegro, and M. B. O. C. Mendonça. 2010. Estafilococos em Alimentos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 77:545-554.

Santos, M. V., and L. F. L. Fonseca. Manejo de ordenha visando o controle de mastite e a melhoria da qualidade do leite. In: Estratégias Para Controle De Mastite E Melhoria Da Qualidade Do Leite. 1ª ed. Barueri: Editora Manole Ltda, p.78-94, 2007.

Sakoulas, G., G. M. Eliopoulos, J. R. R. C. Moellering, R. P. Novick, L. Venkataraman, C. Wennersten, P. C. Degirolami, M. J. Schwaber, and H. S. Gold. 2003. *Staphylococcus aureus* Accessory gene regulator (agr) Group II: Is there a Relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? The Journal of Infectious Diseases 187:929–38.

Sakwinska, O., M. Giddey, M. Moreillon, D. Morisset, A. Waldvogel, and P. Moreillon. 2011. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. Appl. Environ. Microbiol 77:5908–5915.

Schmitz, F.J., M. Steiert, H. V. Tichy, B. Hofmann, J. Verhoef, H. P. Heinz, K. Köhrer, and M. E. Jones. 1998. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. J. Med. Microbiol 47:341-351.

Seo, K. S., S. U. Lee, Y. H. Park, W.C. Davis, L. K. Fox, and G. A. Bohach. 2007. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Infect. Immun 75:260–269.

- Schukken, Y., M. Chuff, P. Moroni, A. Gurjar, C. Santisteban, F. Welcome, R. Zadoks. 2012. The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *Serratia*, and more. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 28:239-56. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.04.001.
- Shi, D., Y. Hao, A. Zhang, B. Wulan, and X. Fan. 2010. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. *Transbound. Emerg. Dis.*, 57:221–224.
- Shopsin, B., B. Mathema, P. Alcabes, B. Said-Salim, G. Lina, A. Matsuka, J. Martinez, and B. N. Kreiswirth. 2003. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *Journal Clinical Microbiology* 41:456-459.
- Smith, E. M., L. E. Green, G. F. Medley, H. E. Bird, and C. G. Dowson. 2005. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol* 43:4731–4736.
- Strommenger, B., C. Kettlitz, T. Weniger, D. Harmsen, A. W. Friedrich, and W. Witte. 2006. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, *Sma*I macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol* 44:2533–2540.
- Thomas, D.Y., S. Jarraud, B. Lemercier, G. Cozon, K. Echasserieau, J. Etienne, M. L. Gougeon, G. Lina, F. Vandenesch. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74: 4724-4734.
- TRABULSI, L.R. Microbiologia, São Paulo: Livraria ATHENEU. Editora, 6ª edição, 2015, 888p
- Vautor, E., H. Carsenti-Dellamonica, M. Sabah, G. Mancini, M. Pépin, P. Dellamonica. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep

farms (agr group, adherence, slime, resistance to antibiotics). Small Ruminant Research, 72:197-199.

Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. Deleo, M. A. Otto. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. The journal of Biological Chemistry 279:881–886.

Zhao, X., and P. Lacasse. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. JAS, 86:57-65.

Wang, X., Y. Wang, G. Guo, T. Usman, D. Hao, X. Tang, Y. Zhang, Y. Yu. 2014. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. Letters in Applied Microbiology 58:527-534.

Wilson, G. J., K. S. Seo, R. A. Cartwright, T. Connelley, O. N. Chuang-Smith, J. A. Merriman, C. M. Guinane, J. W. Park, G. A. Bohach, P. M. Schlievert, Y. I. Morrison, and J. R. Fitzgerald. 2011. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. Plos Pathogen 7: 1002271.

Yokomizo, Y., Y. Mori, Y. Shimoji, S. Shimizu, H. Sentsui, M. Kodama, H. Igarashi. 1995. Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. J. Vet. Med. Sci., 57:299-305.