

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Aline Leandra Carvalho Ferreira

***Staphylococcus aureus* DE ORIGEM BOVINA: tipagem genotípica e fenotípica de fatores de virulência, produção de biofilme, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos criticamente importantes e genes promissores ao desenvolvimento de vacinas**

Belo Horizonte
2021

Aline Leandra Carvalho Ferreira

***Staphylococcus aureus* DE ORIGEM BOVINA: tipagem genotípica e fenotípica de fatores de virulência, produção de biofilme, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos criticamente importantes e genes promissores ao desenvolvimento de vacinas**

Versão Final

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração:
Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Profa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Coorientadores: Prof. Fernando Nogueira de Souza e Dr. Alessandro de Sá Guimarães

**Belo Horizonte
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

F383s Ferreira, Aline Leandra Carvalho, 1980-
Staphylococcus aureus de origem bovina: tipagem genotípica e fenotípica de fatores de virulência, produção de biofilme, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos criticamente importantes e genes promissores ao desenvolvimento de vacinas/ Aline Leandra Carvalho Ferreira 2021.

110 f.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Bibliografia: f.97 a 109.

1. Bovino – Teses – 2. Mastite – Vacina - Teses – 3. Leite – Qualidade - Teses –
4. Ciência Animal - Teses - I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636 089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE LEANDRA CARVALHO FERREIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 31 de maio de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
 Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Marcelo Resende de Souza

Dr.(a). Camila Stéfanie Fonseca de Oliveira

Dr.(a). Eduardo Milton Ramos Sanchez

Dr.(a). Sérgio Caldas

	<p>Documento assinado eletronicamente por Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Membro de comissão, em 31/05/2021, às 14:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.</p>
	<p>Documento assinado eletronicamente por Camila Stefanie Fonseca de Oliveira, Membro, em 31/05/2021, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.</p>
	<p>Documento assinado eletronicamente por Marcelo Resende de Souza, Professor do Magistério Superior, em 31/05/2021, às 14:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.</p>
	<p>Documento assinado eletronicamente por Sérgio Caldas, Usuário Externo, em 31/05/2021, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.</p>
	<p>Documento assinado eletronicamente por Eduardo Milton Ramos Sanchez, Usuário Externo, em 31/05/2021, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.</p>

https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&codigo_verificador=0739646&codigo_crc=609A5043&hash_download... 1/2

14/06/2021

SEI/UFMG - 0739646 - Folha de Aprovação



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador **0739646** e o código CRC **609A5043**.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a toda Espiritualidade que ilumina e me dá segurança para seguir os caminhos.

Aos meus pais que generosamente apoiam e doam amor para meus projetos, e a minha Mommy gostaria de agradecer profundamente por me incentivar a seguir na vida acadêmica, nela me encontrei, e hoje este trabalho é NOSSO.

À minha irmã Carol e irmão Ulisses agradeço profundamente a paciência, reconhecimento e amor, pois sem vocês este e muitos outros trabalhos não teriam o menor sentido.

Ao Dani, meu amor, parceiro, amigo, cozinheiro, esposo, cuidador e apaixonado pela vida, gratidão eterna por tudo, não sei elencar suas contribuições nesta jornada. Te Amo.

Aos meus Doguinhos, Bob a Astro, quantos abraços e lambidas de amor recebi em momentos decisivos. Vocês iluminam meus dias.

Às minhas Madrinhas Rejane e Rute meu carinho eterno, pois este brilho e amor que irradiam são contagiantes e me fazem acreditar que tudo é possível.

Aos afilhados amados Caio, Daniel e Gabriel, eu gostaria de agradecer todo o carinho que vocês têm por mim. Este amor genuíno movimenta minha alma e a Madrinha Ama Vocês.

Aos meus primos e primas meu grande abraço e que bom ter vocês sempre torcendo e mandando boas vibrações para todas as minhas conquistas.

Aos meus grandes amigos e amigas que com tanto carinho sublime, me incentivaram a fazer mais este propósito de vida.

Às minhas amigas Cristiane Viana e Renata de Paoli meu grande agradecimento pelas dicas, carinho e doação para que este projeto se tornasse realidade.

À Escola de Veterinária da UFMG por me receber de braços abertos e permitir que eu hoje me tornasse um ser humano mais evoluído.

A minha Orientadora Profa. Mônica Pinho Cerqueira, grande no amor e exemplo, sua generosidade e retidão são contagiantes, gratidão por me ensinar que os caminhos são melhores quando abrimos a mente e alinhamos o coração.

Aos meus coorientadores Fernando Nogueira e Alessandro Guimarães, minha gratidão pelos inúmeros ensinamentos e pelo despertar a novos rumos. Vocês são inspiradores.

Aos professores Marcelo Resende, Cláudia Penna e Camila Oliveira, agradeço a vocês em nome de todos os professores, e vocês foram incríveis durante meus aprendizados. O ensino é realmente uma arte.

À toda equipe dos laboratórios do DTIPOA, em especial ao Cosme e Isabela que me auxiliaram em momentos decisivos.

Aos amigos da Pós-graduação Leandro Faúla, Sarah Veríssimo, Ana Cláudia Dumont, Ramon Alves, e a todos que me incentivaram e fizeram que este projeto caminhasse, minha gratidão.

À Fundação Ezequiel Dias, em especial ao Sérgio Caldas e Rodrigo Leite que foram caminhos de luz e segurança. A toda a equipe do Serviço de Biotecnologia e Saúde, Lulu, Aninha, Gilson, Fernanda, Marina e a Lalacs, minha gratidão eterna, nós formamos um time maravilhoso. Nesta casa fui recebida com muita alegria e respeito.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Souza que me acolheu no Laboratório de Enterotoxinas de Alimentos, da FUNED, e proporcionou grandes aprendizados. Ao Dr. Luiz Pataca, pesquisador que me privilegiou com aprendizados acerca das Análises de Componentes Principais e elevou meu trabalho a outro nível.

À toda equipe dos laboratórios de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, de forma especial ao Israel Guedes, José Ferronato, Luisa Moreno e Prof. Marcos Bryan pelo carinho e enorme contribuição neste projeto.

Ao laboratório de Toxinologia Molecular da FUNED com as pesquisadoras Clara Guerra, Elaine Teixeira e Priscila Souza que não mediram esforços em auxiliar este projeto. Gratidão

Ao laboratório de Microbiologia Oral de Anaeróbios, do ICB, UFMG, onde iniciei os experimentos e como você Silvinha é sensacional. Agradeço também, a generosidade e contribuição da Profa. Simone Gonçalves que permitiu tantos aprendizados.

À UFLA, em especial a minha amiga Rafaella que não mediu esforços e carinho com este trabalho, assim como a Dircéia e Profa. Elaine Dorneles que foram estrelas guias.

Ao Eduardo Ramos Sanchez que sempre me atendeu prontamente e me permitiu explorar novos caminhos na pesquisa.

Aos professores do UniBH, em especial a Dra. Carolina Freitas, Dr. Breno Mourão, Dra. Fabrizia Cury, Dr. Bruno Divino e Dra. Prhiscylla Sadanã que sempre me apoiaram de maneira fundamental e me motivaram para que tudo seguisse de forma leve e no caminho do bem. Gratidão.

Aos amigos e amigas do UniBH que me abraçaram durante esta mesclagem de graduação e doutorado, uma loucura sadia e de muito carinho. Fran, Dani, Mônica, Pedro e toda a turma meu agradecimento especial.

A Debi e Aldi minhas Amoras do coração, minha gratidão, por torcerem sempre por mim. Também a todos da turma de Ciências Biológicas do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix.

À Flávia minha grande parceira durante as fases mais decisivas do Doutorado, sem você nada disto teria acontecido.

À FAPEMIG e à FAPESP pelo apoio financeiro do projeto e à CAPES, pela concessão da bolsa.

Minha colcha de retalhos ...

RESUMO

O conhecimento dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* é fundamental para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos, uma vez que evidenciam o potencial de patogenicidade de cepas envolvidas na mastite bovina, e possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas. O objetivo central do trabalho foi associar os perfis genotípicos e fenotípicos, com a tipagem por *spa* Typing nos isolados de *S. aureus* de leite bovino, de forma a reunir evidências sobre a frequência dos genes ligados aos fatores de virulência, e suas possíveis relações na determinação da mastite. De forma específica foram observadas correlações entre os resultados do *spa* Typing, com a formação de biofilme e de resistência antimicrobiana, assim como as combinações entre os *spa* tipos com a frequência de genes promissores ao desenvolvimento de vacinas, as leucotoxinas, os superantígenos e o gene do transportador da lactose. De 56 animais com infecção intramamária subclínica e clínica, foram coletadas amostras de leite e das fossas nasais, com posterior confirmação de *S. aureus* por métodos microbiológicos, bioquímicos e PCR do gene *nuc*. Para identificação do painel dos fatores de virulência de *S. aureus* foram selecionados genes de regulação, produção de biofilme, resistência antimicrobiana, proteínas candidatas ao desenvolvimento de vacinas, leucotoxinas, superantígenos e do transportador da lactose. O fenótipo de formação de biofilme e a concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos criticamente importantes para uma saúde única também foram avaliados. As variações no gene da proteína A dos isolados de *S. aureus* foram avaliadas por *spa* Typing. Nos resultados houve amplificação simultânea de *agr*, *operon icaABCD* e gene *bap* em 42,2% dos isolados. O fenótipo fracamente aderente para formação de biofilme foi identificado em 86,2% dos isolados e a multirresistência foi detectada em 18,4%. O gene *lukED* esteve presente em 90,4% dos isolados e pode ser um mecanismo eficiente de manutenção do patógeno na glândula mamária, enquanto o *pvl* foi identificado em 0,9%. Nenhum superantígeno avaliado (*sea*, *seb*, *sec1* e *tst*) foi identificado nos rebanhos e o gene transportador da lactose foi observado em 99,7% dos isolados. A presença dos genes *sdrE*, *isdH*, *eno*, *fusA*, *pgk*, *cysS*, *atpF* e *dapE* foi frequentemente observada nos rebanhos, sugerindo que são conservados e adequados para futuros inquéritos epidemiológicos que buscam alvos gênicos codificadores de antígenos, para as vacinas contra a mastite bovina causada por *S. aureus*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, *spa* Typing, fatores de virulência, resistência, vacinas, leucotoxinas, lactose, leucotoxinas.

ABSTRACT

The knowledge of the virulence factors of *Staphylococcus aureus* is essential for the development of epidemiological studies, as they show the potential pathogenicity of strains involved in bovine mastitis, and possible targets for the development of vaccines. The main objective of the work was to associate the genotypic and phenotypic profiles, with typing by spa Typing in *S. aureus* isolates from bovine milk, to gather evidence on the frequency of genes linked to virulence factors, and their possible relationships in the determination of mastitis. Specifically, correlations were observed between the results of the spa Typing, with the formation of biofilm and antimicrobial resistance, as well as the combinations between the spa types with the frequency of promising genes for the development of vaccines, leukotoxins, superantigens and the gene of the lactose carrier. From 56 animals with subclinical and clinical intramammary infection, samples of milk and nasal cavities were collected, with subsequent confirmation of *S. aureus* by microbiological, biochemical and *nuc* gene PCR. To identify the panel of *S. aureus* virulence factors, regulatory genes, biofilm production, antimicrobial resistant, candidate proteins for vaccine development, leukotoxins, superantigens and the lactose transporter were selected. The biofilm formation phenotype and the minimal inhibitory concentration of ten antimicrobials critically important for unique health were also evaluated. Variations in the protein A gene of *S. aureus* isolates were evaluated by spa Typing. The results showed simultaneous amplification of *agr*, *icaABCD* operon and *bap* gene in 42.2% of the isolates. The weakly adherent phenotype for biofilm formation was identified in 86.2% of the isolates and multidrug resistance was detected in 18.4%. The *lukED* gene was present in 90.4% of the isolates and can be an efficient mechanism for maintaining the pathogen in the mammary gland, while *pvl* was identified in 0.9%. No evaluated superantigen (*sea*, *seb*, *sec1* and *tst*) was identified in the herds and the lactose transporter gene was observed in 99.7% of the isolates. The presence of the *sdrE*, *isdH*, *eno*, *fusA*, *pgk*, *cysS*, *atpF* and *dapE* genes was frequently observed in herds, suggesting that they are conserved and suitable for future epidemiological surveys seeking antigen-coding gene targets for vaccines against bovine mastitis caused by *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, spa Typing, virulence factors, resistance, vaccines, lactose, leukotoxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1. Placa de microdiluição de 96 poços para avaliação em duplicata dos isolados de *Staphylococcus aureus*, com dez pontos de diluições da concentração dos antimicrobianos. Os poços 11 e 12 foram utilizados para aplicação do controle de referência (inóculo) e do controle negativo (caldo Mueller-Hinton) 33
- Figura 2. Frequência relativa dos tipos de aderência do biofilme após a realização do teste em placa de poliestireno nos rebanhos A, B, C e D. * Houve associações estatisticamente significativas da aderência do biofilme e os rebanhos, no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$) 40
- Figura 3. Distribuição da frequência relativa dos genes *icaABCD* e *bap* nos isolados de *Staphylococcus aureus* entre os rebanhos A, B, C e D. * Houve associações estatisticamente significativas da presença dos genes e os rebanhos, no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$) 41
- Figura 4. *Minimal spanning tree* (MST) dos 216 isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com os genótipos identificados. A: distância de distribuição isolados nos *spa* tipos. B: variações dos genótipos nos rebanhos 54
- Figura 5. Dendrograma com agrupamentos pela metodologia UPGMA das associações entre as variáveis apresentadas no mapa perceptual 55
- Figura 6. Dendrograma com agrupamentos pela metodologia UPGMA das associações entre o fenótipo e genótipo de biofilme, *spa* tipos e origem da mastite 57
- Figura 7. Dendrograma com agrupamentos pela metodologia UPGMA das associações entre o fenótipo dos antimicrobianos, *spa* tipos e origem da mastite 59
- Figura 8. A: Mapa perceptual das variáveis que demonstraram associação no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$), representadas nos 4 quadrantes (1º ao 4º). B: Gráficos de posições relativas das observações 62

Capítulo 2

- Figura 1. Frequência relativa dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas entre os rebanhos. *indicam associações estatisticamente significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$) 88
- Figura 2. Frequência relativa dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas entre os *spa* tipos. *indicam associações estatisticamente significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$) 89
- Figura 3. A: Frequência dos genes de leucotoxinas entre os rebanhos e nas categorias de *spa* tipos. B: Frequência dos isolados distribuídos entre os genes alvos de vacinas leucotoxinas e do transportador da lactose. * indicam associações estatisticamente significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$) 91

Figura 4.	Dendrograma com o agrupamento das variáveis apresentadas no mapa perceptual, pela metodologia UPGMA	93
Figura 5.	<i>Minimal spanning tree</i> (MST) dos 216 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de mastite bovina distribuídas entre <i>lukE-lukD</i> , <i>sdrD</i> e <i>sdrE</i> nos <i>spa</i> tipos	95
Figura 6.	<i>Minimal spanning tree</i> (MST) dos 216 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de mastite bovina. A: Distribuição de <i>sdrD</i> entre os <i>spa</i> tipos. B: Distribuição de <i>sdrE</i> entre os <i>spa</i> tipos	96
Figura 7.	A: Mapa perceptual das variáveis com associação no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$), nos 4 quadrantes (1° ao 4°). B: Gráficos das posições relativas dos isolados	98

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.	Município, vacas em lactação, produção de leite e número de isolados incluídos por amostras de leite e <i>swab</i> nasal nos respectivos rebanhos bovinos leiteiros, para fenotipagem e genotipagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Tabela 2.	Primers dos genes <i>nuc</i> e <i>agr</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizados na qPCR	29
Tabela 3.	Primers dos genes <i>icaABCD</i> e <i>bap</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizados na qPCR	30
Tabela 4.	Intervalos e valores de corte utilizados para concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para <i>Staphylococcus aureus</i> . O Intervalo foi baseado no EUCAST (2019). As distribuições incluem concentração inibitória mínima de estudos nacionais e internacionais, como programa de vigilância de resistência (Alexander, BSAC, ECO-SENS, MYSTIC, NORM e SENTRY), artigos publicados, programas de desenvolvimento de medicamentos da indústria farmacêutica, programas veterinários e de laboratórios individuais (acesso em junho de 2020)	32
Tabela 5.	Controle de referência e os respectivos intervalos para os testes de concentração inibitória mínima dos antimicrobianos. O asterisco indica o microrganismo definido para o respectivo antimicrobiano	33
Tabela 6.	Classes e subclasses dos antimicrobianos categorizados de acordo com a <i>European Medicines Agency</i> . Os genes de resistência indicados foram utilizados como alvos para a PCR dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes e indeterminados do teste de concentração inibitória mínima	35
Tabela 7.	<i>Primers</i> e tamanhos de <i>amplicons</i> dos genes de resistência dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes e indeterminados, após o teste de concentração inibitória mínima	36
Tabela 8.	<i>Primers</i> e <i>amplicons</i> para avaliação da presença do gene da proteína A	37
Tabela 9.	Frequência Absoluta e relativa dos 216 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> nas classificações resistente, indeterminado e susceptível para os antimicrobianos	42
Tabela 10.	Frequência relativa dos antimicrobianos após classificações em susceptíveis, indeterminados e resistentes no teste de concentração inibitória mínima entre os rebanhos	44
Tabela 11.	Número de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes no teste de concentração inibitória mínima, distribuição entre os <i>spa</i> tipos e identificação de genes de resistência	45
Tabela 12.	Frequência dos <i>spa</i> tipos nos rebanhos A, B, C e D	46
Tabela 13.	Distribuição das frequências dos <i>spa</i> tipos nos quatro rebanhos. Houve associações estatisticamente significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$), indicado pelo asterisco. Os dois asteriscos indicam inclusão dos isolados na categoria outros	47
Tabela 14.	Distribuição dos genótipos do biofilme, por rebanho e <i>spa</i> tipo	48

Tabela 15. Classificação dos antimicrobianos de acordo com o perfil de resistência ou susceptibilidade, apresentados pelos isolados no teste de concentração inibitória mínima, e os respectivos <i>spa</i> tipos. O asterisco indica frequência relativa dos fenótipos	50
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Proteínas candidatas a vacina, seus respectivos genes, <i>primers</i> , <i>amplicons</i> e controles de referência para amplificação de isolados de <i>S. aureus</i> por qPCR	83
Tabela 2. Leucotoxinas com os respectivos genes, <i>primers</i> , <i>amplicons</i> , controles de referência e localização para amplificação de isolados de <i>S. aureus</i> por qPCR	84
Tabela 3. Distribuição da frequência dos genes alvos de vacinas, leucotoxinas e do transportador da lactose nos diferentes rebanhos e <i>spa</i> tipos	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aacA-aphD - Aminoglycosides resistance – aminoglycoside modifying enzyme
agrA - Accessory gene regulator A
agrB - Accessory gene regulator B
agrC - Accessory gene regulator C
agrD - Accessory gene regulator D
AMP - Ampicilina
ATCC - American Type Culture Collection
ATM - Antimicrobiano
atpF - FOF1 ATP synthase subunit α
bap - Proteína de associação ao biofilme
BHI - Brain Heart Infusion Broth
blaZ - Beta-lactamase
CC - Complexo clonal
CEF - Ceftiofur
Cfr - Chloramphenicol–florfenicol resistance gene
CIP - Ciprofloxacino
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
Clf - Clumping factors
ClfB - Clumping factor B
cysS - Cisteinil-tRNA sintetase
dapE - Succinyl-diaminopimelate desuccinylase
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
DOCN - Densidade óptica do controle negativo
drfA - Dihydrofolate reductase A gene (Sulfamethoxazole – Trimethoprim resistance)
drfB - Dihydrofolate reductase B gene (Sulfamethoxazole – Trimethoprim resistance)
EMA - European Medicines Agency
eno - Enolase
ermA - Erythromycin-resistant methylase A
ERI - Eritromicina
estDL136 - Chloramphenicol - resistance acetate esterase
EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAG - Fator de alongamento G (Ef-G)
fexA - Florfenicol-chloramphenicol resistance gene
FFC - Florfenicol
FGQ - Fosfogliceratoquinase
FUNED - Fundação Ezequiel Dias
fusA - Elongation factor G gene
GEN - Gentamicina
gyrB - DNA gyrase subunit B
icaA - Intercellular adhesion protein A
icaB - Intercellular adhesion protein B

icaC - Intercellular adhesion protein C
icaD - Intercellular adhesion protein D
IIM - Infecções intramamárias
IsaB - Antígeno de superfície imunodominante B
isdA - Iron regulated surface determinant A
isdB - Iron regulated surface determinant B
isdH - Iron regulated surface determinant H
lacE - Lactose-specific enzyme II
lukED - Leucotoxin ED
mecA - Methicillin-resistant (PBP2a)
mecC - Methicillin-resistant (PBP2)
mepA - Multidrug export protein gene (Fluoroquinolone-resistant)
MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MSCRAMM - Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MSSA - Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*
MST - Minimum Spanning Trees
NOV - Novobiocina
nuc - Gene da termonuclease
OIE - Organização Mundial da Saúde Animal
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORSA - Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*
OXA - Oxacilina
pb - Pares de bases
PBS - Tampão fosfato-salino
PCR - Reação em cadeia da polimerase
pgk - Phosphoglycerate kinase
PIA - Proteína adesina polissacarídica intercelular
pvl - Gene da leucotoxina de Panton-Valentine
qPCR - PCR em tempo real
RNA - Ácido ribonucléico
S. aureus - *Staphylococcus aureus*
SAg - Toxinas superantigênicas
SaPI - Ilhas de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*
sarA - Gene regulador acessório estafilocócico
SCC*mec* - *Staphylococcal cassette chromosome mec*
sdrE - Serine-aspartate repeat protein E
sdrD - Serine-aspartate repeat protein D
SDD - Succinil diaminopimelato desuccinilase
SE - *Staphylococcal enterotoxins*
spa - *Staphylococcus protein A gene*
ST - Sequência tipo
SUT - Sulfametoxazol + Trimetoprima
TET - Tetraciclina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
OBJETIVOS	21
Objetivo geral	21
Objetivos específicos	21
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICES	118
Considerações Finais	118
Perspectivas Futuras	118

CAPÍTULO 1

Tipagem fenotípica e genotípica de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite e swab nasal de bovinos associados à formação de biofilme e resistência antimicrobiana	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Local do estudo	25
2.2 Amostras e caracterização dos rebanhos leiteiros	25
2.3 Critério de inclusão dos isolados	27
2.4 Ativação e caracterização fenotípica dos isolados	27
2.5 Confirmação da identificação dos isolados por Análise Proteômica	28
2.6 Extração de DNA	28
2.7 Padronização dos <i>primers</i> para PCR em tempo real	28
2.8 Análise dos genes da termonuclease <i>e agr</i>	29
2.9 Análise do fenótipo e genótipo da produção de biofilme	30
2.9.1 Teste de aderência do biofilme em placa de poliestireno	30
2.9.2 qPCR dos genes associados a produção de biofilme	30
2.10 Avaliação do fenótipo e genótipo associados à resistência antimicrobiana	31
2.10.1 Teste de concentração inibitória mínima <i>in vitro</i>	31
2.10.2 Padronização e amplificação de genes associados à resistência antimicrobiana por qPCR e PCR convencional	34
2.11 PCR convencional da região X da proteína A	36
2.12 Purificação e sequenciamento da região X da proteína A	37
2.13 Edição e análise das sequências de nucleotídeos	37
2.14 Análise estatística	38
3. RESULTADOS	39
3.1 Avaliação dos testes de inclusão dos isolados e do gene constitutivo <i>nuc</i>	39

3.2	Avaliação da amplificação do gene <i>agr</i>	40
3.3	Caracterização do fenótipo e genótipo do biofilme nos isolados	40
3.4	Fenótipo e genótipo dos antimicrobianos avaliados	42
3.4.1	Concentração inibitória mínima dos isolados frente aos antimicrobianos	42
3.4.2	Categorização dos antimicrobianos, PCR e qPCR dos isolados resistentes e indeterminados	45
3.5	Distribuição dos <i>spa</i> tipos nos rebanhos	46
3.5.1	Biofilme e <i>spa</i> Typing	47
3.5.2	Antimicrobianos e <i>spa</i> Typing	48
3.5.3	Análise das sequências do <i>spa</i> Typing	52
3.5.4	Análise de correspondência	61
4.	DISCUSSÃO	63
5.	CONCLUSÕES	75

CAPÍTULO 2

Variabilidade genética, fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina e potencial para o desenvolvimento de vacinas		77
1.	INTRODUÇÃO	78
2.	MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1	Critério de inclusão dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas	81
2.2	PCR dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas	82
2.3	PCR dos genes de leucotoxinas, superantígenos e enzima EII	82
2.4	<i>spa</i> Typing dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	85
2.5	Análise estatística	85
3.	RESULTADOS	86
3.1	Distribuição dos genes candidatos a vacinas entre os rebanhos e <i>spa</i> tipos	86
3.2	Análise dos genes de leucotoxinas e superantígenos nos rebanhos e <i>spa</i> tipos	84
3.3	Análise do gene <i>lacE</i> nos rebanhos e <i>spa</i> tipos	92
3.4	Análise das sequências do <i>spa</i> Typing	92
3.5	Análise de correspondência dos resultados	97
4.	DISCUSSÃO	99
5.	CONCLUSÕES	104

INTRODUÇÃO GERAL

A mastite bovina representa uma das doenças mais comuns que afetam a produção leiteira mundial, sendo responsável pela diminuição da quantidade e da qualidade do leite produzido (RUEGG, 2017). *Staphylococcus aureus* vem sendo considerado como uma das principais causas de infecções intramamárias (IIM) em bovinos (TENHAGEN et al., 2006), além de representar importantes perdas econômicas na indústria de laticínios e potenciais prejuízos sobre o bem-estar e a longevidade do gado (DE VLIEGHER et al., 2012).

A análise molecular e a patogênese sugerem que o hospedeiro ancestral de *Staphylococcus aureus* seria o homem (NG et al., 2009) e os dados filogenéticos estimam uma origem entre 25.000 a 142.000 anos (WEINERT et al., 2012). O relato da primeira transmissão de *S. aureus* isolado de humanos para bovídeos ocorreu há 5.512 anos, período que corresponde à expansão da agricultura em todo o Velho Mundo (GRACE; FETSCH, 2018).

Em humanos, estudos de vigilância epidemiológica em vários centros de pesquisa demonstram que as doenças estafilocócicas têm ocorrido de maneira dinâmica, apresentando mudanças significativas (CHAMBERS; DELEO, 2009).

Estudos anteriores sobre o genoma de *S. aureus* mostraram uma regularidade cromossômica, de forma que alguns genes foram conservados em todas as cepas, enquanto outros apresentaram-se variáveis (LINDSAY; HOLDEN, 2004). Os genes centrais e acessórios correspondem à cerca de 75% e 25% do genoma bacteriano de *S. aureus*, respectivamente.

Os genes centrais são geralmente associados ao metabolismo e outras funções de manutenção, comuns a todas as cepas. O genoma acessório representa o conteúdo mais variável dos genes, os *mobile genetic elements* (MGE) que podem ter sido introduzidos por transferência horizontal (MAGRO et al., 2017). A esta porção pertencem os genes localizados em ilhas de patogenicidade, fagos, plasmídeos, transposons e *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) (LINDSAY; HOLDEN, 2004). Em particular, os SCC abrigam genes de resistências à meticilina, e outros mecanismos de resistência em *S. aureus* (ITO et al., 2003). As distribuições dos MGEs são frequentemente associadas às linhagens e cepas, visto que cada uma possui um único SauI (sistema de restrição e modificação) que limita a transferência horizontal de genes (WALDRON; LINDSAY, 2006).

Durante as fases da infecção intramamária (IIM) por *S. aureus* existe uma expressão diferenciada dos fatores de virulência, e a maior parte está sobre o controle de reguladores

globais como o *accessory gene regulatory* (Agr). A dinâmica destes reguladores modula a IIM, principalmente pelo mecanismo, *quorum sensing*, via *locus agr* (BAI; RAI, 2011).

A formação de biofilme em *S. aureus* está sob o controle de dois loci genéticos, um regulador acessório estafilocócico (*sarA*) e o sistema AGR (SHENKMAN et al., 2001; ZHANG et al., 2018) que atuam sobre o *operon icaABCD* e o gene *bap* (LASA; PENADÉS, 2006). A expressão do *operon* permite a codificação da adesina intercelular polissacarídica (PIA), descrita como a principal molécula de adesão (JOO; OTTO, 2012), e o gene *bap* produz a proteína de associação ao biofilme (Bap). O processo de formação do biofilme ocorre de forma complexa e depende de vários fatores, como disponibilidade de nutrientes, valor de pH, nível de oxigênio e propriedades de superfície (OTTO, 2018).

O impacto da resistência e a eliminação dos biofilmes vem despertando um conhecimento mais aprofundado do termo Saúde Única que inclui humanos, animais e ambiente. A resistência aos antimicrobianos representa no cenário mundial, uma preocupação, visto que os MGEs são transmitidos na contramão do desenvolvimento das medicações.

Em geral, a resistência antimicrobiana pode ser determinada pela inativação do fármaco por enzimas e modificações nos receptores da célula, sendo o aparecimento destes fatores ligados a mutações, transdução, transformação e conjugação gênica. A mastite subclínica vem sendo a forma mais frequente de *S. aureus* causar infecções que tendem a tornar-se crônicas e difíceis de erradicar por terapias antimicrobianas convencionais (MITRA et al., 2013).

As vacinas comerciais para o enfrentamento da mastite bovina têm apresentado baixa proteção e alcance da cura, além de elevado custo-benefício. Vários fatores que contribuem para a falta de proteção incluem alvos inadequados, alta diversidade entre as cepas, variação da resposta imune de vaca para vaca e falha no processo que desencadeia a resposta imune apropriada para proteção contra um patógeno altamente complexo (CÔTÉ-GRAVEL; MALOUIN, 2018).

A avaliação de genes relacionados às proteínas de superfície celular, essenciais para o desenvolvimento do processo infeccioso, assim como de proteínas citosólicas, pode ser determinante no desenvolvimento de vacinas contra a mastite por *S. aureus*. Apesar de as proteínas de superfície serem consideradas cruciais para a prevenção de novas infecções (GONG et al., 2010; PROCTOR, 2012), as proteínas do citosol de *S. aureus*, também são importantes antígenos que não podem ser descartados na prevenção e cura do animal (CUNHA, 2015) nas IIM.

Desta forma, a análise da frequência dos genes *serine-aspartate repeat protein D and E* (*sdrD* e *sdrE*), *Iron regulated surface determinant H* (*isdH*) (ROSA, 2016), *enolase* (*eno*), *FOF1 ATP synthase subunit α* (*atpF*), *elongation factor G* (*fusA*), *cisteinil-tRNA sintetase* (*cysS*), *phosphoglycerate kinase* (*pgk*) e *succinyl-diaminopimelate desuccinylase* (*dapE*) (CUNHA, 2015), em rebanhos bovinos pode auxiliar na escolha adequada de alvos vacinais.

As *staphylococcal enterotoxin* (*SE*, produtoras de êmese em primatas) e *SEIs* (enterotoxinas-like, não produtoras de emese ou não testadas) podem ser separadas em grupos evolutivos, com base na comparação das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos (FISHER et al., 2018). Usualmente, ainda são classificadas em enterotoxinas (*SE*) clássicas (*SEA-SEE*), por remeterem à maioria dos relatos mundiais das intoxicações, e os novos tipos (*SEG-SE/Y*) que podem ter casos subnotificados por carência de testes de detecção. No total, já foram identificadas 27 enterotoxinas produzidas por *S. aureus* (SCHWENDIMANN et al., 2020), sendo no geral, *SEA* a mais frequente nas ocorrências de surtos alimentares (ALJASIR; D'AMICO, 2020).

Este grupo de superantígenos vem sendo caracterizado, na maioria das vezes, pela estabilidade térmica e persistência às condições adversas do trato gastrointestinal humano, podendo levar a quadros de intoxicação graves e ocasionalmente fatais (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

As leucotoxinas representam uma família de proteínas formadoras de poros, principalmente nas células fagocíticas, e são consideradas fatores de virulência de *S. aureus*. A participação de leucotoxinas, como as bi-componentes LukE-D e a Panton Valentine (PVL), na colonização da glândula mamária de bovinos, vem permitindo que o microrganismo escape do sistema imune com maior eficiência. O gene *lukE-lukD* está localizado na ilha de patogenicidade, SapIn3/SapIm3 (KURODA et al., 2001), enquanto a aquisição do locus *luk-PV* foi atribuída à ação lisogênica de bacteriófagos (KANEKO et al., 1997). As ilhas de patogenicidade de *S. aureus* (SaPIs) são um tipo de MGE que desempenham um papel significativo na patogênese e virulência, muitas vezes sem o limite de barreiras de gênero e espécie, nas transferências de genes.

A avaliação da frequência da enzima EII, específica para o transporte da lactose de *S. aureus*, pode indicar uma estreita relação sobre o metabolismo de carboidratos da bactéria, uma vez que participa da etapa de crescimento, e pode ser considerada um fator de virulência do microrganismo (SHARER et al., 2010).

Os fatores de virulência e perfil de resistência antimicrobiana dos isolados de *S. aureus*, aliados aos *spa* tipos, permitiram que as cepas fossem agrupadas em conjuntos clonais, e assim puderam ser comparadas, quanto as diferenças e similaridades. A técnica utiliza a região X da proteína A e produz resultados robustos, custos reduzidos, rápida execução, e ainda aplicações em estudos macroepidemiológicos e evolutivos (O'HARA et al., 2015).

O objetivo central do trabalho foi associar a tipagem por *spa* Typing aos resultados genotípicos e fenotípicos de formação de biofilme e resistência antimicrobiana, assim como relacionar os *spa* tipos com a frequência de genes promissores ao desenvolvimento de vacinas, leucotoxinas, superantígenos e do transportador da lactose em isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar genotipicamente e fenotipicamente alguns fatores de virulência, perfis de resistência antimicrobiana e variantes clonais de *S. aureus*, aliado à verificação da frequência de genes promissores ao desenvolvimento de vacinas.

Objetivos específicos

Avaliar os isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de leite e de *swab* nasal de vacas infectadas, portadoras de mastite subclínica e clínica, de forma a:

- identificar a distribuição dos *spa* tipos e fatores de virulência dentro e entre rebanhos leiteiros de Minas Gerais;
- comparar os *spa* tipos com genótipo e fenótipo da formação de biofilme e da resistência antimicrobiana;
- avaliar a frequência dos genes que codificam as enterotoxinas e leucotoxinas, entre os *spa* tipos;
- investigar a presença do gene transportador da lactose;
- identificar a frequência de genes potencialmente ligados ao desenvolvimento de vacinas, nos diferentes *spa* tipos.

CAPÍTULO 1

Tipagem fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de leite e *swab* nasal de bovinos associados à formação de biofilme e resistência antimicrobiana

1. INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos procariontes e unicelulares que não possuem membrana nuclear ou organelas membranosas. *Staphylococci* tem a parede celular típica das bactérias Gram positivo. Desde o ano 1890, *Staphylococcus aureus* vem sendo isolada de glândulas bovinas inflamadas (DIVERS; PEEK, 2008).

A família Staphylococcaceae abriga microrganismos que morfologicamente se apresentam como cocos, organizados como se fossem cachos de uvas, aos pares ou isolados. Algumas características, como a anaerobiose facultativa, imobilidade, ausência de esporos, teste de Gram positivo e presença das enzimas catalase e coagulase, auxiliam na identificação das espécies, como no caso de *S. aureus*.

S. aureus possui um único cromossomo circular de aproximadamente 2,8 Mega bases que codifica cerca de 2.600 genes, com conteúdo de GC de 32,8%. Ainda, segundo ZUBAIR et al. (2015) existe uma variabilidade significativa nos genomas, sendo a maior parte pela presença ou ausência de elementos genéticos acessórios, incluindo múltiplos profagos, transposons e plasmídeos.

Mundialmente, as IIM causadas pela presença de *S. aureus* têm sido responsáveis pelas maiores perdas econômicas nas explorações bovinas leiteiras, (SCHLEGELOVÁ et al., 2003) e, segundo KLEIN et al. (2012) corresponderam a aproximadamente 30% de todos os casos de mastite bovina. O patógeno atua como a principal bactéria causadora da mastite bovina contagiosa (HATA et al., 2010), e embora já tenha sido isolada de outros sítios anatômicos extramamários, como também no ambiente de fazendas leiteiras, a glândula mamária em lactação vem sendo o seu principal reservatório (SMITH et al., 2005a, 2005b). Em relação a outras fontes do patógeno, a presença de cepas de *S. aureus* foi identificada por SANTOS et al. (2020), a partir de amostras coletadas da fossa nasal, e também do leite de vacas com mastite subclínica.

A mastite clínica pode ser definida como a inflamação de pelo menos um quarto mamário, com alterações macroscópicas no leite, além de possíveis mudanças clínicas locais e sistêmicas, em virtude da resposta inflamatória. Na mastite subclínica, apesar de a inflamação estar presente, não existem mudanças visíveis no estado do animal e no leite (BLOWEY; EDMONDSON, 2010).

Na fase aguda da mastite clínica são rotineiramente observados sinais repentinos e graves, e na fase crônica os sinais podem ser mais brandos e expressos por longo tempo. As formas clínicas

e subclínica podem ser divididas em contagiosa e ambiental, dependendo do microrganismo causador da IIM, e *S. aureus* geralmente cursa com a mastite subclínica contagiosa.

A presença de variações genotípicas nos casos de mastite clínica e subclínica nos rebanhos vem promovendo estudos quanto à aquisição de resistência antimicrobiana, aos mecanismos de virulência e ao perfil clonal de *S. aureus*. Destaca-se que a infecção intramamária (IIM) representa inúmeras perdas para a cadeia produtiva e riscos à saúde, principalmente quando o microrganismo resiste às adversidades.

Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) junto à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) vem estabelecendo critérios para categorizar os antimicrobianos quanto a importância que representam, e os riscos de resistência em favor de uma Saúde Única (*One Health*) (KLAAS; ZADOKS, 2018).

Em 2019, a OIE listou os antimicrobianos em três categorias (criticamente importantes, altamente importantes e de importância veterinária) e, somadas às recomendações da OMS, há orientações para os médicos veterinários sobre a prioridade de escolha de antimicrobianos nos tratamentos de doenças, como mastites causadas por *S. aureus*. O termo MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina, também é utilizado para *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA), e o isolamento de MRSA em animais foi relatado pela primeira vez em 1972, seguindo sua detecção no leite de vacas com mastite (DEVRIESE et al., 1972).

A alteração de mecanismos de resistência pode ter origem variada, e geralmente, quando ocorre por mutação produz uma alteração no sítio de ação do antimicrobiano, enquanto a resistência via aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou a destruição do antimicrobiano, sendo transmitida por plasmídeos e transposons (SANTOS et al., 2007).

Na formação do biofilme, inicialmente ocorre uma modificação no microambiente bacteriano que, na sequência, promove alterações adicionais na expressão gênica, com posterior maturação do biofilme (JEFFERSON, 2004). A presença do biofilme auxilia *S. aureus* a resistir às terapias antimicrobianas (CUCARELLA et al., 2004), via controle poligênico dos genes *ica*ABCD que integram o *operon ica* (adesão intercelular) e do gene *bap* codificador da proteína de associada ao biofilme.

Uma variedade de métodos moleculares é atualmente utilizada para tipagem de isolados de *S. aureus*, dos quais a tipagem de proteína A estafilocócica (*spa*) é uma das mais comuns (SANTOS et al., 2020). A tipagem de *spa* tem sido considerada adequada nos estudos epidemiológicos (ŠTĚPÁN et al., 2004), devido à reprodutibilidade e fácil uso, além da possível

permuta entre os dados com o *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) que representa uma grande melhoria (AIRES-DE-SOUSA et al., 2006).

Desta forma, a análise por sequenciamento da proteína A permite a identificação da natureza clonal, e os *spa* tipos podem ser acompanhados e comparados, durante os inquéritos epidemiológicos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar os *spa* tipos de *S. aureus* isolados de leite e *swab* nasal, associados ao fenótipo e genótipo de biofilme e da resistência antimicrobiana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado em três municípios de Minas Gerais, estado localizado na região Sudeste do Brasil. Em 2019, Minas Gerais apresentou um efetivo de rebanho com 22.020.979 cabeças, do qual 3.136.748 representavam vacas ordenhadas e uma participação de 27,11% na produção leiteira no Brasil, a maior entre os estados brasileiros (IBGE, 2020). Em 2020, alcançou o volume de 6.509 bilhões de litros de leite, sendo responsável pela maior elevação absoluta na produção no período, com incremento de 224 milhões de litros em relação a 2019 (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2021).

O Estado de Minas Gerais está dividido em 12 mesorregiões, sendo o Município de Quartel Geral localizado na mesorregião Central Mineira, com 3.150 vacas leiteiras, e produção de 11.250 litros de leite/dia (IBGE, 2020). O Município de Prudente de Moraes está localizado na mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, com aproximadamente 548 vacas leiteiras, e produção de 1.630 litros de leite/dia (IBGE, 2020). A mesorregião Zona da Mata representa uma das principais bacias leiteiras do Brasil (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2021), da qual faz parte o Município de Coronel Pacheco com um efetivo de 1.706 vacas ordenhadas e capacidade leiteira de 6.734 litros de leite/dia (IBGE, 2020).

2.2 Amostras e caracterização dos rebanhos leiteiros

Para a realização do presente trabalho foram incluídos isolados de *S. aureus* obtidos a partir de 212 amostras de leite e seis amostras de *swab* nasal, coletadas em quatro rebanhos leiteiros, entre os anos de 2013 a 2015. As amostras foram incluídas por conveniência, a partir de um banco de isolados, primariamente coletadas para os estudos desenvolvidos por LADEIRA (2017) e SANTOS et al (2020), e gentilmente cedidas pelas autoras.

No rebanho A, 12 vacas originaram 39 amostras de leite, e no rebanho B, 22 animais forneceram 82 amostras de leite. Onze animais do rebanho C contribuíram com 51 amostras de quartos mamários individuais e cinco amostras de *swab* nasal. No rebanho D foram selecionados 11 animais que forneceram 45 amostras de quartos mamários individuais, além de uma amostra de *swab* nasal.

No total do experimento, os rebanhos A, B, C e D contribuíram com 56 animais que apresentavam IIM por *S. aureus*. Foram obtidas 212 amostras de leite e 6 amostras de *swab* nasal, e dependendo do número de episódios de IIM (clínica ou subclínica), o mesmo animal pode ter contribuído com mais de uma coleta de amostra de leite, durante o período de estudo.

Na Tabela 1 encontra-se o resumo das informações relacionadas aos rebanhos e à coleta das amostras que deram origem aos isolados incluídos no estudo.

Tabela 1. Município, vacas em lactação, produção de leite e número de isolados incluídos por amostras de leite e *swab* nasal nos respectivos rebanhos bovinos leiteiros, para fenotipagem e genotipagem de *Staphylococcus aureus*

Rebanho	Município	Nº de vacas em lactação	Produção de leite litros/vaca/dia	Nº de isolados incluídos do leite	Nº de isolados incluídos do <i>swab</i> nasal
A	Prudente de Morais	164	9,1 litros/vaca/dia	39	-
B	Prudente de Morais	115	10,1 litros/vaca/dia	82	-
C	Quartel Geral	122	16,68 litros/vaca/dia	46	5
D	Juiz de Fora	148	23,86 litros/vaca/dia	45	1

Em Prudente de Morais (rebanhos A e B), as coletas de leite foram realizadas nos dois sistemas de produção existentes da fazenda, e cada rebanho apresentava característica semi-intensiva, fechado, distinto, independente e cada ordenha funcionava em equipamento mecânico duplo seis. Os rebanhos dos sistemas de produção A e B foram avaliados durante o período de lactação que os animais se encontravam, independente do estágio de produção leiteira (LADEIRA, 2017).

Os animais eram ordenhados duas vezes ao dia, e o rebanho A era composto por vacas ½ Holandês-Zebu (1/2 HZ), enquanto em B as vacas eram ¾ Holandês-Gir (3/4 HZ). A coleta composta de leite foi realizada nos quatro quartos mamários com a retirada de 50 ml, após o descarte dos três primeiros jatos iniciais. Os quartos mamários que apresentaram quadros de mastite clínica foram coletados individualmente (LADEIRA, 2017), e contribuíram com dez amostras do atual estudo.

A distância entre os municípios de Quartel Geral e Coronel Pacheco é de aproximadamente 500 km, e nestes locais situavam-se as outras duas fazendas do estudo, com os rebanhos C e D,

respectivamente. As vacas eram mantidas em piquetes no rebanho C, e em D eram segregadas dentro do sistema *free stall*. A formação dos lotes levava em conta a produção leiteira dos animais, e as ordenhas eram realizadas em sistema de fosso, linha baixa, espinha de peixe, duplo 4x4 (SANTOS et al., 2020).

Nos rebanhos C e D, as coletas de leite foram realizadas individualmente por quarto mamário no início da ordenha, após o descarte dos três primeiros jatos, de forma asséptica. Inicialmente estes rebanhos apresentavam históricos de 24,80% e 15,75% das vacas leiteiras em lactação com IIM por *S. aureus*, respectivamente (SANTOS et al., 2020).

Para verificação de possíveis sítios anatômicos extramamários de *S. aureus*, amostras de *swab* nasal dos rebanho C e D foram coletadas, conforme protocolos descritos em trabalhos anteriores (MATOS et al., 1991; ANDERSON et al., 2012; SANTOS et al., 2020).

Foram realizadas análises bacteriológicas das amostras de leite dos rebanhos A e B (LADEIRA, 2017), e das de leite e *swab* nasal dos rebanhos C e D (SANTOS et al., 2020). Após as avaliações bacteriológicas, todos os isolados de *S. aureus* foram mantidos em freezer a -20° C, até o momento de utilização nos atuais experimentos. As análises da contagem de células somáticas (CCS) individual dos animais foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG), pelo princípio da citometria de fluxo (ISO, 2006). Para definição da alta CCS considerou-se o valor $> 2,0 \times 10^5$ células/mL (SCHUKKEN et al., 2003).

2.3 Critério de inclusão dos isolados

As amostras do banco de isolados encontravam-se acondicionadas individualmente, em microtubos de 1,5 mL, contendo 1,0 mL de caldo BHI e 100 µL de glicerol, mantidos em freezer -80° C até o momento de utilização dos atuais experimentos. Das 232 amostras testadas inicialmente foram incluídos 218 isolados de *S. aureus*. A definição do número total de isolados pertencentes ao trabalho ocorreu após a confirmação fenotípica e genotípica do microrganismo, por testes que descritos nos itens 2.4 e 2.8. Todos os isolados bacterianos foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) e do Conhecimento Tradicional Associado, sob o acesso de código A187CB6.

2.4 Ativação e caracterização fenotípica dos isolados

Para realização dos experimentos, os isolados foram descongelados e, posteriormente vertidos 10 vezes para retirada de 30 µL que foram inoculados em tubos de 1,5 mL, contendo 1,0 mL de caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) (Kasvi, Paraná, Brasil). Na sequência foram incubados em aerobiose a 37° C por 18/24 h, seguidamente com o auxílio de alças estéreis

descartáveis de 10 µL, os isolados foram inoculados em placas de cultivo contendo ágar BHI, e novamente submetidos a aerobiose a 37° C por 18/24 h. Ainda para definição da inclusão dos isolados de *S. aureus* no estudo foram realizados os testes Gram, catalase e coagulase para confirmação e descarte de possíveis contaminações.

2.5 Confirmação da identificação dos isolados por Análise Proteômica

Todos os isolados já haviam sido identificados (LADEIRA, 2017; SANTOS et al., 2020), por Análise Proteômica, pela técnica de *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) conforme descrito por NONNEMANN et al. (2019).

2.6 Extração de DNA

Dos isolados originalmente mantidos em tubos com glicerol e caldo BHI foram retirados 30 µL para a extração de DNA. Os tubos foram previamente homogeneizados e submetidos ao vórtex por 10 s, na sequência o volume foi transferido para outro tubo, contendo 1 mL de caldo BHI. A metodologia para extração do DNA foi adaptada de FAN; KLEVEN; JACKWOOD (1995), com a substituição de tampão fosfato-salino (PBS), por tampão tris-EDTA (TE pH 8,0). Após 24 h foi realizada uma centrifugação a 14.000 g por 10 min. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado com 200 µL de TE, homogeneizado e centrifugado por 13.000 g por 5 min. O procedimento foi repetido duas vezes. O *pellet* obtido foi suspenso em 50 µL de TE. A suspensão de células foi então submetida à fervura direta, a 95° C por 15 por min e, em seguida congelada por cerca de 30 min. Na sequência foi homogeneizada, centrifugada a 13.000 g por 5 min, e foi coletado o sobrenadante com o DNA para estocagem a -20° C. Para verificação da quantidade de DNA bruto extraído foram retirados 3 µL de cada isolado e realizada a leitura em duplicata, em espectrofotômetro *NanoDrop Lite Thermo Scientific™* (Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Desta forma foi possível a montagem de um novo estoque padronizado a 25 ng/µL.

2.7 Padronização dos *primers* para PCR em tempo real

Anterior à amplificação dos genes de interesse nos isolados de *S. aureus* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) foram realizados ensaios para verificação do desempenho dos *primers* em relação aos seus respectivos controles de referência. Todas as amplificações seguiram as recomendações do fabricante do *kit* Master Mix GoTaq® qPCR (Promega, Madison, Estados Unidos). Nos resultados, onde foi observada a formação de dímeros ou *hairpins* utilizaram-se variações nas concentrações dos *primers* (*forward/reverse*),

de forma a adequar o desempenho da reação. Outras intercorrências, não foram observadas quanto a performance dos *primers*, e com os ajustes realizados as reações puderam ser adequadas para o experimento. No caso de *amplicons* acima de 400 pb (pares de bases) foi utilizada a metodologia de PCR convencional.

2.8 Análise dos genes da termonuclease e agr

A identificação de *S. aureus* foi confirmada por qPCR visando amplificar uma região do gene da termonuclease (*nuc*), conservado entre as espécies. Enquanto o gene *agr*, um regulador do sistema *quorum sensing*, foi avaliado dada sua correlação entre a produção de biofilme e processos ligados à resistência antimicrobiana. Para a avaliação dos genes, os isolados de *S. aureus* foram submetidos às reações de amplificação, em um volume final de 10 µL, somando oito µL de *Master Mix GoTaq®* qPCR (Promega, Madison, Estados Unidos) e dois µL de DNA (25 ng/ µL). O programa utilizado no termociclador 7500 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems, California, EUA*) consistiu em ciclo de aquecimento a 95° C/2 min, seguida de 40 ciclos de 95° C/15 s e 60° C/1 min, com a aquisição de fluorescência a 60° C. Após a amplificação, foi realizada a análise de curva de dissociação com desnaturação inicial a 95° C/15 s, resfriamento a 60° C/1 min e, aumento gradual de temperatura de 0,3° C/s até 95° C para verificação da especificidade dos produtos gerados. Para os controles negativos, foi adicionada água *DNAse free* ao master mix, e um segundo controle negativo de *Escherichia coli*, *American Type Culture Collection* (ATCC 11229), também foi utilizado nas placas, para verificação da especificidade dos *primers* ao alvo molecular de interesse. A cultura ATCC 25923 de *S. aureus* foi utilizada para controle de referência do gene *nuc*, ao passo que para o gene *agr*, foi utilizado o isolado de *S. aureus* N354, previamente sequenciado. As culturas de ATCC utilizadas foram gentilmente cedidas pela Profa. Elaine Maria Seles Dorneles, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e o isolado N354 foi cedido por PEDROSO et al. (2016). Na Tabela 2, a sequência e o tamanhos dos *amplicons*, dos *primers* dos genes *nuc* e *agr* encontram-se descritos.

Tabela 2. *Primers* dos genes *nuc* e *agr* de *Staphylococcus aureus* utilizados na qPCR

Gene (fragmento)	Sequência (5' - 3')	<i>Amplicons</i> (pb)	Referência
<i>nuc</i>	F-AAAGCGATTGATGGTGATACGGTTA	140	Neste trabalho
	R-GTAAATGCACTTGCTTCAGGACCAT		
<i>agr</i> RNAIII	F-CATAGCACTGAGTCCAAGGA	200	(REINOSO, 2004)
	R-CAATCGGTGACTTAGTAAAATG		

2.9 Análise do fenótipo e genótipo da produção de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada *in vitro* pelo teste em placa de poliestireno que permitiu avaliação do fenótipo e, para estudo do genótipo dos genes foi utilizada a qPCR.

2.9.1 Teste de aderência do biofilme em placa de poliestireno

A produção quantitativa *in vitro* do biofilme de *S. aureus* foi avaliada pelo teste de aderência em placas de poliestireno, em triplicata, de acordo com DIAS-SOUZA et al. (2013). Inicialmente foi realizada uma curva cinética com 30 isolados, definidos por conveniência, para determinação do tempo de incubação para leitura das placas no espectrofotômetro, sendo para o experimento definido um período de 24 h. Um tubo com caldo BHI sem inóculo (substituído por água) foi utilizado como controle negativo, e o controle de referência OB 6070 de *Staphylococcus epidermidis*, anteriormente classificado como fortemente para a formação de biofilme (PEDROSO et al., 2016). Após incubação das placas por 30 h a 37°C, foi realizada a quantificação da absorvância usando um leitor de microplaca multimodo *Thermo Scientific Varioskan LUX* (Singapura, Malásia) no comprimento de onda de 620 nm. Os valores obtidos foram classificados em quatro categorias, baseados na relação entre a densidade óptica (DO) dos poços com os isolados, comparado aos resultados obtidos da densidade óptica do controle negativo (DOCN): não aderente, fracamente, moderadamente ou fortemente para a formação de biofilme (DIAS-SOUZA et al., 2013).

2.9.2 qPCR dos genes associados a produção de biofilme

Em relação ao genótipo, os 218 isolados foram analisados em duplicata por qPCR para a amplificação dos genes *icaABCD* e *bap* (Tabela 3).

Tabela 3. Primers dos genes *icaABCD* e *bap* de *Staphylococcus aureus* utilizados na qPCR

Gene (fragmento)	Sequência (5' - 3')	Amplicons (pb)	Referência
<i>icaA</i>	F - TTCTGGAACCAACATCCAACACAT R- GTCGACGTTGGCTACTGGGATACT	126 pb	Neste trabalho
<i>icaB</i>	F - TCCTTATGGCTTGATGAATGACGA R - TTCGGAGTGACTGCTTTTTCTCT	96 pb	Neste trabalho
<i>icaC</i>	F - AAAATGCGTGCAAATACCCAAGAT R - GCGTTAGCAAATGGAGACTATTGGA	105 pb	Neste trabalho
<i>icaD</i>	F - GGCATTTTCGCGATTATCATTT R - ACGATTCTCTTCTCTCTGCCATTT	80 pb	Neste trabalho
<i>bap</i>	F - TGACTTAACCATTGACGAGGTTGG R - CGACTCTAACGCCTACAGTTTCTGG	107 pb	Neste trabalho

Para as reações foram mantidas as condições descritas no item 2.8. Nos controles negativos, foi adicionada água *DNAse free* ao master mix, e utilizado o DNA de *S. aureus* da ATCC 25923 para controle de referência dos genes *icaABCD*. Para o gene *bap* o controle das placas foi a amostra de *S. aureus* 169, previamente sequenciada e cedida por PÉREZ (2018).

2.10 Avaliação do fenótipo e genótipo associados à resistência antimicrobiana

Para a caracterização fenotípica, os isolados foram avaliados pelo teste de concentração inibitória mínima (CIM) e posteriormente classificados de acordo com a resposta ao antimicrobiano (ATM).

Para a realização da genotipagem utilizou-se a categorização da União Europeia, e alguns genes de resistência antimicrobiana entre os isolados resistentes e indeterminados foram testados para os ATM: ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), oxacilina (OXA) e tetraciclina (TET).

2.10.1 Teste de concentração inibitória mínima *in vitro*

A realização da MIC permitiu avaliar os ATM e, assim, os resultados foram descritos como susceptíveis, indeterminados e resistentes, com base nos os valores de corte previstos nos manuais do CLSI (M100 e VET08, 2018). De acordo com MARSHALL et al. (1996) e THORNSBERRY et al. (1997), florfenicol (FFC) e novobiocina (NOV) podem ser avaliados, considerando o intervalo, MIC50 e MIC90, respectivamente, uma vez que não possuem os valores de corte nos manuais do CLSI e EUCAST. NEDBALCOVA et al. (2015) descreveram, em seus trabalhos, os valores de corte para FFC que estão alinhados aos propostos por MARSHALL et al. (1996), e assim, os valores de susceptibilidade e resistência foram adotados no atual estudo. Na Tabela 4 estão apresentados o intervalo e os valores de corte de cada antimicrobiano.

Para o teste de MIC foram recuperados 216/218 isolados iniciais, pois duas amostras (rebanhos B e C) não apresentaram crescimento durante os repiques bacterianos. Desta forma, os 216 isolados de *S. aureus* foram inoculados em ágar Manitol (dois por placa) e incubados a 37° C entre 16 e 20 h, para a primeira etapa de avaliação CIM, segundo as diretrizes dos Manuais do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2006 e 2018). Na sequência, colônias de isolados foram retiradas, com o auxílio de alças estéreis descartáveis de 10 µL e, novamente inoculadas em ágar Mueller-Hinton (MH -Laborclin/Paraná/ Brasil), dois por placa, e incubadas a 37° C por 16 a 20 h.

Tabela 4. Intervalo e valores de corte utilizados para avaliação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para *Staphylococcus aureus*. O intervalo foi baseado no EUCAST (2019). As distribuições incluem concentração inibitória mínima de estudos nacionais e internacionais, como programas de vigilância de resistência (Alexander, BSAC, ECO-SENS, MYSTIC, NORM e SENTRY), artigos publicados, programas de desenvolvimento de medicamentos da indústria farmacêutica, programas veterinários e de laboratórios individuais (acesso em junho de 2020)

Antimicrobianos	Intervalo ($\mu\text{g/mL}$)	Valor de corte ($\mu\text{g/mL}$)			Referência
		S	I	R	
Ampicilina	0.06-32	$\leq 0,12$	-	$\geq 0,25$	CLSI M100 (2018)
Ceftiofur	0.06-32	≤ 2	4	≥ 8	CLSI VET08 (2018)
Ciprofloxacina	0.03-16	≤ 1	2	≥ 4	CLSI M100 (2018)
Eritromicina	0.06-32	$\leq 0,5$	1 - 4	≥ 8	CLSI M100 (2018)
Florfenicol	0.25-128	≤ 2	4	≥ 8	MARSHALL et al., (1996) e EUCAST
Gentamicina	0.12-64	≤ 4	8	≥ 16	CLSI M100 (2018)
Novobiocina	0.06-32	$\leq 0,06$	-	$\geq 0,125$	THORNSBERRY et al., (1997)
Oxacilina	0.06-32	≤ 2	-	≥ 4	CLSI M100 (2018)
Sulfametoxazol+trimetoprima	0.06/1-16/304	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	CLSI M100 (2018)
Tetraciclina	0.03-16	≤ 4	8	≥ 16	CLSI M100 (2018)

No preparo do inóculo bacteriano foram selecionadas de três a cinco colônias para serem suspensas em solução salina estéril a 0,85% (pH 7) até alcançarem 0,5 na escala *McFarland*, correspondendo a aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Após essa etapa, a suspensão foi diluída em salina estéril 0,85% (1:20), com cerca de 5×10^6 UFC/mL. Na fase final, foram retirados 10 μL de inóculo, e adicionados a uma placa contendo 90 μL de caldo MH, anteriormente adicionada de seu respectivo antimicrobiano, na concentração de 5×10^5 UFC/mL.

Os isolados foram testados em duplicata nas dez concentrações dos antimicrobianos (Figura 1), juntamente aos controles do inóculo e das respectivas cultura de ATCCs, previamente definidos pelo manual CLSI (M100, 2018), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020) e por THORNSBERRY et al. (1997) para novobiocina. Uma solução estoque 10 vezes concentrada foi preparada e, os antimicrobianos dissolvidos em água ou solvente, de acordo com os manuais do fabricante e recomendações do CLSI (M100, 2018). A maior concentração, entre os dez pontos de diluições realizados, foi calculada com margem mínima de duas diluições, considerando o valor acima da concentração de resistência do ponto de corte. Os solventes foram preparados conforme preconizado pelo CLSI (M100, 2018) e as potências

foram fornecidas no *datasheet* de cada produto ou pelo serviço de atendimento ao consumidor dos fornecedores.

Isolados		Concentrações	Controle inóculo	Controle MH											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 1. Placa de microdiluição de 96 poços para avaliação em duplicata dos isolados de *Staphylococcus aureus*, com dez pontos de diluições da concentração dos antimicrobianos. Os poços 11 e 12 foram utilizados para aplicação do controle de referência (inóculo) e do controle negativo (caldo Mueller-Hinton).

Os 216 isolados de *S. aureus* e seus respectivos controles de referência (Tabela 5) foram submetidos às mesmas condições durante a realização do teste CIM, de acordo com a rotina prevista nos manuais. A definição de qual controle de referência foi adotado para os experimentos foi sinalizada na Tabela 5 com o asterisco, e definida por conveniência.

Tabela 5. Controles de referência e os respectivos intervalos para os testes de concentração inibitória mínima dos antimicrobianos. O asterisco indica o microrganismo definido para o respectivo antimicrobiano

Antimicrobianos	Controles de referência	
	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
Subclasses	Intervalo (µg/ml)	Intervalo (µg/ml)
Ampicilina	0,5-2	2-8*
Ceftiofur	-	0.25-1*
Ciprofloxacina	0,25-2*	0,004-0,016
Eritromicina	1-4*	-
Florfenicol	02/ago	2-8*
Gentamicina	abr/16	0,25-1*
Novobiocina	-	0,06-0,125*
Oxacilina	8-32*	-
Sulfametoxazol+Trimetoprima	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5*
Tetraciclina	8-32*	0,5-2

A escolha de oito, entre os dez antimicrobianos utilizados, foi baseada na lista de agentes antimicrobianos de importância veterinária compilada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2019) associada ao CLSI (VET08, 2018), e ainda foram incluídas a ampicilina (AMP) e novobiocina (NOV) por conveniência do estudo. Os antimicrobianos definidos, no

geral fazem parte da lista dos criticamente importantes para o uso veterinário (OIE), além da disponibilidade comercial e ampla utilização nos tratamentos das IIM bovinas no Brasil. Todos dez ATM fazem parte dos manuais do CLSI (M100 e VET08, 2018) e possuem indicações para utilização em bovinos.

A classificação para multirresistentes foi baseada em MAGIORAKOS et al. (2012), de forma que os isolados que apresentaram resistência a três ou mais diferentes classes de antimicrobianos foram considerados como multirresistentes, com exceção da AMP, pela frequente difusão dos mecanismos de resistência em isolados de *S. aureus*.

Os antimicrobianos e as respectivas concentrações de partida utilizadas foram: ampicilina (AMP) 32 µg/mL; ceftiofur (CEF) 32 µg/mL; ciprofloxacina (CIP) 16 µg/mL; eritromicina (ERI) 32 µg/mL; florfenicol (FFC) 128 µg/mL; gentamicina (GEN) 64 µg/mL; novobiocina (NOV) 32 µg/mL; oxacilina (OXA) 32 µg/mL; sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) 608/32 µg/mL; e tetraciclina (TET) 16 µg/mL. Os resultados foram classificados em susceptível (S - eficácia clínica provável), intermediário (I - doses menos eficientes que os susceptíveis) e resistente (R - ineficácia clínica provável). Os resultados, ainda podem ser expressos em não susceptível (NS), quando apenas se tem informações sobre o valor de corte do susceptível, devido à ausência ou rara ocorrência de cepas resistentes CLSI (VET08, 2018).

A interpretação dos intervalos e valores de corte baseou-se nos critérios descritos nos manuais CLSI (M100 e VET-08, 2018), enquanto o EUCAST (2019) permitiu definir a amplitude da CIM. Entretanto, como nos manuais não haviam previstos estes valores para FFC e NOV, foram utilizadas as metodologias de MARSHALL et al. (1996) e (THORNSBERRY et al., 1997).

2.10.2 Padronização e amplificação de genes associados à resistência antimicrobiana por qPCR e PCR convencional

De acordo com a categorização proposta pelo relatório da *European Medicines Agency* (EMA), *Categorisation of Antibiotics in the European Union* (2019), diferentes classes/subclasses fazem parte de uma mesma categoria. Desta forma, a partir das categorizações B, C e D (Tabela 6) foi escolhido por conveniência pelo menos um representante entre as classes de antimicrobianos para avaliação de possíveis genes de resistência.

Os isolados que apresentaram leitura indeterminada, ou de resistência no teste de MIC foram submetidos à amplificação pela qPCR, quando os *primers* sintetizaram *amplicons* de até 400 pb, e para valores acima, a metodologia de PCR convencional foi empregada.

Tabela 6. Classes e subclasses dos antimicrobianos categorizados de acordo com a *European Medicines Agency*. Os genes de resistência indicados foram utilizados como alvos para a PCR dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes e indeterminados no teste de concentração inibitória mínima

Classes	Subclasses	Gene de resistência	Categorização
Aminopenicilina	Ampicilina		D
Cefalosporina III	Ceftiofur		B
Fluorquinolona	Ciprofloxacina	<i>mepA</i>	B
Macrolídeo	Eritromicina		C
Cloranfenicol	Florfenicol		C
Aminoglicosídeo	Gentamicina	<i>aacA-aphD</i>	C
Aminocumarina	Novobiocina		-
Penicilina estável	Oxacilina	<i>mecA/mecC</i>	D
Antagonistas do folato	Sulfametoxazol+Trimetoprima		D
Tetraciclina	Tetraciclina	<i>tet(L)/tet(K)/tet(M)</i>	D

Os genes *mecA*, *mecC* e *aacA-aphD* foram avaliados nas mesmas condições descritas no item 2.8. Para todos os controles negativos foi adicionada água *DNAse free* ao master mix e, como controles de referência foram utilizados os isolados de *S. aureus*, MRSA 1968 (*mecA*) e LGA251 (*mecC*), cedidos gentilmente pelo Prof. Marcos Bryan Heinemann (USP) e o isolado de *S. aureus* 386, previamente sequenciado para o gene *aacA-aphD*, cedido por PÉREZ (2018).

A PCR convencional foi utilizada para a amplificação dos genes *mepA*, *tet(L)*, *tet(K)* e *tet(M)*, devido ao tamanho dos *amplicons* ser superior ao limite de detecção da qPCR. Inicialmente, os *primers*, juntamente com seus controles positivos foram avaliados quanto ao desempenho. Após as padronizações da técnica (ajustes nas concentrações) foram realizadas as amplificações dos isolados de *S. aureus* do banco de trabalho. Na Tabela 7 foi apresentada a lista de *primers* e tamanhos dos *amplicons* utilizados na qPCR e PCR convencional.

Na amplificação do gene *mepA* foi utilizado o MgCl₂, DreamTaq, DreamTaq buffer e dNTPs (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos), gentilmente cedido pelo Laboratório de Toxicologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O volume final da reação foi de 14,5 µL, somando 12,5 µL de mix e 2 µL de DNA (25 ng/µL). No caso dos genes da tetraciclina foi utilizado o *kit* Invitrogen PCR Super Mix (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) que permitiu a realização de uma reação em multiplex. Os genes foram amplificados no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*, California, EUA), com uma etapa inicial do ciclo de amplificação das PCR convencionais foi de 94° C/5 min, seguida de 30 ciclos de 94° C/45 s, 55° C/45 s e 72° C/1 min, finalizando com a etapa de extensão de 72° C/5 min. Após a etapa no termociclador, ao volume final das reações foi adicionado 5 µL de corante, *orange loading dye*, e então foram aplicados no gel de agarose a 1,5%, adicionado do tampão de corrida (TAE 1X). A eletroforese

ocorreu a 90 V, por 1 h, e posteriormente o gel foi transferido para outro recipiente, para ser corado com brometo de etídeo, por mais 40 min. O tamanho dos *amplicons* foi comparado ao padrão de peso molecular (250-1 Kb), visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela 7. *Primers* e tamanhos dos *amplicons* dos genes de resistência nos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes e indeterminados, após o teste de concentração inibitória mínima

Gene (fragmento)	Sequência (5' - 3')	<i>Amplicons</i> (pb)	Referência
<i>mepA</i>	F - ATGTTGCTGCTGCTCTGTTC R - TCAACTGTCAAACGATCACG	718 pb	Couto et al., (2008)
<i>aacA-aphD</i>	F - CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG R - CCTCGTGTAAATTCATGTTCTGGC	348 pb	Vakulenko et al., (2003)
<i>mecA</i>	F - ACTGCTATCCACCCTCAAAC R - CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	163 pb	Mehrotra et al., (2000)
<i>mecC</i>	F - CATTAAAATCAGAGCGAGGC R - TGGCTGAACCCATTT	188 pb	Paterson et al., (2012)
<i>tet(L)</i>	F - CATTGGTCTTATTGGATCG R - ATTACACTCCGATTTCCG	456 pb	Aarestrup et al., (2000)
<i>tet(K)</i>	F - TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R - GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	697 pb	Aarestrup et al., (2000)
<i>tet(M)</i>	F - GTTAAATAGTGTCTTGGAG R - CTAAGATATGGCTCTAACAA	657 pb	Aarestrup et al., (2000)

Na categorização B foi avaliada a presença do gene *mepA* para ciprofloxacina, na categoria C o alvo de investigação foi o gene *aacA-aphD* para a gentamicina e na categoria D, os genes *mecA* e *mecC* para oxacilina e os genes *tet(L)*, *tet(K)* e *tet(M)* para a avaliação da tetraciclina (Tabela 7).

2.11 PCR convencional da região X da proteína A

A região repetida (X) da proteína A de *S. aureus* foi amplificada com os *primers* descritos por (HARMSSEN et al., 2003), referência no *GenBank* J01786 (Tabela 8). As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo 22,5 µL de *GoTaq Green Master Mix* e 2,5 µL de DNA (50 ng/µL). Os parâmetros utilizados no ciclo de amplificação do termociclador foram a etapa inicial do ciclo a 95°C/5min, seguida de 35 ciclos de 95° C/45 s - 60° C/45 s - 72° C/90 s, e uma extensão final a 72° C/10 min. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, com adição de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (*Thermo Scientific*®). A visualização da ocorrência da amplificação ocorreu sob luz ultravioleta. Um isolado de referência doado por ABREU (2016) foi utilizado, e ao controle negativo, foi adicionada água *DNAse free* ao *mix* da reação.

Tabela 8. *Primer e amplicons* para avaliação da presença do gene da proteína A

Gene (fragmento)	Primers	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)
Proteína A	<i>Spa</i> 1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	200-600 pb
	<i>Spa</i> 1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	

2.12 Purificação e sequenciamento da região X da proteína A

A presença de banda única, obtida no gel de agarose, permitiu que os produtos fossem seguidamente purificados. Para isso foram utilizados 2 μ L ExoSap-IT (Affymetrix) e 5 μ L do produto da PCR, incubado a 37° C por 15 min, e então 80° C por 15 min. A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de Sanger com o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies®), com 10 μ L de volume final. Para a purificação com ExoSap-IT (Affymetrix®) foram adicionados 1 μ L de Big Dye, 1,5 μ L de buffer 5X e 0,5 μ L de *primer*. Os parâmetros utilizados no ciclo de amplificação foram a etapa inicial do ciclo a 96° C/1 min, seguida de 40 ciclos de 96° C/10 s - 50° C/5 s - 60° C/3,09 min, e o produto gerado foi então precipitado.

Para o protocolo de precipitação etanol/EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram adicionados 2,5 μ L de EDTA (125 mM) e 30 μ L de Etanol 100%. O material foi incubado por 15 min à temperatura ambiente. A placa, na sequência foi centrifugada a 15° C/30 min a 2.250 g. Na etapa seguinte, todo conteúdo líquido foi desprezado, e a placa foi centrifugada em posição invertida, a 180 g por 1 min. Posteriormente, adicionaram-se 30 μ L de etanol 70%, e mais uma etapa de centrifugação a 1.650 g por 15 min foi realizada. Todo o conteúdo líquido foi descartado e, uma nova centrifugação a 180 g por 1 min com a placa invertida foi realizada. Para secagem, a placa foi colocada no termociclador a 95° C/10 min, adicionada de 10 μ L de formamida Hi-Di (Applied Biosystems®). Na continuação, a placa retornou ao termociclador para a etapa de desnaturação, com o ciclo de 95°C/2min e 4°C/2min. Após a precipitação e desnaturação, a placa foi levada ao sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems®) para a leitura das sequências de nucleotídeos.

2.13 Edição e análise das sequências de nucleotídeos

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso dos isolados foram avaliados no programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) para verificação da qualidade, considerando apenas posições com escore superior a 20. A análise das sequências tipo foi realizada pelo software BioNumerics 7.6 (Applied Maths). Os parâmetros padrão de qualidade, montagem e consenso do plugin *spa* Typing foram utilizados, uma vez que são

exigidos na submissão de novos tipos no SpaServer. O mínimo de edição manual foi realizado, buscando manter a qualidade original das sequências obtidas.

O *plugin spa Typing* permite a determinação automática das repetições e dos tipos, de maneira sincronizada com banco de dados SeqNet/Ridom Spa Server (<http://www.spaserver.ridom.de/>) de tipagem da proteína A de *S. aureus*. No programa, uma sucessão de repetições incompleta fica representada por “???” e quando a sucessão não pertence ao banco de dados é atribuída como “*unknown*”. As primeiras foram removidas do estudo, e as *unknowns* mantidas, com a referida denominação.

Para a análise de agrupamentos das sucessões de repetição dos spa tipos identificados, utilizou-se a ferramenta *Spa Clustering* do *spa Typing* plugin do BioNumerics, com parâmetros padrões, incluindo a matriz de similaridade. Os dendrogramas foram criados a partir das sucessões de repetição dos spa tipos identificados, utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method Average*). As variáveis dispostas foram definidas de acordo com um mapa perceptual. Para as *Minimum Spanning Trees* (MST), o parâmetro *Bin grouping distance* foi ajustado para 1% e foi considerada a menor distância possível, entre os ramos com o isolado com o maior número de relações no centro.

2.14 Análise estatística

Inicialmente foram realizadas análises descritivas das variáveis incluídas no estudo, com a determinação de suas frequências absolutas e relativas e, produção de gráficos de distribuição de frequências.

Para verificação de possíveis associações entre as variáveis foi realizado o Teste Exato de Fisher considerando-se um nível de significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$). Foram testadas associações entre os rebanhos de origem (A, B, C e D) e às categorias de fenótipos de biofilme (não aderente, fraco e moderado), à presença ou ausência dos genes *icaABCD*, *bap* e *agr*, às classes de antimicrobianos (0 - 4) e, individualmente, aos dez antimicrobianos incluídos no estudo. Para todos os isolados que apresentaram genes de resistência nas PCR foram testadas as associações da categoria de fenótipos do teste de MIC (susceptível, indeterminado e resistente). A associação da presença dos genes do operon *icaABCD* foi comparada entre si, e posteriormente com a presença do gene *bap*. Ainda foi avaliada a associação da presença dos referidos genes com os fenótipos de formação do biofilme. A associação da presença dos genes de resistência GEN e TET com os fenótipos resistentes e indeterminados foi testada. Os *spa* tipos receberam quatro categorizações, distribuídos pelas frequências apresentadas, t605, t267,

t6861 e outros, a fim de equilibrar a distribuição de frequências das categorias, e do modelo estatístico. Desta forma, as associações dos agrupamentos de *spa* (0, 8, 11 e 12) puderam ser testadas em relação aos rebanhos, assim como ao gene *agr*, a cada ATM e, ainda as classes de antimicrobianos (0 - 4).

Quando foram observadas associações estatisticamente significativas entre as variáveis consideradas anteriormente, houve sua seleção prévia para inclusão na análise de correspondência.

A definição pela análise de correspondência multivariada derivou da natureza categórica dos dados, atendendo ao objetivo deste modelo estatístico. Os resultados permitiram observar as relações entre as variáveis em suas dimensões, e posteriormente avaliar as distâncias dos graus de associação, representados espacialmente no mapa perceptual. As variáveis com associação estatisticamente significativas foram selecionadas para comporem o modelo de análise de correspondência múltipla, tomando-se por base uma matriz na qual as linhas correspondiam aos indivíduos e as colunas às categorias de variáveis de acordo com MINGOTI (2005). A seguir, as variáveis que apresentaram uma contribuição relativa para a inércia inferior ao limite usualmente recomendado, de $1/Q$, em que Q é o número de variáveis (LE ROUX; ROUANET, 2004) foram descartadas, e uma nova análise de correspondência múltipla foi então realizada com as variáveis remanescentes. Foi identificada a relação entre as categorias, por meio da análise do mapa perceptual, da correspondência e da contribuição relativa das categorias para a inércia.

Para o desenvolvimento da análise de correspondência e geração do mapa perceptual foi utilizado o *Software Stata 16 para Windows 10 Pro (STATA, 2018)*.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação dos testes de inclusão dos isolados e do gene constitutivo *nuc*

Todos os isolados incluídos no estudo mostraram aspecto e resposta equivalente ao microrganismo analisado, durante o cultivo em ágar e caldo BHI, teste de coloração de GRAM, coagulase e catalase para confirmação de *S. aureus*. Em 100% das reações de qPCR houve amplificação do gene da termonuclease (*nuc*) para os isolados de *S. aureus* obtidos do leite e do *swab* nasal de vacas com mastite.

3.2 Avaliação da amplificação do gene *agr*

O gene *agr* esteve presente em 99,1% dos isolados, e na totalidade dos rebanhos (A, B e D). Duas amostras de *swab* nasal pertencentes ao rebanho C (animais distintos) não amplificaram os isolados, e na tipagem foram identificadas por *t098* e *t189*. Ao mesmo tempo que *agr* esteve ausente nos dois isolados, também não houve amplificação dos genes *icaABCD* e *bap*. A presença dos genes *agr*, *icaABCD* e *bap* ocorreu em 92/218 isolados, simultaneamente. O *agr* e o operon *icaABCD* foram identificados em 214 isolados. Houve associação da presença de *agr* com todos os *spa* tipos encontrados no estudo ($p \leq 0,05$). Em relação às outras variáveis do estudo, o gene *agr* não mostrou associações.

3.3 Caracterização do fenótipo e genótipo do biofilme nos isolados

Para a avaliação do fenótipo de formação de biofilme dos 218 isolados de *S. aureus* foram determinadas três classificações quanto a aderência à placa de poliestireno, conforme os resultados a seguir. No rebanho A, 7,69%, 84,62% e 7,69% dos isolados foram classificados em não aderente, fracamente aderente e moderadamente aderente, respectivamente. O rebanho B não apresentou o fenótipo moderadamente aderente, e 4,88% foram não aderentes, enquanto a maior parte (95,12%) foi fracamente aderente. Os isolados fracamente aderentes corresponderam a 74,51% e 84,78%, dos rebanhos C e D, e os não aderentes e moderados representaram aproximadamente 25%, respectivamente nos rebanhos. O fenótipo fracamente aderente foi predominante nos rebanhos, com média de 82,68% entre os isolados (Figura 2).

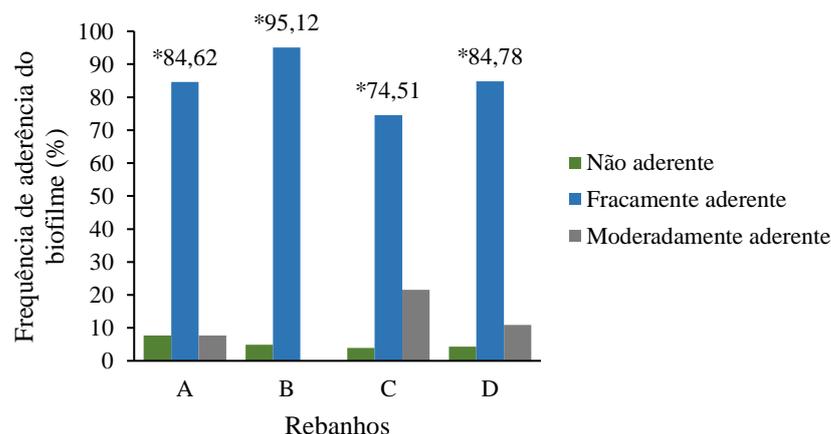


Figura 2. Frequência relativa dos tipos de aderência do biofilme após realização do teste em placa de poliestireno nos rebanhos A, B, C e D. *Houve associações estatisticamente significativas da aderência do biofilme e os rebanhos, no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

Os resultados das frequências de amplificação do *operon icaABCD* e *bap* avaliados por PCR em tempo real foram apresentados na Figura 3. Nos resultados dos rebanhos A, B e D pode-se observar que *icaABCD* amplificaram em 100% dos isolados, e no rebanho C houve amplificação para *icaA* de 92,20%, *icaBC* 94,10%, *icaD* 96,10%. Por outro lado, o gene *bap* esteve ausente em 92,10% e 98,80%, de A e B, respectivamente, enquanto no rebanho C foram identificadas amplificações em 88,23%. No rebanho D foi observado o maior número de isolados amplificados com o gene *bap*, com 97,83%.

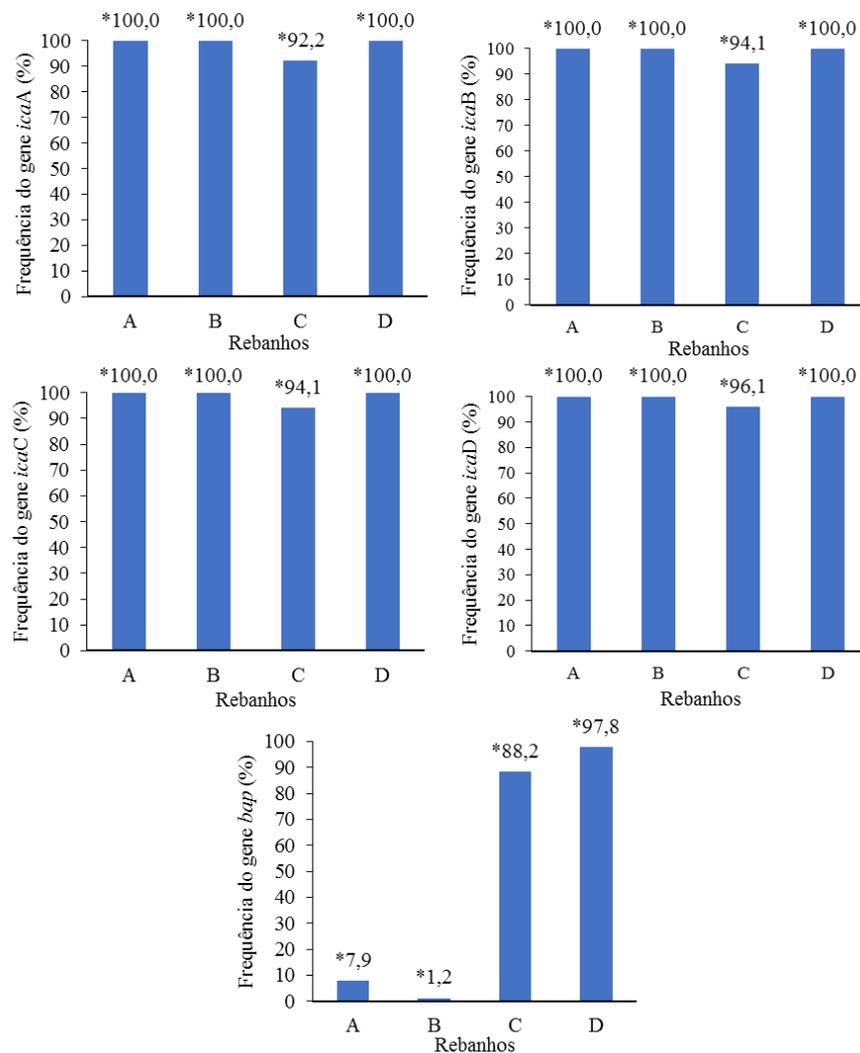


Figura 3. Distribuição da frequência relativa dos genes *icaABCD* e *bap* nos isolados de *Staphylococcus aureus* entre os rebanhos A, B, C e D. * Houve associações estatisticamente significativas da presença dos genes e os rebanhos, no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

O biofilme fracamente aderente foi observado junto dos genes *icaABCD*, assim como associado ao gene *bap*, em 84,86% e 77,66% dos isolados, respectivamente. Na ausência destes genes, dois isolados de *swab* nasal apresentaram a formação de biofilme fracamente aderente nas placas de poliestireno (dados não apresentados).

Nos resultados de comparação das associações, verificou-se que a presença dos genes que integram o *operon ica* tiveram associação entre si e com todos os rebanhos (Figura 3). O rebanho C apresentou menor frequência de amplificação dos genes *ica*ABCD. Considerando os quatro rebanhos, foi observada associação ao fenótipo fracamente aderente. Nos rebanhos A e B, observou-se associação da ausência de gene *bap* ao fenótipo fracamente aderente. O fenótipo moderadamente aderente, frequente em 8,71% dos isolados (19/218), foi associado a presença do gene *bap* (16/218) ($p \leq 0,05$). Nas demais comparações não houve associação estatística.

3.4 Fenótipo e genótipo dos antimicrobianos avaliados

3.4.1 Concentração inibitória mínima dos isolados frente aos antimicrobianos

A tabela 9 sumariza o resultado dos 216 isolados e permite observar as frequências absoluta e relativa, nas respectivas classificações de resistente, indeterminado e susceptível. A AMP apresentou resistência em 174/216 isolados (Tabela 9), confirmando sua disseminação em mais de 80% nos rebanhos. A susceptibilidade de *S. aureus* para OXA, CIP, ERI e CEF esteve acima de 90% nos isolados do estudo, enquanto para AMP foi de 19,44%. O CEF apresentou o maior número de isolados com perfil indeterminado, seguido pela GEN e TET, com 1,4% cada. As maiores resistências observadas nos rebanhos foram para AMP (80,55%), NOV (50,90%) e FFC (36,60%) (Tabela 9).

Tabela 9. Frequência absoluta e relativa dos 216 isolados de *Staphylococcus aureus* nas classificações resistente, indeterminado e susceptível para os antimicrobianos

ATM	R	FR (%)	I	FR (%)	S	FR (%)
Ampicilina	174	80,55	0	0,00	42	19,45
Novobiocina	110	50,90	0	0,00	106	49,10
Florfenicol	79	36,60	0	0,00	137	63,40
Gentamicina	49	22,70	3	1,40	164	75,90
Tetraciclina	49	22,70	3	1,40	164	75,90
Sulfametoxazol + trimetoprima	14	6,50	0	0,00	202	93,50
Oxacilina	6	2,80	0	0,00	210	97,20
Ciprofloxacina	5	2,30	0	0,00	211	97,70
Eritromicina	5	2,30	3	1,40	208	96,30
Ceftiofur	1	0,46	4	1,85	211	97,69

Na Tabela 10 foram compilados os resultados das frequências do MIC em cada rebanho. Os rebanhos A e D apresentaram as maiores frequência de resistência a OXA. No rebanho B não houve resistência a CIP e ERI, e o único registro de resultado indeterminado, para CEF (1,23%).

No geral, a frequência dos indeterminados variou entre 0% e 5,13% dos isolados, principalmente no rebanho A, para a GEN e TET. O rebanho D apresentou 89,13% de resistência a AMP, 43,48% a FFC e 50% a NOV, com 100% susceptibilidade à CIP. Com exceção do rebanho D com resistência ao CEF (2,17%), os outros rebanhos foram susceptíveis ao ATM. Para o rebanho C não foram observados isolados resistentes a CEF e OXA.

Tabela 10. Frequência relativa dos antimicrobianos após classificação em susceptíveis, indeterminados e resistentes no teste de concentração inibitória mínima entre os rebanhos

Rebanhos	Concentração Inibitória Mínima	% AMP	% CEF	% CIP	% ERI	% FFC	% GEN	% NOV	% OXA	% SUT	% TET
A	Susceptível	20,51	97,44	92,31	97,44	64,10	74,36	23,08	94,87	97,44	56,41
	Indeterminado	0,00	2,56	0,00	0,00	0,00	5,13	0,00	0,00	0,00	5,13
	Resistente	79,49	0,00	7,69	2,56	35,90	20,51	76,92	5,13	2,56	38,46
B	Susceptível	13,58	98,77	100,00	100,00	67,90	90,12	44,44	98,77	95,06	97,54
	Indeterminado	0,00	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Resistente	86,42	0,00	0,00	0,00	32,10	9,88	55,56	1,23	4,94	2,46
C	Susceptível	36,00	100,00	96,00	90,00	62,00	44,00	76,00	100,00	92,00	40,00
	Indeterminado	0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
	Resistente	64,00	0,00	4,00	6,00	38,00	56,00	24,00	0,00	8,00	58,00
D	Susceptível	10,87	93,47	100,00	95,66	56,52	86,96	50,00	93,48	89,13	93,48
	Indeterminado	0,00	4,36	0,00	2,17	0,00	2,17	0,00	0,00	0,00	0,00
	Resistente	89,13	2,17	0,00	2,17	43,48	10,87	50,00	6,52	10,87	6,52

Legenda: Ampicilina (AMP), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), florfenicol (FFC), gentamicina (GEN), novobiocina (NOV), oxacilina (OXA), sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) e tetraciclina (TET).

3.4.2 Categorização dos antimicrobianos e PCR dos isolados resistentes e indeterminados

Tabela 11. Número de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes no teste de concentração inibitória mínima, distribuição entre os *spa* tipos e identificação de genes de resistência

Rebanho A			Rebanho B			Rebanho C			Rebanho D			
Resistência ATM %	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)	Resistência ATM %	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)	Resistência ATM %	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)	Resistência ATM %	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)	
AMP (79,5)	t002 (3); t6861 (26); <i>Unknowns</i> (2)	<i>mepA</i> (3)	AMP (86,42)	t1200 (1); t1236 (3); t127 (6); t267 (56); t306 (1); t359 (1); t7433 (1)		AMP (64,0)	t605 (30); t189 (2)	<i>mepA</i> (2)	AMP (89,13)	t605 (41)		
CEF (0)			CEF (0)			CEF (0)			CEF (2,17)	t605 (1)		
CIP (7,69)	t6861 (3)		CIP (0)			CIP (4,0)	t605 (2)		CIP (0)			
ERI (2,56)	t6861 (1)		ERI (0)			ERI (6,0)	t605 (3)		ERI (2,17)	t605 (1)		
FFC (35,89)	t002 (1); t6861 (12); <i>Unknown</i> (1)	<i>aacA-aphD</i> (4)	FFC (32,1)	t1200 (1); t127 (4); t267 (19); t306 (1); t7433 (1)		FFC (38,0)	t605(14); t189 (2)	<i>aacA-aphD</i> (27)	FFC (43,48)	t605 (20)		
GEN (20,51)	t6861 (5); t002(3)		GEN (9,87)	t127 (1); t267 (6)		GEN (56,0)	t605(28)		GEN (10,87)	t605 (5)		<i>aacA-aphD</i> (1)
NOV (76,92)	t002 (3); t6861 (26); <i>Unknown</i> (1)		NOV (55,56)	t1236 (2); t127 (4); t267 (36); t306 (1)		NOV (24,0)	t605(9); t189 (1); t098 (2)		NOV (50,0)	t605 (23)		
OXA (5,13)	t002 (1); t6861 (1)	<i>tet(k)</i> (15)	OXA (1,23)	t267 (1)		OXA (0)			OXA (6,52)	t605 (3)		
SUT (2,56)	t6861 (1)		SUT (5,0)	t127 (3); t267 (1)		SUT (8,0)	t605(2); t189 (1); t098(1)		SUT (10,87)	t605 (5)		
TET (38,46)	t6861 (15)	<i>tet(K)</i> (1)	TET (2,5)	t1236 (1); t267 (1)	<i>tet(L)</i> (1)	TET (58,0)	t605(29)	<i>tet(L)</i> (28)	TET (6,52)	t605 (3)	<i>tet(K)</i> (1) <i>tet(L)</i> (1)	

Legenda: Ampicilina (AMP), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), florfenicol (FFC), gentamicina (GEN), novobiocina (NOV), oxacilina (OXA), sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) e tetraciclina (TET).

Em conformidade com as recomendações da Agência Europeia de Medicamentos (EMA), as categorizações B, C e D tiveram representantes neste trabalho, por pelo menos, uma classe de antimicrobiano no teste de MIC (Tabela 11). O número de isolados de *S. aureus* resistentes no teste de concentração inibitória mínima, a distribuição entre os *spa* tipos e a identificação dos possíveis genes de resistência podem ser observados na Tabela 11.

Cinco isolados foram resistentes ao CIP (categorização B) e todos amplificaram para o gene *mepA*. O gene *aacA-aphD* foi encontrado em 61,54%, dos 52 isolados (49 resistentes e 3 indeterminados) para a gentamicina (categorização C). Dos seis isolados resistentes para oxacilina (categorização D), nenhum amplificou durante as qPCR para os genes *mecA* e *mecC*. Dos 52 isolados, 49 resistentes e 3 indeterminados, no teste de MIC para tetraciclina, foram identificadas ampliações em 57,7%, 36,54% e 0%, dos genes *tet(L)*, *tet(K)* e *tet(M)*, respectivamente (Tabela 9) durante a PCR convencional. Nos resultados das comparações, houve associação entre a presença do gene *aacA-aphD* com os isolados resistentes a GEN. O mesmo não ocorreu para os genes *tet(L)* e *tet(M)*, em relação a TET ($p \leq 0,05$).

3.5 Distribuição dos *spa* tipos nos rebanhos

A genotipagem dos isolados de *S. aureus* por *spa* Typing permitiu a identificação de 13 *spa* tipos que já haviam sido referidos no *website* (www.spaserver.ridom.de). Para duas cepas, o banco de dados do *Bionumerics* não determinou o *spa* tipo, pois a sucessão de repetições não foi encontrada, e por isto, as sequências foram definidas como *Unknowns* (desconhecidas). Outros dois isolados receberam a classificação incompleta e foram descartados na análise do *spa* Typing. Os resultados da distribuição das frequências dos *spa* tipo e os respectivos rebanhos estão apresentados na (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência absoluta dos *spa* tipos nos rebanhos A, B, C e D

Rebanho A	n	Rebanho B	n	Rebanho C	n	Rebanho D	n
<i>spa</i> tipo	39	<i>spa</i> tipo	80	<i>spa</i> tipo	51	<i>spa</i> tipo	46
t002	3	t1200	1	t098	4	t605	46
t6861	34	t1236	4	t189	2		
<i>Unknown</i>	2	t127	10	t605	45		
		t1589	1				
		t267	61				
		t306	1				
		t359	1				
		t7433	1				

Os *spa* tipos foram relacionados às respectivas fazendas e ao total de isolados encontrados em cada rebanho (Tabela 12). Entre os 216 isolados, 86% apresentaram os *spa* tipos t605, t267 e t6861. O t605 foi identificado em 91/97, com o genótipo presente em todo o rebanho D, e em 88,24% dos isolados no rebanho C. O rebanho B apresentou oito diferentes *spa* tipos, e ao rebanho A pertencem as duas cepas classificadas como *Unknows*.

Na Tabela 13 foram apresentados os *spa* tipos e as cepas *Unknows* nas associações estabelecidas no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$). Em relação às comparações, observaram-se associações entre a categoria 12 (t605) com o rebanho C e D, a categoria 11 (t267) com o rebanho B, e a categoria 8 (t6861) com o rebanho A ($p \leq 0,05$).

Tabela 13. Distribuição das frequências dos *spa* tipos nos quatro rebanhos. Houve associações estatisticamente significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$), indicado pelo asterisco. Os dois asteriscos indicam a inclusão dos isolados na categoria outros

Categoria**	<i>spa</i> tipo	Rebanhos, nº de isolados e frequência				Isolados
		A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Total
0	t002	3 (7,7)	0	0	0	3
0	t098	0	0	4 (7,8)	0	4
0	t1200	0	1 (1,25)	0	0	1
0	t1236	0	4 (5)	0	0	4
0	t127	0	10 (12,5)	0	0	10
0	t1589	0	1 (1,25)	0	0	1
0	t189	0	0	2 (3,92)	0	2
8	t267	0	61* (76,25)	0	0	61
0	t306	0	1 (1,25)	0	0	1
0	t359	0	1 (1,25)	0	0	1
11	t605	0	0	45* (88,24)	46* (100)	91
12	t6861	34* (87,18)	0	0	0	34
0	t7433	0	1 (1,25)	0	0	1
0	<i>Unknows</i>	2 (5,13)	0	0	0	2
4 categorias	Total	39	80	51	46	216

3.5.1 Biofilme e *spa* Typing

O genótipo t6861 correspondeu a 87,18% da tipagem dos isolados de *S. aureus* no rebanho A (Tabela 13), com associação de 100% dos genes *icaABCD* e apresentação do fenótipo fracamente aderente em 85,30% dos casos. Enquanto o gene *bap* foi encontrado em 20,52%, a maior parte relacionada à formação de biofilme com fraca aderência. O gene *bap* amplificou em 97,8% dos isolados com *spa* tipo t605, genótipo presente em todo o rebanho D. O *spa* tipo t002 foi encontrado exclusivamente em três isolados do rebanho A, sendo associado a 100% de amplificação dos genes *icaABCD*, fenótipo moderadamente aderente e ausência do gene *bap* (Tabela 14).

A maior variação entre os *spa* tipos ocorreu no rebanho B (8 diferentes tipos), sendo distribuídos em t267 (76,25%), t127 (12,5%), t1236 (5%), t306 (1,25%), t359 (1,25%), t1200 (1,25%), t1589 (1,25%) e t7433 (1,25%) (Tabela 13). Todos os isolados deste rebanho amplificaram os genes *icaABCD*, enquanto o gene *bap* esteve ausente em 98,75%, já na Tabela 14 pode ser observado o fenótipo fracamente aderente em 78/82 isolados.

Dos 51 isolados de *S. aureus* originados do rebanho C, 88,24% foram atribuídos ao t605, e os outros dois *spa* tipos foram t098 e t189 (Tabela 13), com amplificação simultânea dos genes *icaABCD* e *bap*, em 84,31% dos três *spa* tipos. Considerando os quatro rebanhos, o fenótipo moderadamente aderente foi encontrado em 19/218 isolados, com 16 isolados relacionados ao *spa* tipo t605 (rebanhos C e D) (Tabela 14).

As associações mais frequentes foram observadas entre o fenótipo fracamente aderente e os *spa* tipos t605, t267 e t6861 (Tabela 14) ($p \leq 0,05$).

Tabela 14. Distribuição dos fenótipos de biofilme, por rebanho e *spa* tipo

Rebanhos	Não Aderente n/(%)	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Fracamente Aderente n/(%)	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Moderadamente Aderente n/(%)	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Total n/(%)
A	3/(7,69)	t6861(3)	33/(84,61)	t002(2), *t6861(29) e Unknown(2)	3/(7,7)	t002(1) e t6861(2)	39/(100)
**B	4/(4,88)	t1236(1) t127(1) t267(2)	78/(95,12)	t1200(1), t1236(3), t127(9), t1589(1), *t267(59), t306(1), t359(1) e t7433(1)	0/(0,0)		82/(100)
C	2/(3,92)	t605(2)	38/(74,5)	t098(4), t189(2) e *t605(32)	11/(21,58)	t605(11)	51/(100)
D	2/(4,34)	t605(2)	39/(76,47)	*t605(39)	5/(19,19)	t605(5)	46/(100)
Total	11/(5,05)		188(86,24)		19/(8,72)		218(100)

Legenda: *indicam associações significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$). ** dois isolados do rebanho B não foram identificados no *spa* Typing.

3.5.2 Antimicrobianos e *spa* Typing

A distribuição do fenótipo de resistência ATM nos rebanhos encontra-se descrita na Tabela 11, com seus respectivos *spa* tipos. A resistência a AMP foi observada na maioria dos *spa* tipos, com exceção de t1589 (1/216) e t098 (4/216), presentes nos rebanhos B e C (Tabelas 11 e 12).

Em relação a CEF, apenas um isolado com o *spa* tipo t605 apresentou resistência (Tabela 11), enquanto os outros 90 isolados com este mesmo genótipo foram indeterminados (4) e susceptíveis (86) (dados não apresentados).

A resistência à CIP ocorreu em cinco isolados dos rebanhos A (t6861) e C (t605) (Tabela 11), apesar dos mesmos *spa* tipos apresentarem entre seus isolados o fenótipo de susceptibilidade (dados não apresentados). De forma semelhante, a ERI apresentou os mesmos achados quanto aos *spa* tipos t6861 e t605 (Tabela 11).

O FFC apresentou em t1236, t1589, t359, o perfil susceptibilidade em todos os isolados, enquanto para o restante dos *spa* tipos não houve correspondência com um fenótipo específico. Em 4/6 isolados de *swab* nasal dos rebanhos C e D foi observada resistência ao FFC (dados não apresentados).

Os resultados da GEN para o rebanho A mostraram que todos os isolados do *spa* tipo t002 foram resistentes. Para NOV todos isolados dos *spa* tipos t002 e t306 foram resistentes, e no restante dos *spa* tipos pelo menos um isolado, também apresentou resistência, e apesar de ocorrer entre todos os rebanhos foi mais frequente em B e D (Tabela 11).

A resistência a OXA foi identificada em seis isolados dos rebanhos A (2), B (1) e D (3) (Tabela 11). No entanto, não houve associação entre os fenótipos e um determinado *spa* tipo, uma vez que a resistência e susceptibilidade ocorreram entre um mesmo *spa* identificado (dados não apresentados).

A susceptibilidade à SUT foi identificada em todos os isolados dos *spa* tipos t002, *Unkows*, t1200, t1236, t1589, t306, t359 e t7433, pertencentes aos rebanhos A e B (Tabela 11). Em relação à resistência a TET, o rebanho B apesar de apresentar o maior número de isolados e de diferentes *spa* tipos demonstrou a menor frequência do fenótipo de resistência, em apenas dois isolados, identificados por t267 e t1236 (Tabela 11). Foram observadas associações estatisticamente significativas entre o fenótipo susceptível da TET e os isolado dos quatro rebanhos, enquanto a resistência mostrou-se associada aos rebanhos C e D, em 95,9% dos casos.

Na Tabela 15 encontram-se os resultados das frequências dos fenótipos de susceptibilidade e resistência, assim como o número de classes dos isolados resistentes aos antimicrobianos. Desta forma, 5,6% dos isolados não apresentaram resistência aos dez antimicrobianos, enquanto a resistência a um antimicrobiano foi de 49,1%. As resistências a dois, três e quatro antimicrobianos foram de 26,9%, 15,2% e 4,3%, respectivamente. Em conjunto a multirresistência esteve presente em 18,5% dos isolados.

Os fenótipos: susceptível, indeterminado e resistência em relação à AMP, NOV, CIP, GEN e TET apresentaram associação com todos os rebanhos. Entretanto, a associação do fenótipo de resistência à AMP e NOV foi mais elevada, quando comparada ao de susceptibilidade nos

quatro rebanhos. Ao contrário da CIP que teve a susceptibilidade mais frequente, quando comparada aos outros fenótipos dos quatro rebanhos. O maior número de resistentes a GEN foi encontrado no rebanho C. A resistência a TET foi mais frequente nos rebanhos A e C, enquanto B e C foram mais relacionados aos susceptíveis (Tabela 15).

Na Tabela 15 foram apresentadas as concatenações das resistências e susceptibilidade aos antimicrobianos descritas em 44 perfis com identificação do respectivo *spa* tipo e número de isolados. Para as análises de multirresistência (classes três e quatro) foi desconsiderada a AMP (MAGIORAKOS et al., 2012), presente em 80,6% dos isolados. Os *spa* tipos mais predominantes t605, t267 e t6861 apresentaram multirresistência (classes três e quatro) de 55%, 7,5% e 25%, distribuídos em 18 diferentes perfis, classificados nas classes três e quatro.

Houve associações das classes de resistência antimicrobiana (0 - susceptível e 1 a 4 - n° de resistências) com as categorias de *spa* tipos (t267, t605, t6861 e outros). Os isolados susceptíveis foram mais frequentes nos t267 e t605, e a resistência a um antimicrobiano foi menos observada no t6861. A resistência a dois antimicrobianos foi mais elevada em t605 e os resultados da multirresistência foram mais frequentes em t605 e t6861 ($p \leq 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15. Classificação dos antimicrobianos de acordo com o perfil de resistência ou susceptibilidade, apresentados pelos isolados no teste de concentração inibitória mínima, e os respectivos *spa* tipos. O asterisco indica a frequência relativa dos fenótipos

Perfil	ATM	Total de isolados (%)	<i>spa</i> tipo (n° de isolados)	Classes (%)*
1	AMP CIP FFC NOV TET	2 (0,93)	t6861(2)	4 (3,2)
2	AMP FFC GEN NOV TET	2 (0,93)	t605(2)	4
3	AMP CEF NOV OXA TET	1 (0,46)	t605(1)	4
4	AMP CIP FFC NOV SUT	1 (0,46)	t6861(1)	4
5	AMP FFC GEN SUT TET	1 (0,46)	t605(1)	4
6	AMP FFC GEN TET	6 (2,77)	t605(6)	3 (15,2)
7	AMP FFC GEN NOV	6 (2,77)	t6861(2), t605(1), t127(1), t267(1), t002(1)	3
8	AMP GEN NOV TET	4 (1,85)	t605(2), t6861(1), t267(1)	3
9	AMP FFC NOV TET	3 (1,39)	t6861(2), t605(1)	3
10	AMP FFC NOV SUT	3 (1,38)	t605(1), t127(1), t267(1)	3
11	AMP GEN NOV OXA	1 (0,46)	t002(1)	3
12	AMP FFC NOV OXA	1 (0,46)	t605(1)	3
13	AMP ERI NOV OXA	1 (0,46)	t6861(1)	3
14	AMP ERI GEN TET	1 (0,46)	t605(1)	3
15	AMP CIP GEN TET	2 (0,93)	t605(2)	3
16	FFC NOV SUT	3 (1,36)	t605(2), t098(1)	3
17	ERI FFC NOV	1 (0,46)	t605(1)	3
18	FFC GEN NOV	1 (0,46)	t6861(1)	3

19	AMP FFC NOV	18 (8,33)	t267(7), t605(5), t6861(3), t306(1), t189(1), <i>Unknown</i> (1)	2 (26,9)
20	AMP GEN TET	13 (6,01)	t605(13)	2
21	AMP NOV TET	7 (3,24)	t6861(6), t1236(1)	2
22	AMP GEN NOV	4 (1,85)	t267(2), t6861(1), t002(1)	2
23	AMP FFC SUT	3 (1,36)	t189(1), t605(2)	2
24	AMP ERI FFC	1 (0,46)	t605(1)	2
25	AMP NOV OXA	1 (0,46)	t267(1)	2
26	AMP NOV SUT	1 (0,46)	t605(1)	2
27	FFC NOV	2 (0,93)	t605(1), t6861(1)	2
28	GEN TET	2 (0,93)	t605(2)	2
29	NOV TET	1 (0,46)	t6861(1)	2
30	NOV SUT	1 (0,46)	t127(1)	2
31	NOV OXA	1 (0,46)	t605(1)	2
32	GEN NOV	1 (0,46)	t267(1)	2
33	ERI NOV	1 (0,46)	t605(1)	2
34	AMP NOV	33 (15,27)	t267(22), t605(7), t6861(3), t1236(1)	1 (49,1)
35	AMP FFC	21 (9,72)	t267(9), t605(8), t1236(2), t7433(1), t1200(1)	1
36	AMP GEN	3 (1,39)	t605(2), t267(1),	1
37	AMP TET	2 (0,93)	t605(1), t6861(1)	1
38	NOV	7 (3,24)	t605(4), t6861(1), t127(1), t098(1)	1
39	FFC	4 (1,85)	t098(2), t267(2), t605(1)	1
40	TET	2 (0,93)	t6861(2)	1
41	GEN	1 (0,46)	t605(1)	1
42	SUT	1 (0,46)	t127(1)	1
43	AMP	31 (14,35)	t605(12), t267(11), t6861(3), t127(1), t1236(1), <i>Unknown</i> (1)	1
44	SUSCEPTÍVEL	12 (5,55)	t605(6), t267(3), t6861(2), t1236(1), t127(1), t1589(1)	0 (5,6)
	Total	216 (100)		(100)

Os antimicrobianos de diferentes classes foram classificados como multirresistentes, quando apresentaram três ou mais perfis de resistência no mesmo isolado, de acordo com a classificação de MAGIORAKOS et al. (2012). Foram observadas associações significativas entre as classes de antimicrobianos (0 - susceptível e 1 a 4 - nº de resistências) e os rebanhos de origem. A susceptibilidade foi menos frequente no rebanho A, a resistência a um ATM mais observada no rebanho B, enquanto a resistência a dois ATM, foi bem distribuída entre os rebanhos. A resistência a três ATM foi mais frequente no rebanho C e o rebanho B foi o único que não apresentou multirresistência a quatro ATM ($p \leq 0,05$). Nas outras comparações do teste Exato de Fisher, não houve associação estatisticamente significativa.

No que diz respeito à multirresistência, foram identificados 40 isolados envolvidos em três e quatro classes (Tabela 15). A OXA, por exemplo, apresentou seis isolados resistentes e

contribuiu em quatro eventos, enquanto NOV, apesar de não pertencer a lista dos criticamente importantes teve participação em 30/40 dos isolados.

3.5.3 Análise das sequências do *spa* Typing

Na Figura 4, a letra A representa a caracterização molecular de todos os isolados de *S. aureus* de acordo com o *Minimal spanning tree* (MST). A letra A permitiu avaliar a distância de distribuição entre os isolados, indicados pelos valores nas linhas que unem a árvore. Desta forma, quanto maior a distância dos *spa* tipos, menor a similaridade nas sucessões de repetição. Em B pode ser observada as variações dos genótipos nos diferentes rebanhos (Figura 4).

O dendrograma permitiu uma visualização de todos os agrupamentos, considerando os 216 isolados (Figura 5). Desta forma, a partir da sucessão de repetições foi possível realizar inferências sobre como os *spa* tipos se relacionam. Todas as frequências relativas de cada *spa* tipo nos rebanhos está descrita na Tabela 12.

No rebanho A, o t6861 foi o mais frequente, contudo não apresentou similaridade com t002 e t098. Entretanto um dos *spa* tipos *unknow* se diferenciou de t6861 pela deleção da r34 na 6ª posição. Para a outra cepa *unknow* e t098 não foi possível determinar uma hipótese comparativa, dentro e entre os rebanhos (Figura 5).

Entre o rebanho A e B, o t002 tem similaridade com o t306, estando presente neste último, uma adição de r17 na 9ª posição (Figura 5).

No rebanho B, o t267 recebeu na 7ª posição o r34, sendo em t7433 ocupada por r13 e t359 apresentou uma deleção desta sequência. A única modificação entre t267 e t1236 vem da ocupação da 1ª posição, r7 e r26, respectivamente. O mesmo para o rebanho C, entre o t127 e t1589, onde uma diferenciação entre r16 e r25, na 4ª posição dos genes alterou a sequência (Figura 5).

Considerando os rebanhos B, C e D, o t1200 (B) parece ter uma adição de r34, na 3ª posição, quando observado junto de t605. A hipótese vem da maior frequência de isolados do genótipo t605, 91/216, contudo no rebanho não foi identificado este *spa* tipo. Observando os rebanhos C e D, o t127 parece ter sofrido uma deleção de r34, na 7ª posição, quando comparado com t098 (Figura 5).

O dendrograma (Figura 5) apresenta todas as variáveis que mostraram associações no teste Exato de Fisher. A distribuição espacial permitiu a observação do comportamento dos dados de forma conjunta, somado as informações das sucessões de repetição.

A Figura 6 apresenta no dendrograma os resultados de genótipo e fenótipo de cada isolado nas respostas aos testes dos antimicrobianos, relacionando ao *spa* tipo e a origem da mastite, enquanto na Figura 7, o dendrograma retrata o genótipo e fenótipo dos isolados frente as respostas aos testes de biofilme, também relativos aos *spa* tipos e a origem da mastite.

Os dois isolados identificados como *unknowns* serão submetidos à Curadoria do banco de dados, Ridom SpaServer, para que sejam validados e integrados como novas sequências de *spa* tipos, da região X da proteína A de *S. aureus*.

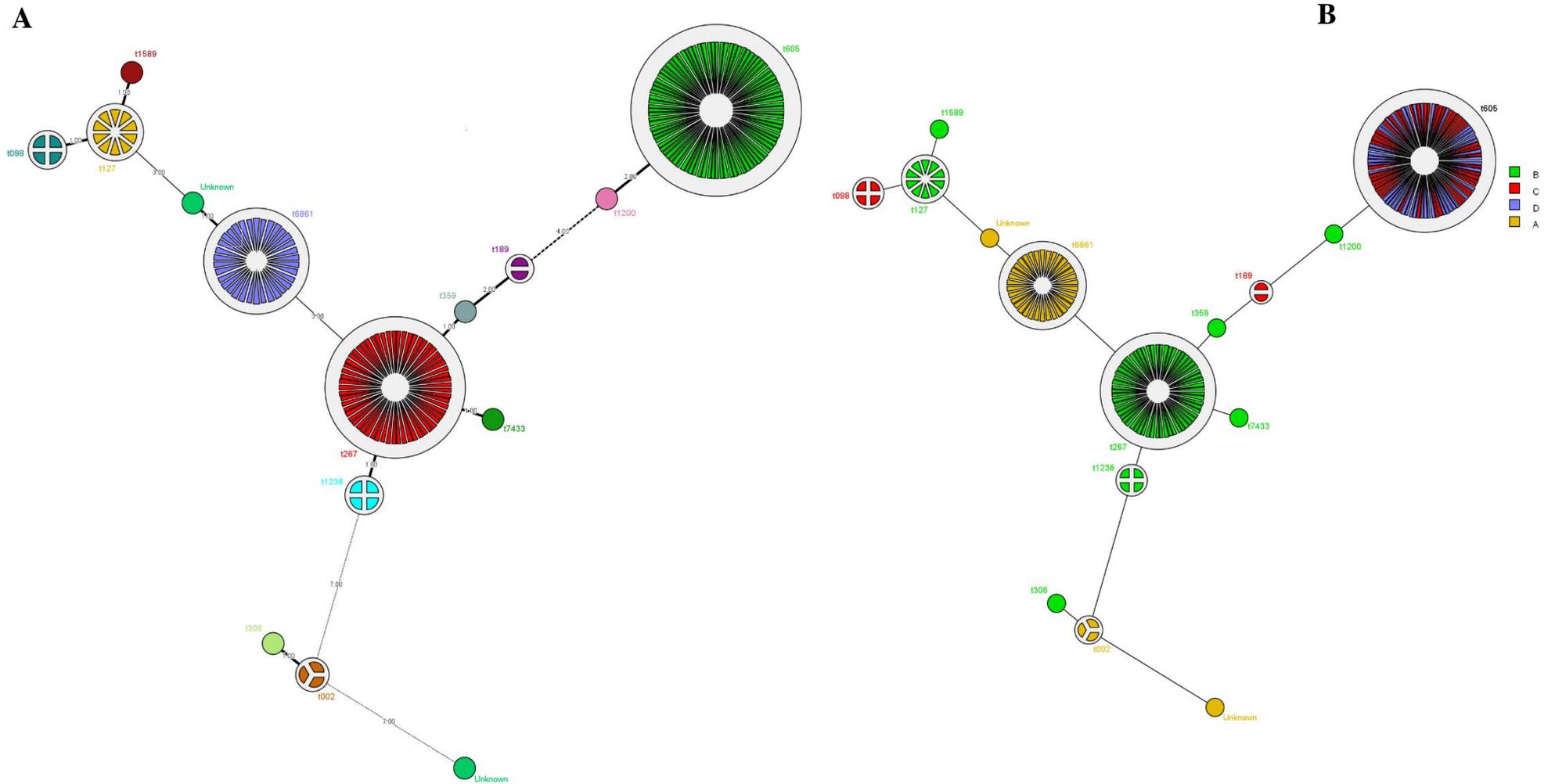


Figura 4. *Minimal spanning tree* (MST) dos 216 isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com os genótipos identificados. A: distância de distribuição isolados nos *spa* tipos. B: variações dos genótipos nos rebanhos.

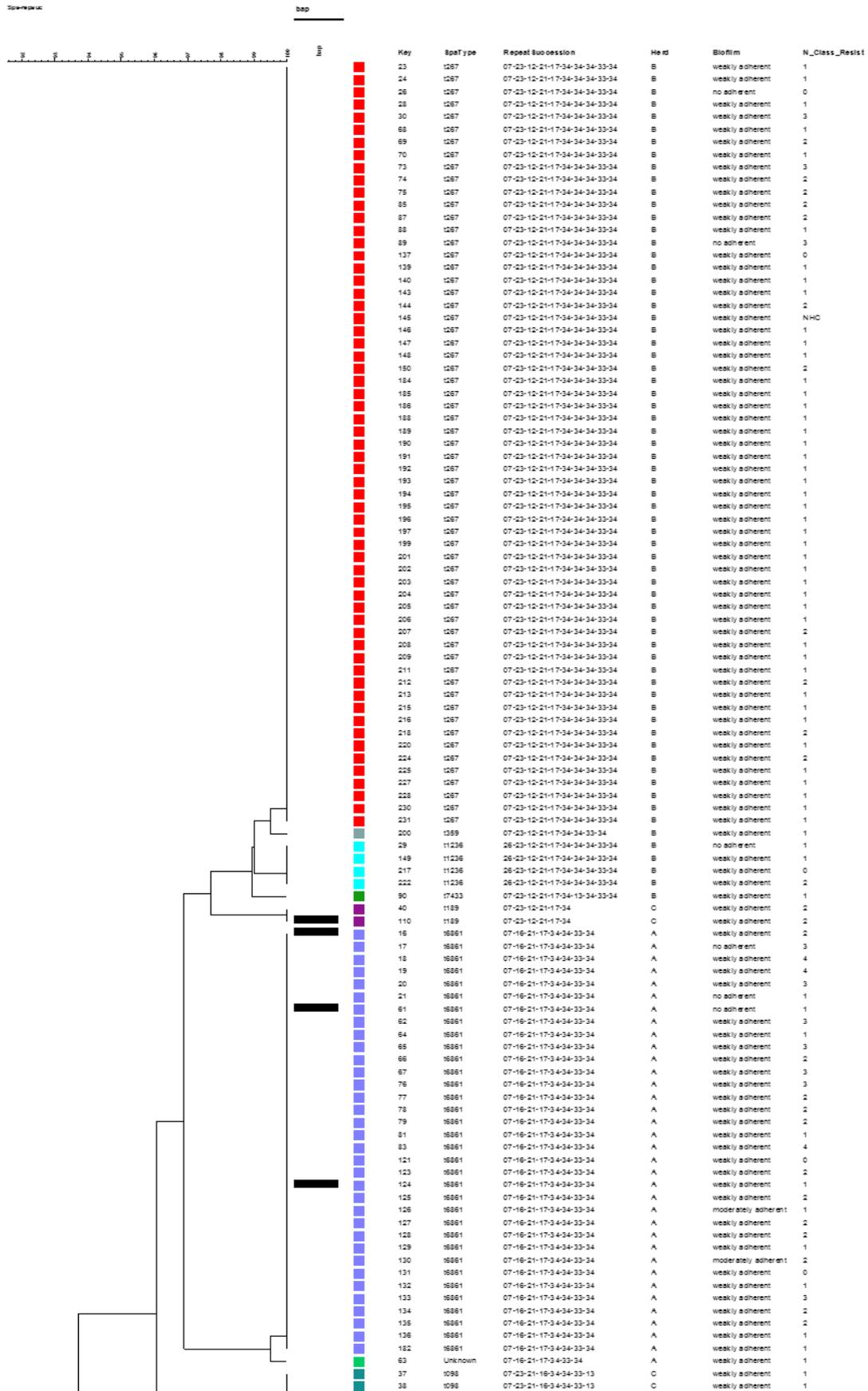


Figura 5. Dendrograma com agrupamentos pela metodologia UPGMA das associações entre as variáveis apresentadas no mapa perceptual.

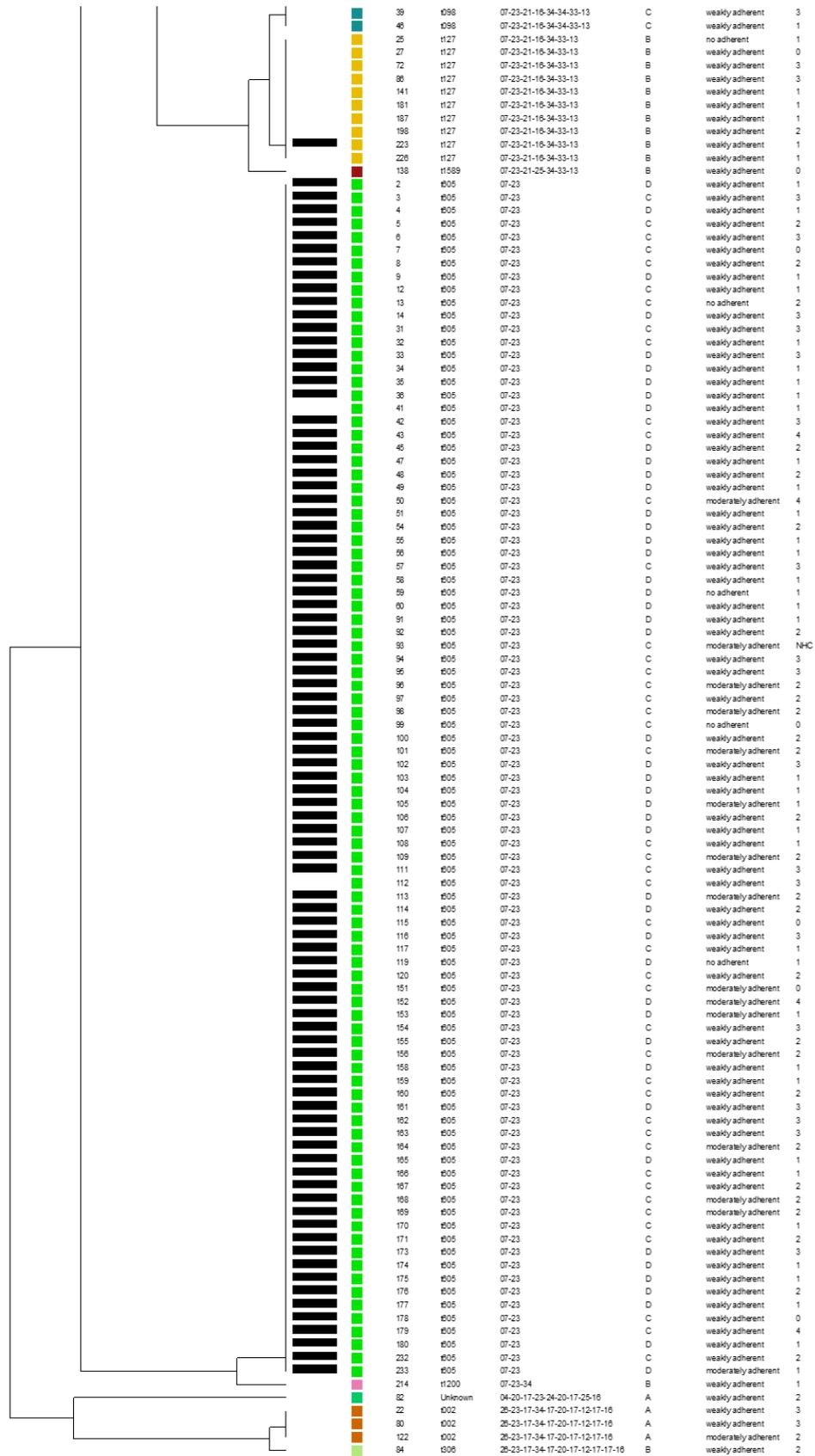


Figura 5. Dendrograma com agrupamentos pela metodologia UPGMA das associações entre as variáveis apresentadas no mapa perceptual (cont...).

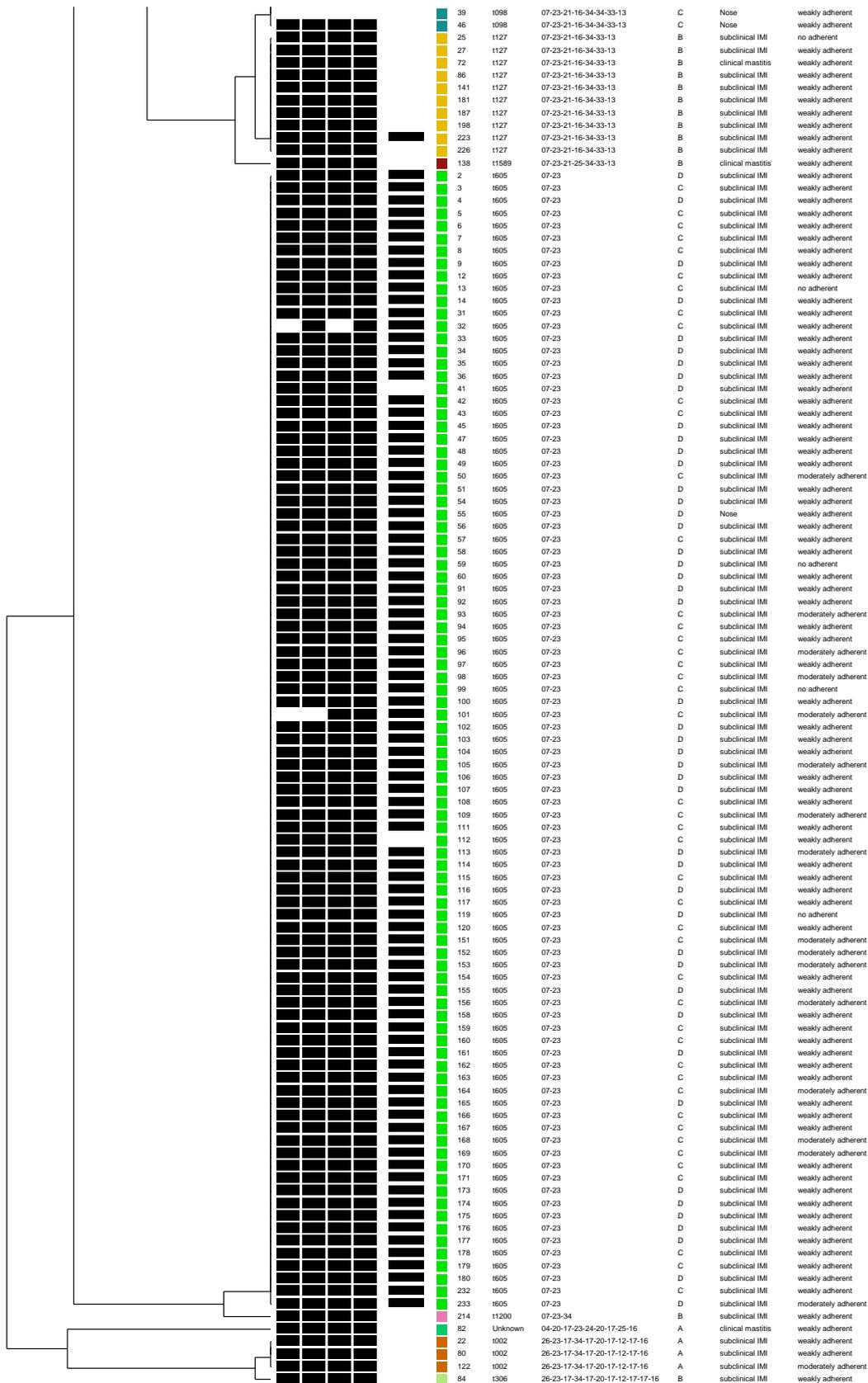


Figura 6. Dendrograma com agrupamentos pela metodologia UPGMA das associações entre o fenótipo e genótipo de biofilme, *spa* tipos e origem da mastite (cont...).

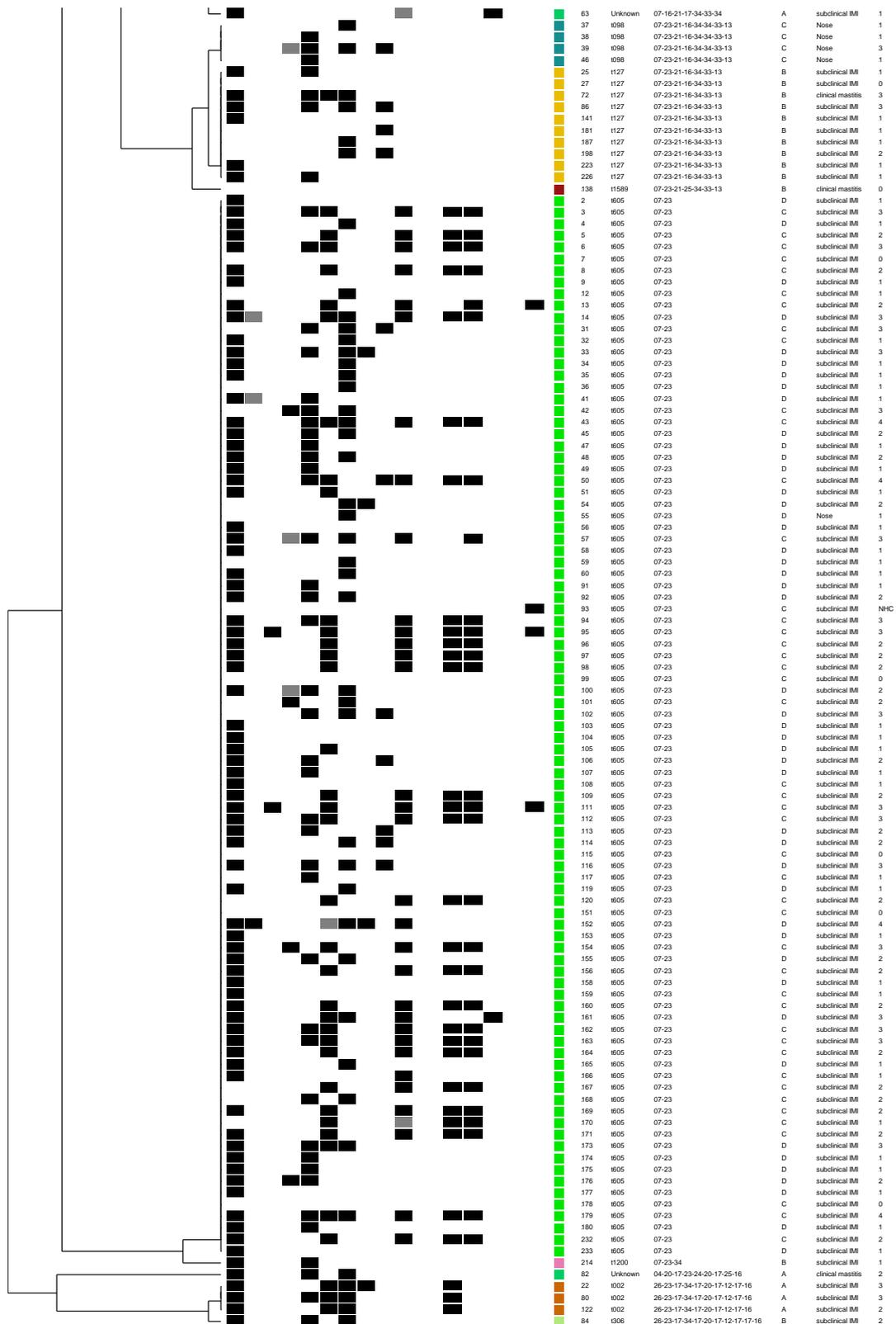


Figura 7. Dendrograma com agrupamentos pela metodologia UPGMA das associações entre o fenótipo e genótipo dos antimicrobianos, *spa* tipos e origem da mastite (cont...).

3.5.4 Análise de correspondência

No modelo de análise de correspondência e geração do mapa perceptual (Figura 8) foram incluídas as variáveis: fenótipos de biofilme (1-não aderente, 2-fraco e 3-moderado), gene *bap* (0-ausência e 1-presença), classes de ATMs (0-susceptível e 1 a 4 - n° de resistências), rebanhos (1-A, 2-B, 3-C e 4-D) e *spa* tipos (0-outros, 8-t267,11-t605 e 12-t6861). Em relação à variabilidade observada, ou inércia, foi obtido o valor de 27,96%, decomposto na 1ª dimensão e responsável pela explicação de 65,83% do modelo, e a 2ª dimensão por 14,44%. Somadas, as dimensões explicam 80,27% do mapa perceptual.

Na letra A, da Figura 8, foi apresentada a distribuição das variáveis nas duas dimensões, subdivididos em quatro quadrantes. Os cinco gráficos indicam as posições relativas das observações nas dimensões, letra B (Figura 8).

Comparando individualmente os rebanhos, no 1º quadrante, o rebanho A foi associado ao t6861 e à ausência de biofilme e gene *bap*. No 2º quadrante, o rebanho B teve associação com os *spa* tipos t267 e outros, biofilme fracamente aderente, ausência de biofilme, susceptibilidade antimicrobiana e resistência a um ATM. Os rebanhos C e D ocuparam o 3º quadrante e tiveram associação com o t605, biofilme moderadamente aderente e às resistências a dois, três e quatro antimicrobianos (Figura 8).

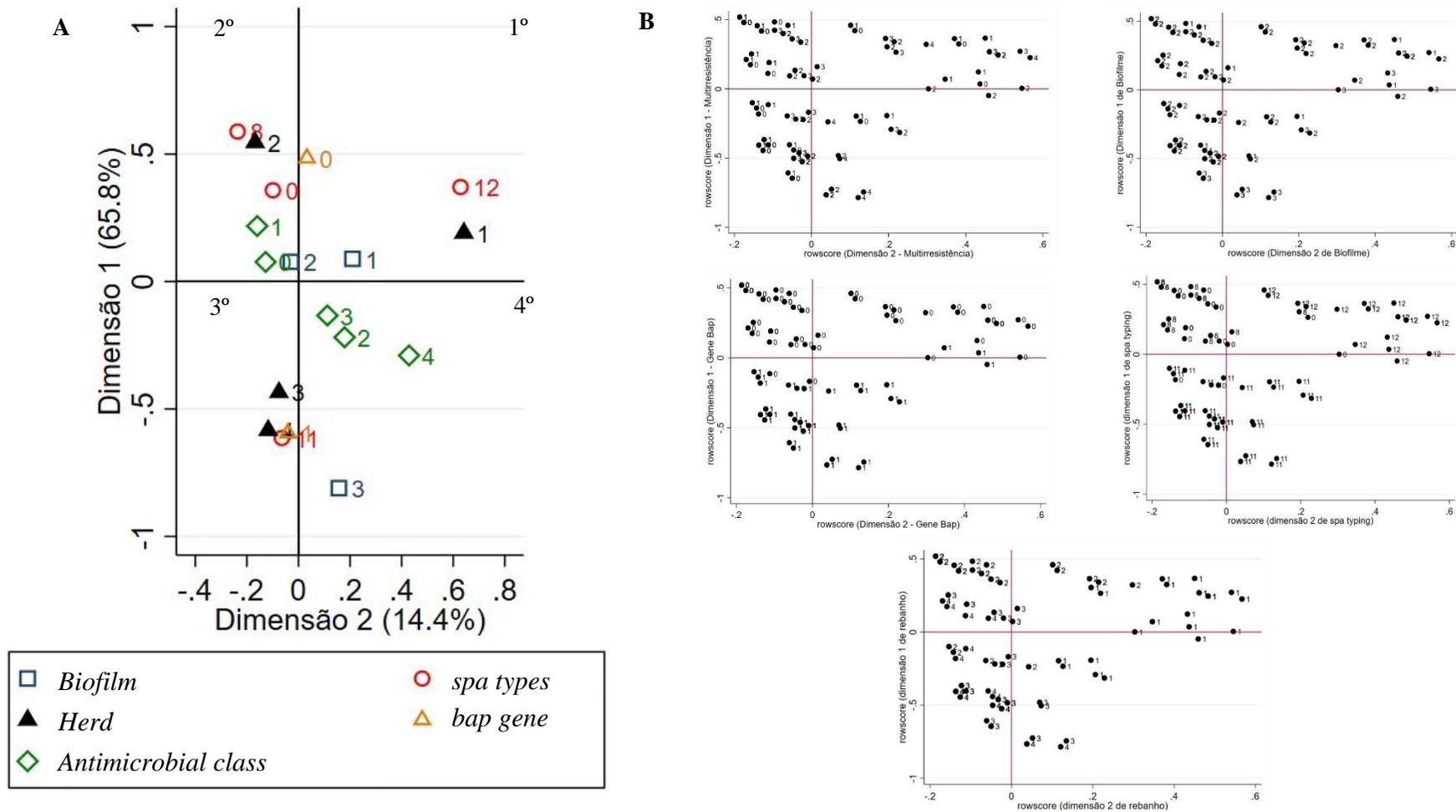


Figura 8. A: Mapa perceptual das variáveis que demonstraram associação no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$), representadas nos 4 quadrantes (1° ao 4°). B: Gráficos de posições relativas das observações.

4. DISCUSSÃO

Segundo os dados do Anuário Leite (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2020), o Sudeste vem se mantendo como a região de maior volume de leite produzido no Brasil, e Minas Gerais permanece como Estado com mais propriedades leiteiras e maior produção de leite do país. A necessidade de melhorias nos processos, alinhada a estudos que apontem os gargalos são fundamentais para o desempenho da cadeia leiteira. A respeito dos prejuízos, pode-se associá-los à presença constante de *S. aureus* na glândula mamária de vacas em lactação, com perdas caracterizadas por redução da produção e alteração da qualidade do leite, descarte dos animais e danos à saúde humana.

Os rebanhos avaliados durante este trabalho foram representativos do cenário de produção de leite do Brasil, uma vez que contemplou animais de graus de sangue variados, outros com predominância da raça holandesa, além de incluir diferentes municípios das mesorregiões de Minas Gerais, o estado de maior volume de produção leiteira.

Desta forma, a detecção do gene *nuc* nos 218 isolados utilizados neste trabalho permite a confirmação da espécie (ROSSI et al., 2019), por ser constitutivo do DNA de *S. aureus*, demonstrando a presença deste microrganismo nos animais. Resultados de cultivo celular em ágar BHI, fermentação em ágar sal manitol (utilizado na CIM) e testes Gram, coagulase e catalase confirmaram também a elevada presença deste microrganismo. A realização dos testes foi necessária pelo tempo de estocagem dos isolados, e possíveis contaminações, apesar de já terem sido submetidos anteriormente (2016) a métodos de identificação, como a análise proteômica no MALDI-TOF MS que permitiu a confirmação da espécie.

O mais conhecido e importante sistema regulador de *S. aureus* é o gene regulador acessório (*agr*), identificado desde a década de 1960. Este é descrito como um sistema de comunicação, *quorum sensing*, que ocorre entre células bacterianas pela liberação de moléculas sinalizadoras, em resposta a densidade celular (BAI; RAI, 2011).

O sistema AGR possui os genes *agrABCD*, transcritos pelo promotor P2, enquanto o promotor P3, contém o gene *hld* (delta-hemolisina) que não está envolvido no mecanismo de regulação dos fatores de patogenicidade do *agr*, e o RNA III, a molécula efetora do *locus agr* (NOVICK; GEISINGER, 2008; QUECK et al., 2008). Os genes *agrA* e *agrC* compõem o sistema de regulação de dois componentes do *locus agr*, e codificam as proteínas AgrA (regulador citoplasmático) e AgrC (receptor de histidina quinase). Os outros dois genes *agrB* e *agrD*

produzem, respectivamente, uma proteína integral de membrana e um protopeptídeo e, em conjunto, sintetizam o peptídeo autoindutor (PAI) (NOVICK; GEISINGER, 2008; QUECK et al., 2008).

O RNA III regula pelo menos 15 genes que codificam potenciais fatores de virulência (COELHO et al., 2011), embora não seja essencial para o crescimento de *S. aureus in vitro* (MELCHIOR et al., 2009). Considerando todos os rebanhos, 99,1% dos isolados apresentaram o gene *agr*, percentual que retrata a importância do gene em *S. aureus*, assim como identificado na totalidade dos isolados de MARQUES et al. (2013). Duas cepas que apresentaram ausência do gene *agr*, simultâneo a outros fatores de virulência (biofilme, superantígenos e leucotoxinas) foram coletadas da fossa nasal de vacas. A ocorrência de polimorfismos no gene *agr* foi descrita por COELHO et al. (2011) que mencionaram se tratar de microrganismos não patogênicos, com diminuição da produção de toxinas e enzimas extracelulares e, ao mesmo tempo, estão relacionados a um aumento da síntese de moléculas de adesão, como coagulase e proteína A. De fato, BELKUM et al. (1997) relataram que em humanos, a colonização nasal por *S. aureus* não foi mais eficiente com a presença destas proteínas.

Segundo FISHER et al. (2018), a regulação de um gene pode ser influenciada por vários sistemas, levando a etapas adicionais de regulação. Em concordância, além do Agr, existem outros sistemas reguladores da expressão de genes de patogenicidade em *Staphylococcus* spp., como *SarA*, *sigma β* e *LytSR*, atuantes em uma rede complexa de ativação e inibição dos fatores de patogenicidade associados, como à formação e à ruptura do biofilme (CASTRO, 2019).

Os papéis do *agr* e do sistema *quorum sensing* na formação de biofilme foram considerados desconhecidos por MARQUES et al. (2017), mas os resultados deste trabalho mostraram que em 214/216 isolados, houve a presença simultânea dos genes *agr* e do operon *icaABCD*. Em relação ao *agr* e *bap* foram 94/216, com predominância do fenótipo fracamente aderente em todos os isolados. Segundo PEDROSO et al. (2016), a regulação da formação de biofilme ocorre via locus *agr* que produz RNA III como seu principal efetor.

LI et al. (2017) relataram que a capacidade de *S. aureus* formar biofilmes tem sido um importante fator de virulência, pois os biofilmes podem tolerar agentes antimicrobianos, tornando a bactéria extremamente difícil de ser erradicada. De fato, em todos os rebanhos houve a presença dos genes de biofilme em mais de 99% dos isolados, e muitas vezes o operon

icaABCD esteve associado ao gene *bap*, mostrando a versatilidade da bactéria na montagem do biofilme e a resistência aos antimicrobianos.

A formação do biofilme ocorre em múltiplos estágios que incluem fixação inicial, formação de micro e macrocolônias, e descolamento com dispersão (FEY; OLSON, 2010; BOLES; HORSWILL, 2011), e ativação de proteases e/ou produção de modulinas solúveis em fenol (PSM) (OTTO, 2008).

O cluster *icaABCD*, um operon presente em *S. aureus* codifica a proteína adesina polissacarídica intercelular (PIA) ou N-acetilglicosamina polimérica (PNAG) (PIA/PNAG) que participa da etapa de adesão do biofilme. O gene *bap* está localizado em um transposon inserido em SaPIbov2, uma ilha de patogenicidade móvel estafilocócica, e segundo CUCARELLA et al. (2004), a proteína Bap mostrou ter relação com as etapas de fixação primária a superfícies inertes, como também na adesão intercelular durante a formação do biofilme.

LASA e PENADÉS (2006) observaram que isolados estafilocócicos contendo o gene *bap* eram fortes produtores de biofilme, mesmo na ausência do operon *icaADBC*. Nos resultados deste trabalho, não foi observada produção de biofilme fortemente aderente pelos isolados, mesmo na presença de *icaABCD* e *bap*. Neste caso, a formação de biofilme foi avaliada indiretamente, pela coloração da substância extracelular por cristal violeta e, segundo GÖTZ (2002), pode haver desempenho reduzido pelas condições de crescimento, ou pela incapacidade do biofilme aderir às placas de poliestireno. Os isolados de *S. aureus* podem produzir um biofilme de menor aderência ao poliestireno, quando comparado aos que geram no revestimento da glândula mamária (FOX et al., 2005), ou não produzir, como encontrado neste trabalho atual, apesar de apresentarem os genes *icaABCD* e *bap*. Por outro lado, dois isolados de *swab* nasal não apresentaram nenhum dos genes ligados a produção de biofilme e apresentaram fenótipo fracamente aderente. Deste modo, outros possíveis mecanismos, como as proteínas extracelulares (PSMs), a beta-hemolisina e o antígeno de superfície imunodominante B (IsaB) que se ligam ao DNA extracelular (eDNA) e funcionam potencialmente na estabilização do biofilme (MOORMEIER; BAYLES, 2017), podem ser responsáveis pela presença do biofilme.

Os números de vendas de antimicrobianos para uso veterinário em 25 países europeus, entre 2010 e 2015, indicam um aumento no consumo dos antimicrobianos considerados criticamente importantes (alta prioridade). Estes agrupam poucas classes e são reservados para infecções

graves, causadas por bactérias resistentes, enquanto os antimicrobianos de primeira escolha diminuíram de forma considerável (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2019).

No atual estudo foi avaliada a frequência de isolados resistentes entre oito antimicrobianos listados como criticamente importantes pela OIE, além de AMP e NOV que são também associadas nos manuais do CLSI ao tratamento de mastite bovina. Considerando todos os antimicrobianos, foi identificado fenótipo de resistência em pelo menos um dos isolados avaliados, fato que representa um sinal de alerta para a conduta dos tratamentos a mastite bovina.

Em estudos anteriores (AARESTRUP; JENSEN, 1998; HAVERI et al., 2005) já existiam relatos da utilização dos antimicrobianos β -lactâmicos na rotina dos tratamentos das IIM de bovinos por *S. aureus*, sendo comumente encontrados até os dias atuais. Desta maneira, a ocorrência de genes, como o *blaZ* (Tn552 - transposon/plasmídeo/cromossomo) codificador da enzima β -lactamase, o *mecA* (principalmente em isolados humanos) que codifica a proteína de ligação à penicilina (PBP2a), (OLSEN et al., 2006), e o gene *mecC*, presente em um novo SCCmec designado como tipo XI (SHORE et al., 2011), indicam a presença de mecanismos de resistência e são importantes de monitoramento nos rebanhos. O gene *mecC*, codifica a proteína PBP2 que possui 63% de homologia com PBP2a, produzida via *mecA*. Estes genes de resistência, normalmente são compartilhados por transferência horizontal, ou são selecionados por pressão ambiental, como ocorre na presença de antimicrobianos.

Em relação à AMP, os resultados deste estudo identificaram alta frequência do fenótipo de resistência dos isolados, em concordância com outros trabalhos (COSTA et al., 2013; WANG et al., 2016), no Brasil e China, respectivamente. De fato, como supracitado, a utilização rotineira de antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos associada à elevada resistência a AMP indicam que as escolhas precisam ser repensadas a fim de evitar a permanência e transmissão de genes como o *blaZ* e outros.

Os isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA, também descritos como MRSA) não amplificaram os genes *mecA* e/ou *mecC* neste estudo. Contudo, a ocorrência de outros mecanismos, ainda que rara (super produção de β -lactamases e presença de PBPs modificadas), associada a valores de MIC acima de 2 μ g/ml deve ser entendida como um isolado resistente (PAIANO; BEDENDO, 2009). Os ORSA/MRSA representam uma preocupação nos rebanhos leiteiros, visto que o consumo de leite e derivados contaminados pode desencadear a

transferência de cepas resistentes para seres humanos (SILVA et al., 2018). Assim como neste estudo, a maioria dos isolados de ORSA encontrados em três estados da Índia, testaram como multirresistentes (MISTRY et al., 2016).

Pela primeira vez, na região Sudeste do Brasil, a presença do gene *mecC* foi identificada em isolado livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA), originados de leite de vacas com mastite, com a ausência de amplificação do gene *mecA*. De forma interessante, os autores (ALVES et al., 2020) descreveram que nos testes fenotípicos *in vitro* (disco difusão e disco de cefoxitina), os isolados que amplificaram para o gene *mecC* não expressaram resistência. No atual estudo, os isolados com fenótipo de resistência à oxacilina, no teste CIM, não amplificaram os genes *mecA* e/ou *mecC*. Uma hipótese para ausência dos genes investigados, pode ser devido a presença de bombas de efluxo que funcionam como mecanismo de resistência aos MRSA (VIJAYAN et al., 2017). Um outro recente estudo revelou o primeiro relato de cepas de *S. aureus* fenotipicamente resistentes à oxacilina e amplificação de *mecC*, com tipagem associada ao ST126, em rebanho bovino leiteiro de Pernambuco (SILVA et al., 2020a).

A resistência à CEF de 0,4% em isolados de *S. aureus* foi também identificada por COSTA et al. (2013), em outros 35 rebanhos leiteiros de Minas Gerais. A resistência à CIP foi observada em 2,3% dos isolados, frequência semelhante aos estudos de LI et al. (2017). A presença do gene *mepA* em todos os isolados mostra a existência de uma bomba de efluxo no mecanismo de resistência a CIP. O gene *mepA*, um repressor transcricional com atividade autorregulatória, pertence a superfamília *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) (JANG, 2016). A resistência à CIP por antibiograma foi identificada por ABREU (2016), em 0,73% dos isolados de mastite por *S. aureus*.

O grupo dos macrolídeos (BARKEMA et al., 2006) e aminoglicosídeos (MARTINS et al., 2016) foram frequentemente consideradas para o tratamento da mastite bovina nos estudos anteriores.

Neste trabalho foi encontrada resistência à ERI (macrolídeo) em 2,3% dos isolados, enquanto para GEN (aminoglicosídeo), de 22,7%, semelhantes aos achados de LI et al. (2017) e COSTA et al. (2018), respectivamente. A resistência a GEN parece ocorrer de forma frequente nos rebanhos. Por isso, a prescrição do antimicrobiano deve ser realizada de forma cautelosa durante os tratamentos da mastite bovina, uma vez que foi identificada ampla dispersão do gene

aacA-aphD no leite. Tal mecanismo ocorre a partir da enzima *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* (enzima modificadora de aminoglicosídeo) codificada pelo gene *aacA-aphD* localizado no transposon Tn4001. Nos isolados resistentes à GEN, dos rebanhos A, C e D (atual estudo) houve amplificação de *aacA-aphD* em 65,3%.

Em relação aos macrolídeos, RABELLO et al. (2020) identificaram frequências de resistência variadas em outros estudos, com valores entre 0% a 10%, na maioria das vezes, corroborando com os achados deste atual trabalho. O gene *ermA* tem sido associado a isolados MRSA bovinos, com localização em transposons integrados a elementos do SCCmec II (WENDLANDT et al., 2013).

No Brasil, terapias com FFC são direcionadas para as afecções respiratórias de bovinos, com literatura escassa sobre sua utilização ou identificação de resistência na mastite bovina. No Canadá, SAINI et al. (2012), ao administrarem por via sistêmica o FFC para tratamento da mastite bovina, observaram resultados em que o antimicrobiano apresentou associação positiva com a resistência à AMP em isolados de *S. aureus*, e indicaram haver mecanismos de co-seleção, ou total casualidade. No presente estudo, os 79 isolados resistentes a FFC tiveram resistência simultânea à AMP em 86,1% dos casos. Em um isolado de *S. aureus*, de leite bovino, sensível à meticilina (MSSA) foi identificada a presença do gene *fexA* que promove resistência ao cloranfenicol (SILVA et al., 2013). Outros genes, como o *cfr* e *estDL136* promovem resistência ao FFC e, estão ligados às bactérias Gram-positivo (LU et al., 2018). COSTA et al. (2012) utilizaram o teste de antibiograma em 352 isolados de *S. aureus* (mastite clínica e subclínica), e encontraram 0,3% de resistentes ao FFC, não concordando com os achados do atual estudo.

A NOV pertence ao grupo de agentes antimicrobianos que podem ser utilizados nos tratamentos da medicina veterinária e humana. A associação à penicilina foi indicada no manual CLSI (VET02-03, 2008) e, parece ser a forma de maior utilização do medicamento nos tratamentos de IIMs por *S. aureus*. Assim como os resultados deste estudo, grande parte dos isolados de *S. aureus* foram resistentes a NOV, em Bangladesh (SALAUDDIN et al., 2020). Entretanto, quando a NOV foi avaliada de 2004 a 2008, nos isolados de *S. aureus* de 38 rebanhos leiteiros do Brasil foi observada uma elevada (98,58%) frequência de susceptibilidade (COSTA et al., 2012). *Staphylococcus aureus* vem sendo relatado com intrinsecamente susceptível a NOV, enquanto *Staphylococcus saprophyticus*, por meio do gene *gyrB*, apresenta resistência (VICKERS et al., 2007). A elevada frequência de resistência a NOV nos isolados deste atual

estudo sinalizam para uma possível transferência horizontal deste mecanismo de resistência para *S. aureus*.

A resistência à SUT, outro medicamento prescrito para o tratamento da mastite bovina, quando observada ocorre em menos de 10% dos isolados, contudo não vem sendo identificada na maioria dos estudos (RABELLO et al., 2020). Os números reforçam os resultados do atual estudo que encontrou 6,48% de resistentes dos isolados de *S. aureus*. Os primeiros mecanismos de resistência a SUT em *S. aureus* vieram de mutações do gene *drfB*, posterior a inserção de plasmídeos que codificam a proteína S1 (gene *drfA*) (REEVE et al., 2016).

Existe uma grande variação nas frequências de resistência relatadas para as tetraciclinas (RABELLO et al., 2007). No entanto, os genes plasmidiais *tet(L)* e *tet(K)* aparecem como os principais (HAUBERT et al., 2017) e codificam as proteínas que funcionaram como as bombas de efluxo do mecanismo de resistência. No trabalho atual, 93,9% dos isolados resistentes apresentaram um dos genes, confirmado a importância deste sistema.

No geral, existem vários mecanismos de resistência antimicrobiana identificados em *S. aureus*, e a observação de um, não exclui a presença de outros, seja da mesma classe do antimicrobiano testado, ou de outras.

Considerando a resistência antimicrobiana na produção animal envolvendo *S. aureus*, as taxas mais altas foram encontradas para penicilina (40 a 80%), eritromicina (20 a 60%), tetraciclina (20 a 60%) e oxacilina (20 a 60%) (VAN BOECKEL et al., 2019). Outro ponto de reflexão vem da variação encontrada nos testes de fenotipagem de antimicrobianos, com apresentação de valores superestimados quando é utilizado o teste de disco-difusão em comparação ao teste de MIC (MOLINERI et al., 2021). Portanto, sugere-se cautela nas comparações entre as diferentes metodologias.

Em um estudo anterior, a multirresistência foi observada em 69% dos isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina, e a resistência ocorreu em mais de dez antimicrobianos utilizados no tratamento da doença (WANG et al., 2014). De forma similar, pelo menos um isolado do atual estudo apresentou fenótipo de resistência ao teste MIC frente aos dez antimicrobianos avaliados e frequência de multirresistência (3 e 4) de 19,5%. Neste sentido deve-se considerar que oito antimicrobianos testados pertencem a lista de medicamentos criticamente importantes, o que sinaliza para uma possível facilidade, tanto na transmissão dos mecanismos de resistência, quanto na habilidade das bactérias abrigarem estes vários genes.

Neste estudo, 40 isolados de *S. aureus* exibiram multirresistência aos antimicrobianos, principalmente envolvendo os ATM de importância crítica. Ainda, os resultados mostram que 4/6 isolados resistentes à OXA foram multirresistentes, fatos que indicam uma preocupação entre os ATM de importância crítica, listados pela OIE e OMS (Figura 7). A resistência antimicrobiana vem se tornando um problema na pecuária leiteira e as evidências deste atual estudo indicam a necessidade da utilização racional dos medicamentos, principalmente quando se trata da manutenção da saúde única, reforçada pelo uso adequado e seguro.

Em relação à resistência envolvendo os seis isolados de narinas/focinhos (*swab* nasal) houve similaridade quando comparada às amostras de leite, pois foram mais frequentes entre a NOV (4/6) e FFC (4/6), conforme a Figura 7. A maior resistência entre os isolados de amostras de leite foi para a AMP, entretanto, NOV e FFC foram o segundo e terceiro mais representativos. Um isolado de *swab* nasal apresentou multirresistência a três ATM, e considerando a elevada resistência a FFC e NOV entre as diferentes amostras (leite e *swab* nasal) pode-se sugerir possíveis erros nos tratamentos das doenças respiratórias e IIM, com provável transmissão dos genes de resistência. Pelo menos um isolado de *S. aureus* apresentou resistência entre os 10 AMT testados, além do fato da resistência intermediária ser encontrada em ATM criticamente importantes, como o CEF, ERI, GEN e TET. No geral, os dados atuais enfatizam que as IIM causadas por *S. aureus* dizem respeito à saúde animal e pública, constatado pela elevada frequência de resistência aos antimicrobianos de uso comum.

Os métodos de tipagem foram desenvolvidos para estudos epidemiológicos ou para a análise de características e relações genéticas, cada um apresentado vantagens e desvantagens, de forma que é importante definir o propósito para tal escolha. Neste trabalho, o objetivo de discriminar os isolados para caracterização de seus fatores de virulência foi decisivo na definição pelo *spa* Typing.

Um ponto fraco dos atuais *primers* de tipagem de *spa* vem dos rearranjos na região de ligação a IgG do gene, fazendo com que 1 a 2% das cepas sejam designadas como “não tipificáveis” (VOTINTSEVA et al., 2014). No caso deste estudo, dois isolados não puderam ter as sequências identificadas e foram descartadas (sucessão de repetições incompleta). No entanto, houve amplificação nas PCRs, para o gene *spa* nos 218 isolados. O sequenciamento dos isolados descartados pode ter sido comprometido, pela falta de qualidade no preparo para a tipagem.

No geral, o sequenciamento da região X (repetitiva, altamente polimórfica e estável) do gene da proteína A (*spa*) pode ser usado para uma tipagem confiável, precisa e discriminatória de *S. aureus* (CUNHA, 2017). O *spa* Typing ainda pode ser comparado ao MLST, pois além de estarem estabelecidos em sites com recursos muito úteis (www.mlst.net e www.spaserver.ridom.de), permitem compartilhamento e análise substancial dos bancos de dados de genótipos. O recurso foi utilizado durante as considerações deste trabalho para identificar os complexos clonais (CC) e/ou as sequências tipos (ST). A análise MLST tem por base a identificação de sete genes conservados (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmK*, *pta*, *tpi* e *yqiL*) que por diversidade e variabilidade dos nucleotídeos formam as ST, resultando em agrupamento identificados por CC.

A presença de clones do CC 705 (antigo CC 151) em isolados de *S. aureus* associado à mastite bovina vem ocorrendo apenas neste hospedeiro (SAKWINSKA et al., 2011; FITZGERALD et al., 2012; BOSS et al., 2016), contudo não é incomum a presença de um mesmo CC interespecies. Por exemplo, GARCÍA-ÁLVAREZ et al. (2011) observaram que ao analisarem o gene *mecC* de isolados presentes em bovinos e humanos houve maior associação com o CC 130, e menor com a ST42518. No entanto, as duas linhagens de MRSA são usualmente relacionadas a animais e sugerem uma origem zoonótica do gene *mecC*, provavelmente em ruminantes, e com subsequente espalhamento para humanos (PÉREZ, 2019). As linhagens clonais CC 97 e CC 705 foram descritas como as mais prevalentes nos isolados de mastite bovina do mundo (KÄPPELI et al., 2019).

No Brasil, iniciaram-se em 1999, os estudos de tipagem molecular por *spa* Typing para os isolados de mastite bovina com prosseguimento até a atualidade (LANGE et al., 1999; AIRES-DE-SOUSA et al., 2007; ACOSTA et al., 2013; SILVA et al., 2013; BONSAGLIA et al., 2018; ROSSI et al., 2019; SANTOS et al., 2020), com maior frequência do *spa* tipo t605 (SILVA et al., 2013; BONSAGLIA et al., 2018), em concordância com este estudo.

A diversidade genética entre os isolados de *S. aureus* recuperados de casos de mastite bovina, ovina, caprina e bubalina demonstrou a presença do genótipo t605, apenas em bovinos (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007). Dentre os 23 *spa* tipos identificados por BONSAGLIA et al. (2018), o t605 aparece como mais frequente nos bovinos leiteiros. Um outro estudo avaliou bovinos submetidos a coleta mensal de leite que apresentaram em quatro coletas consecutivas, *S. aureus*. Os resultados do MLST e *spa* Typing, em um estudo anterior, mostraram que o CC 126 (t605, ST126) aparece em maior frequência na mastite bovina, e os isolados foram associados à

persistência e transmissão de mastite subclínica (ROSSI et al., 2019). A predominância do *spa* tipo t605, em isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de queijo, leite e de soro-fermento, de fazendas localizadas na região do Campo das Vertentes/MG (CASTRO, 2019) permitem evidenciar a ocorrência de uma ampla distribuição. No Irã, houve o primeiro relato do surgimento de CC 30 (t605) associado a isolados de MRSA provenientes de amostras clínicas humanas (GOUDARZI et al., 2020). No entanto, o CC 30 tem sido relacionado a isolados de *S. aureus* de origem hospitalar (HA-MRSA) e comunitária (CA-MRSA) (MONECKE et al., 2011).

Dos *spa* tipos identificados na China em rebanhos leiteiros com IIM por *S. aureus*, o t267 apresentou maior frequência entre os isolados (35,84%), como também foi o maior produtor de biofilme (ZHANG et al., 2020). De forma similar, o t267 foi o segundo mais frequente, apresentando o fenótipo fracamente aderente para a maior parte do isolados do presente estudo. No Sul da Índia o genótipo pareceu ser o ancestral clonal das outras cepas (por exemplo, t359), além de ser endêmico, e associado à mastite subclínica (MITRA et al., 2013). Nos resultados de VEH et al. (2015), o *spa* t267 mostrou baixa produção de biofilme, e a segunda maior frequência. Na Suíça, também foi identificado entre os mais comuns *spa* tipos e foi atrelado ao CC 97 (ST352/t267), contudo a cepa já foi relacionada a isolados humanos (KÄPPELI et al., 2019).

A identificação do *spa* tipo t6861 em dois isolados de mastite subclínica bovina na Índia (MITRA et al., 2013) foi o único relato da literatura acerca deste genótipo. No entanto, t6861 representou a maior frequência (87,2%) entre os isolados do rebanho A deste atual estudo, e ocorre nos registros do banco Ridom SpaServer pela Nova Zelândia, em 2010.

AIRES-DE-SOUSA et al. (2007) e SILVA et al. (2013) relataram a prevalência do *spa* tipo t127 no Brasil, entretanto já foi encontrado na Suíça (HUBER et al., 2010) e em províncias da Coreia do Norte e do Sul (HWANG et al., 2010) a partir de isolados de *S. aureus* originados de leite de vacas com mastite. Neste estudo, 10 dos 216 isolados foram identificados por t127 e estiveram presentes apenas no rebanho B, assim como os 61/216 *spa* tipos t267. Em termos ecológicos, parece haver uma pressão seletiva por parte das cepas t267, com a tentativa de se estabelecer no rebanho.

Um estudo realizado em Ruanda demonstrou a predominância do t1236 em amostras de leite de vacas com mastite, o *spa* tipo foi relacionado ao CC97 (ST97). O t1236 também foi detectado

entre *S. aureus* de leite bovino no Japão, e novamente foi associado ao CC 97 (ST97) (AKKOU et al., 2018). Neste atual estudo, quatro isolados deste genótipo foram identificados em apenas um rebanho, evidenciando uma provável pressão ambiental.

Uma revisão sobre a distribuição dos *spa* tipos mais prevalentes entre os isolados clínicos de humanos MRSA e MSSA, mostrou que o tipo t002 tem ocorrido na Europa, Ásia e nas Américas, sendo o mais frequente no Brasil. As principais correlações são com os CC5, CC8, ST5 e ao fenótipo MRSA (ASADOLLAHI et al., 2018). A ocorrência do genótipo em trabalhos anteriores é similar à encontrada neste trabalho (MITRA et al., 2013; SILVA et al., 2013). No entanto, apesar de poucos números, um isolado bovino MRSA se mostrou idêntico ou similar, quando comparado a uma amostra humana, por diferentes técnicas de sero e genotipagem (HATA et al., 2010).

Neste trabalho, o tipo t189 foi identificado em dois isolados de *S. aureus* coletados das narinas/focinhos (*swab* nasal) no rebanho C (Figura 5), como também em trabalhos de isolados de leite bovino em países asiáticos (YI et al., 2018), e em isolados clínicos de humanos em 5 países Europeus (ASADOLLAHI et al., 2018). Um estudo de variação genética de MRSA em leite bovino no Japão identificou a ST188 relacionada ao t189 (HATA et al., 2010), o t189 também foi relatado em hospitais da China, com frequência relativamente alta (CHEN et al., 2012). Neste mesmo país, amostras de isolados de ST188 MRSA foram detectados em leite bovino, e a presença pode indicar que os isolados são transmitidos entre humanos e animais (YI et al., 2018). Corroborando aos achados anteriores, no Brasil já foram identificados isolados de *S. aureus* do tipo t189 em mãos de manipuladores de queijo de fazendas, no estado de Minas Gerais, por CASTRO (2019). Desta forma, a presença de *S. aureus* em nichos extramamários representa uma possível fonte de transmissão do microrganismo para glândula mamária bovina (apesar de não ter sido encontrada nos isolados de mastite), e segundo os resultados deste atual estudo o t189 apresentou resistência ao FFC nos 2 isolados, e de forma variada a outros ATM criticamente importantes a saúde pública e animal.

O t098 foi identificado neste atual estudo, em quatro isolados coletados das narinas/focinhos (*swab* nasal) de animais do rebanho B (Figura 7), sendo associado a MSSA (<http://www.spaserver.ridom.de/>). O *spa* tipo também foi descrito em fossas nasais humanas (HOLTFRETER et al., 2007) e de animais silvestres (cervos e javali) (SILVA et al., 2020b). Os resultados dos *swabs* nasais, deste presente estudo, concordam com os dados genotípicos obtidos na citação anterior, e na literatura não foram encontradas descrições desta cepa no leite

bovino. No entanto, a presença de t098 em humanos e animais indica uma possível transferência entre hospedeiros.

Apenas um isolado de t306 foi identificado neste estudo, sendo a mesma frequência observada nos trabalhos de MEKONNEN et al. (2018) e TAREKGNE et al. (2016), em isolados de *S. aureus* de leite de vacas com mastite na Etiópia.

MRSA da linhagem clonal CC 398 (ST398) referente ao *spa* tipo t1200 é o genótipo mais frequente em granjas de suínos da Europa (LOCATELLI et al., 2017; PARISI et al., 2019; SIMON et al., 2020). A presença do CC 398 (ST398, t1200) em rebanhos leiteiros vem sendo raramente relatada, e quando ocorre, sugere concomitante criação de suínos na fazenda, ou que o ordenhador realiza também, atividades ligadas à suinocultura (FESSLER et al., 2010).

O genótipo t359 foi descrito em isolados de leite de vacas com mastite, representando as maiores frequências entre os 91 rebanhos bovinos, analisados do Canadá (PICHETTE-JOLETTE et al., 2019). No atual estudo, apenas uma amostra apresentou o isolado t359, em concordância com SHEET et al. (2019) que analisaram leite de bovinos com IIM de fazendas no Norte da Alemanha.

Segundo dados da frequência relativa global sobre os *spa* tipos, o t002 tem associação ao CC5 (ST5/ST231) e representa 6,57% dos isolados, enquanto o t127 foi relacionado ao ST1 e possui 2,64%, sendo o Brasil citado no Ridom SpaServer, entre os países de origem nos dois tipos.

O *spa* tipo t1589 foi associado a isolados MRSA em humanos (BOSWIHI et al., 2020), sendo apenas esta referência citada na literatura. Embora no presente estudo tenha sido identificado um isolado, destaca-se que não existem relatos indicando a presença desta tipagem em animais.

O Ridom SpaServer permitiu verificar os registros de t7433 realizados pelo Canadá (2010), Suécia (2011) e Irlanda (2018). No entanto, na literatura existe apenas um trabalho realizado em uma maternidade irlandesa, com um isolado clínico (BRODERICK et al., 2021).

Nas observações do mapa perceptual, os rebanhos C e D foram associados ao genótipo t605 (93,8%), à presença do gene *bap*, ao fenótipo de biofilme moderadamente aderente e à resistência dois e a multirresistência (três e quatro ATM). O rebanho A apresentou simultaneamente associação com o t6861, ausências do gene *bap* de aderência do biofilme, resistência a um antimicrobiano e o rebanho B manteve associações com o t267, ausência de gene *bap*, biofilme fracamente aderente e resistência a dois antimicrobianos. Desta forma, as

associações das variáveis podem indicar um mecanismo de estabelecimento dos clones nestes rebanhos.

AIRES-DE-SOUSA et al. (2007) sugerem que alguns clones especializados são responsáveis pela maioria dos casos de mastite dentro da mesma fazenda e que alguns clones de *S. aureus* podem ter uma ampla distribuição geográfica. De fato, entre os isolados dos rebanhos houve um clone mais frequente. No entanto, os eventos de troca de hospedeiro de *S. aureus* têm sido associados ao surgimento de cepas endêmicas de gado, e as vacas são o principal reservatório animal para o surgimento de clones epidêmicos humanos (RICHARDSON et al., 2018)

Um número reduzido de isolados foi identificado entre os genótipos t002, t098, t127, t189, t306, t359 t1200, t1236, t1589 e t7433, e considerando as variações presentes nas sucessões de repetição pode-se inferir algumas sugestões de proximidade e distância entre as cepas.

5. CONCLUSÕES

A distribuição dos *spa* tipos nos quatro rebanhos sugere que uma cepa predomina sobre um determinado rebanho. As maiores frequências dos *spa* tipos t6861 e t267 foram observadas nos rebanhos mestiços A e B, enquanto nos rebanhos holandeses C e D, foi o t605.

Dois novos *spa* tipos foram identificados e serão submetidos à Curadoria do banco de dados do Ridom SpaServer.

A frequência de amplificação dos genes *icaABCD* e *bap* foi associada ao fenótipo fracamente aderente e pode estar associada à resistência dos isolados.

O fenótipo de resistência antimicrobiana e os genes de biofilme foram encontrados na maior parte dos isolados, sugerindo que os genótipos são utilizados na codificação de proteínas que promovem a resistência.

Os perfis de resistência antimicrobiana sugerem que novas estratégias de escolha e o uso racional dos medicamentos precisam ser implementados na pecuária leiteira.

A identificação de resistência a NOV nos isolados apontam para uma possível transferência horizontal do mecanismo *gyrB* para *S. aureus*.

A multirresistência foi encontrada em 20% dos isolados e representam uma preocupação, uma vez que oito destes antimicrobianos fazem parte da lista da OIE como criticamente importantes.

A identificação de t6861, frequente no rebanho A, representa o primeiro relato no Brasil, e intrigou pela ausência de hipóteses de aquisição ou perda de partes do DNA da proteína A.

As variáveis fenótipo de biofilme, gene *bap*, classes de ATMs, rebanhos e *spa* tipos apresentaram associação significativamente estatística, e podem ser consideradas nos planejamentos de controle da mastite bovina causada por *S. aureus*, no tocante à promoção de uma saúde única equilibrada, entre humanos, animais e meio ambiente.

Capítulo 2

Variabilidade genética, fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* de origem bovina e potencial para desenvolvimento de vacinas

1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem atuando como um importante *player* na cadeia produtiva do leite, e figura como o quarto maior produtor do mundo (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2020). Para se manter neste cenário competitivo, o controle eficiente da mastite representa uma medida necessária. Para isso, a realização de estudos epidemiológicos que visam a identificação de *S. aureus*, principalmente em bovinos leiteiros com mastite subclínica, permitem que sejam adotadas estratégias assertivas para o controle ou eliminação deste patógeno.

Staphylococcus aureus apresentam uma ampla diversidade de fatores de virulência. Entre estes, algumas proteínas de superfície vem sendo apontadas como antígenos candidatos para a produção de vacinas, uma vez que atuam de forma essencial nos estágios iniciais de estabelecimento do processo infeccioso, ou seja, durante a aderência, internalização de células epiteliais e fagocíticas, como também na colonização da glândula mamária (BROUILLETTE et al., 2003; SHKRETA et al., 2004; TALBOT; LACASSE, 2005 STRANGER-JONES et al., 2006; PROCTOR, 2012; JANSEN et al., 2013; FOSTER et al., 2014).

A produção de vacinas bovinas estafilocócicas, que promovam a curar ou previnam novas infecções intramamárias, tem sido objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Alguns autores descrevem que uma boa formulação deve incluir diversos antígenos expressos, preferencialmente por diferentes cepas (PEREIRA et al., 2011; JANSEN et al., 2013). Portanto, a definição destes antígenos está ligada à identificação das variabilidades das cepas e à frequência dos genes codificadores nos rebanhos bovinos leiteiros.

No trabalho de CUNHA et al. (2020) foram elencadas seis proteínas candidatas a preditoras de prevenção e cura da mastite bovina. As quatro indicadas à prevenção foram a subunidade alfa da F₀F₁ ATP sintase (SAS), uma proteína transmembrana com envolvimento no metabolismo energético da célula bacteriana, a succinil diaminopimelato desuccinilase (SDD), uma enzima citosólica essencial para o crescimento bacteriano e um alvo antimicrobiano farmacológico (DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2019), a cisteinil-tRNA sintetase, uma enzima citoplasmática catalisadora da ligação do aminoácido cisteína ao tRNA, mas também possui função de doar o aminoácido para outras moléculas (FRANCKLYN; MINAJIGI, 2010) e o fator de alongamento Ef-G (FAG), uma proteína citosólica que catalisa o passo de translocação, durante a fase de alongamento da síntese de proteínas através do avanço de um códon do mRNA (CALDAS et al., 2000). A ocorrência de mutação no gene *fusA* (FAG), sem alterações na função da proteína,

tem promovido a resistência antimicrobiana ao sítio de ataque do ácido fusídico (NAGAEV et al., 2001).

As proteínas relacionadas à cura foram a fosfogliceratoquinase (FGQ), uma enzima transmembranar relacionada ao metabolismo energético (via glicolítica), a enolase (ENO) definida como *moonlighting* por apresentar uma região estrutural ligada à membrana, enquanto no citoplasma, atua na autólise bacteriana (divisão e reparação de peptidoglicanos) (YU et al., 2011).

Staphylococcus aureus expressa ainda muitos outros fatores de virulência, como as moléculas de matriz adesiva de reconhecimento de componentes da superfície microbiana (MSCRAMMs), que facilitam sua aderência com sucesso (FOSTER et al., 2014). Neste grupo incluem proteínas de superfície, como fator de aglutinação (ClfA e ClfB), repetição de serina-aspartato contendo proteína C (SdrC), D (SdrD) e E (SdrE) (AJAYI et al., 2018). ROSA (2016) descreveu o potencial imunogênico de SdrD e SdrE e da proteína IsdH, como possíveis antígenos para o desenvolvimento de vacinas contra a mastite por *S. aureus*. As proteínas de superfície reguladoras de ferro da família Isd, (IsdA, IsdB e IsdH) atuam no sequestro de ferro em *S. aureus* (FOSTER et al., 2014).

De fato, a frequência dos genes codificadores de proteínas que atuam como fatores de virulência, podem auxiliar na compreensão da epidemiologia e escolha de alvos vacinais para *S. aureus*. A resposta imunológica do hospedeiro contra estas proteínas poderia levar à inibição de suas funções, prevenindo ou curando o hospedeiro da infecção.

HOLTFRETER et al. (2010) relataram uma menor resposta imunológica contra proteínas citosólicas, quando comparada às proteínas de superfície. Entretanto, presumiu-se que a localização de proteínas citosólicas não é restrita ao citoplasma. Além disto, as proteínas citoplasmáticas podem se tornar acessíveis ao sistema imune após a lise bacteriana (CUNHA et al., 2020).

Outros entraves quanto à mastite bovina vêm das alterações promovidas no leite, como no caso da presença de toxinas estafilocócicas que representam riscos de doenças para os humanos. De forma preventiva, a investigação de genes ligados à produção de superantígenos (SAg) reflete na segurança alimentar do produto e indica a sanidade do rebanho. De acordo com EVENSON et al. (1988), uma dose infectante de 200 ng pode ser suficiente para causar sintomatologia, por consumo de alimentos contendo algumas enterotoxinas, como a SEA. Além disto, o

comprometimento da sanidade do rebanho por toxinas que afetam o epitélio glandular gera perdas econômicas e na produção animal. Os SAgs são frequentemente submetidos a múltiplas, e sobrepostas, vias regulatórias, que ainda sofrem influência de fatores ambientais (FISHER; OTTO; CHEUNG, 2018).

Os isolados de *S. aureus* originados de mastite bovina podem potencialmente secretar cinco diferentes pares de leucocidinas, das quais quatro foram descritas no ataque aos neutrófilos bovinos, sendo estas LukMF, LukED e γ -hemolisinas (HlgAB, HlgCB) (BARRIO et al., 2006; SPAAN et al., 2015; VRIELING et al., 2015). A leucocidina Panton-Valentine é codificada por genes, especificamente descritos em humanos, *lukS-PVL* e *lukF-PVL (pvl)* (ARTURSSON et al., 2016), formando os bi-componentes.

O monitoramento destes fatores de patogenicidade em *S. aureus* através da identificação de genes ligados à produção de leucotoxinas torna-se necessário para o entendimento da epidemiologia da mastite, assim como da transmissão de genes interespecies.

Alguns açúcares estão envolvidos em sofisticado mecanismo de transporte e fosforilação através da membrana celular dos microrganismos, sendo denominados de sistema fosfotransferase de açúcares (PTS). O PTS é formado pela junção da enzima I e a fosfoproteína com histidina (proteínas comuns), com as enzimas II (EII) específicas para os açúcares. No caso de *S. aureus*, a EII é codificada pelo gene *lacE*, localizada no *operon* lactose (*lac*). A enzima EII atua no transporte ativo da lactose, o principal carboidrato do leite, e na ausência de EII não haveria a absorção do carboidrato pelo PTS (POSTMAL; LENGELER, 1985). O gene tem sido citado como um fator de virulência, com potencial de influenciar o crescimento bacteriano, aliado ao fato de a lactose ser o principal carboidrato do leite (SHARER et al., 2010).

Staphylococcus protein A (Spa) também faz parte da parede celular da bactéria e possui afinidade pela porção Fc das imunoglobulinas (IgGs), promovendo a ausência de resposta celular (CUNHA, 2015), representando um importante alvo na tipificação e fator de patogenicidade.

Conforme demonstrado por vários métodos de tipagem (FOURNIER et al., 2008; GRABER et al., 2009; SMITH et al., 2005a), dentro da maioria dos rebanhos, uma cepa predominante de *S. aureus* se espalha, devido às suas propriedades patogênicas e contagiosas, mas pode coexistir com várias outras (PICCININI et al., 2010). Portanto, a identificação da cepa torna-se essencial

para a correta classificação dos reservatórios, principalmente quando há várias cepas de *S. aureus* ocorrendo no mesmo rebanho (SOMMERHÄUSER et al., 2003).

Desta forma, a genotipagem *spa* é baseada no número, sequência e tipo de repetições na região hipervariável da proteína A de *S. aureus*, e os resultados podem ser comparados em um robusto banco de dados, Ridom SpaServer. Os *spa* tipos podem ser comparados ao MLST, uma metodologia que utiliza o sequenciamento de 7 genes constitutivos de *S. aureus*, descritos em sequências tipos (ST), ou agrupadas em complexos clonais (CC). No caso da mastite bovina os clones de *S. aureus* têm sido classificados nos CC151, CC97, CC133, CC479 e CC771 (ZADOKS et al., 2011).

Outros métodos como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (BARDIAU et al., 2013; LUNDBERG et al., 2014) têm sido úteis para obtenção de informações sobre a patogênese da mastite bovina causada por *S. aureus*, mas o baixo rendimento e alto custo, são menos apropriados para grandes investigações clínicas e análises de rotina em medicina veterinária (BOSS et al., 2016).

Durante este trabalho foi realizada uma investigação de possíveis genes alvos ligados a fatores de virulência, como os codificadores de proteínas candidatas ao desenvolvimento de vacinas, superantígenos e leucotoxinas. O intuito foi entender a epidemiologia, e como os genes contribuem para a ocorrência da doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da frequência dos genes de virulência de *S. aureus* relacionados às proteínas de membrana candidatas ao desenvolvimento de vacinas (CUNHA, 2015; ROSA, 2016), leucotoxinas e superantígenos foi realizada em isolados de *S. aureus* oriundos de amostras de leite de vacas com mastite. Quatro rebanhos, com seus respectivos graus de sangue, foram utilizados para as coletas das amostras de leite, conforme o item 2.2 no Capítulo 1. Todo o critério de inclusão dos isolados, reativação das bactérias, extração de DNA e verificação do gene da termonuclease (*nuc*) foram relatados no Capítulo 1 (itens 2.3, 2.4, 2.6 e 2.8).

2.1 Critério de inclusão dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas

Nove proteínas candidatas ao desenvolvimento de vacinas para a mastite causada por *S. aureus* foram escolhidas por apresentarem uma resposta antigênica satisfatória nos trabalhos de ROSA (2016) e CUNHA (2015). Na sequência, os respectivos genes codificadores das proteínas foram

identificados, e desenhados conjuntos de *primers* específicos para amplificação das regiões de interesse. No trabalho de ROSA (2016), duas proteínas da família Sdr (repetição serina-aspartato), SdrD e SdrE, e a proteína reguladora de ferro, IsdH, foram sugeridas como antígenos vacinais. Do trabalho de CUNHA (2015), foram consideradas seis proteínas: a enolase, o fator de alongamento Ef-G (FAG), a fosfogliceratoquinase, cisteinil-tRNA sintetase, a subunidade alfa da F₀F₁ ATP sintase, succinil diaminopimelato desuccinilase. As quatro primeiras proteínas foram candidatas a preditoras de prevenção, e as duas últimas candidatas a preditoras de cura da mastite bovina por *S. aureus*. Na Tabela 1 estão apresentados os *primers* dos genes de proteínas candidatas ao desenvolvimento de vacinas e seus controles de referência.

2.2 PCR dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas

A realização das amplificações seguiu as mesmas condições descritas nos itens 2.7 e 2.8, do Capítulo 1, com ajustes nas concentrações dos *primers* alvos dos genes: *eno* (enolase), *fusA* (FAG) e *cysS* (cisteinil-tRNA sintetase). Todos os controles de referência das reações de qPCR para os genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas foram apresentados na Tabela 1. As concentrações utilizadas para os *primers forward/reverse* foram as seguintes: *eno* 0,1/0,6 µmol, *fusA* 0,3/0,6 µmol e *cysS* 0,3/0,1 µmol, respectivamente. As adequações minimizaram a formação de dímeros pelos *primers*.

2.3 PCR dos genes de leucotoxinas, superantígenos e enzima EII

Os genes *lukE-lukD* (*lukED*) e *lukF/S-PV* (*pvl*) (referentes às leucotoxinas E-D e de Panton-Valentine, assim como os genes *sea*, *seb*, *sec1* e *tst*, ligados à produção de superantígenos e a enzima EII, parte do sistema de transporte da lactose foram verificados entre os 218 isolados de *S. aureus*. As condições para as amplificações foram descritas no item 2.8 do Capítulo 1, apenas com modificações nos conjuntos de *primers* e nos seus controles de referência (Tabela 2).

Tabela 1. Proteínas candidatas a vacina, seus respectivos genes, *primers*, *amplicons* e controles de referência para amplificação de isolados de *S. aureus* por qPCR

Proteínas	Genes	<i>Primers</i>	Tamanho em pb	Controle de referência	Referência
Repetição serina- <i>aspartato</i> D	<i>sdrD</i>	F - CTAATAACCAAAGTGGCGGAGCTG R - ACAGTTACATTGCCAACGCCTTTT	121 pb	ATCC 12600	Neste trabalho
Repetição serina- <i>aspartato</i> E	<i>sdrE</i>	F - GGCGACGGTACTGTAAACCTGAA R - TTGGAAGATATCCAGTTGGCGTTT	256 pb	ATCC 12600	Neste trabalho
Reguladora de ferro H	<i>isdH</i>	F - TTCATCCGCTGCAGGATAGTTTTT R - TACTTCTCAACATCAAGCGCAAGC	169 pb	Isolado 172*	Neste trabalho
Enolase	<i>eno</i>	F - ACTGCAGTAGGTGACGAAGGTGGTT R - AGTCAACTTGTCTGCAGCTGTACGT	226 pb	Isolado 41*	Neste trabalho
Fator de alongamento (Ef-G)	<i>fusA</i>	F - CATCGGTGGTATGGGTGAGCTTCA R - CCACGACCACCAGATTGACGAGAG	165 pb	ATCC 12600	Neste trabalho
Fosfoglicerato quinase	<i>pgk</i>	F - GTACCAGAAACACGCGGCGAAAA R - CTCACGATGCGCAGTACCAAAGC	198 pb	ATCC 12600	Neste trabalho
Cisteinil-tRNA sintetase	<i>cysS</i>	F - TGCATATGAAAGTGGTGGCGATGT R - TCCAATAATCTCGCCAGGCTTCG	182 pb	ATCC 12600	Neste trabalho
Subunidade alfa da F0F1 ATP sintase	<i>atpF</i>	F - CGATGACTTAGGTGGCGGTTCAATT R - TGCAGATCCACCAACACGAGATACA	196 pb	ATCC 12600	Neste trabalho
Succinil diaminopimelato desuccinilase	<i>dapE</i>	F - ATCCATCTATCGGTGTGAATGCGGG R - ACCAATGTTAGTTGTCACGTCACCCA	185 pb	ATCC 12600	Neste trabalho

Legenda: * os isolados de 172 e 41 foram sequenciados e utilizados como controles de referência.

Tabela 2. Leucotoxinas com os respectivos genes, *primers*, *amplicons*, controles de referência e localização para amplificação de isolados de *S. aureus* por qPCR

Proteínas	Genes	<i>Primers</i>	Tamanho pb	Controle/ referência	Referência	Localização do gene
Leucotoxina ED	<i>lukED</i>	F - TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG R - TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	269 pb	Isolado 169	(JARRAUD et al., 2002)	ilha de patogenicidade (vSaβ)
Leucotoxina de Pantón-Valentine	<i>pvl</i>	F - GTCTCAAACAAATGACCCCAATGT R - CATTACCTCCTGTTGATGGACCACT	138 bp	ATCC 25923	Neste trabalho (MEHROTRA, et al., 2000)	Prófago
Enterotoxina A	<i>sea</i>	F - GGTTATCAATGTGCGGGTGG R - CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102 pb	ATCC 13565	(MEHROTRA, et al., 2000)	Prófago
Enterotoxina B	<i>seb</i>	F - GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC R - CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164 pb	ATCC 14458	(MEHROTRA, et al., 2000)	ilha de patogenicidade (SaPI3)
Enterotoxina C	<i>sec</i>	F - AATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAA R - ATCAAATCGGATTAACATTATCCATT	80 bp	ATCC 19095	(KLOTZ et al., 2003)	ilha de patogenicidade (SaPIbov)
Toxina da síndrome do choque tóxico 1	<i>tst</i>	F - ACCCCTGTTCCCTTATCATC R - TTTTCAGTATTTGTAACGCC	326 pb	ATCC 51651	(MEHROTRA, et al., 2000)	ilha de patogenicidade (SaPIbov1)
Enzima EII	<i>lacE</i>	F - AATCCATCACGGATGGCTCTTAAA R - GCAAAAATTGATCGCACAAATTGA	90 bp	ATCC 12600	Neste trabalho	<i>operon lac</i>

Legenda: * o isolado 169 foi sequenciado e utilizado como controle de referência.

2.4 *spa* Typing dos isolados de *Staphylococcus aureus*

A realização da metodologia de *spa* Typing foi descrita nos itens 2.11 ao 2.13, Capítulo 1, com montagem dos MST e dendrograma. Neste capítulo 2, as variáveis utilizadas para a montagem do mapa perceptual, assim como para a criação do dendrograma, foram obtidas das comparações com associação estatisticamente significativas no Teste Exato de Fisher.

2.5 Análise estatística

Inicialmente foram realizadas análises descritivas das variáveis incluídas no estudo, com a determinação de suas frequências absolutas e relativas, como também elaborados gráficos de distribuição de frequências.

Para verificação de possíveis associações entre as variáveis foi realizado o Teste Exato de Fisher e considerado um nível de significância estatística de 5%. O teste permitiu avaliar as associações entre as variáveis categóricas.

Todos os genes para o desenvolvimento de vacinas, leucotoxinas e de superantígenos foram comparados com os rebanhos (A, B, C e D) e aos *spa* tipos (13 identificados e 2 *unknowns*). Os *spa* tipos receberam quatro categorizações, distribuídos pelas frequências apresentadas, t605 (42,12%), t267 (28,24%), t6861 (15,74%) e outros (13,89%), a fim de melhorar o desempenho do teste, e do modelo estatístico.

Quando foram observadas associações estatisticamente significativas entre as variáveis consideradas anteriormente, houve sua inclusão na análise de correspondência.

A definição pela análise de correspondência multivariada derivou da natureza categórica dos dados, atendendo ao objetivo deste modelo estatístico. Os resultados permitiram observar as relações entre as variáveis em suas dimensões e, posteriormente avaliou-se as distâncias dos graus de associação, representados espacialmente no mapa perceptual. As variáveis com associação estatisticamente significativas foram selecionadas a comporem o modelo de análise de correspondência múltipla, tomando-se por base uma matriz na qual as linhas correspondiam aos indivíduos e as colunas às categorias de variáveis de acordo com MINGOTI (2005). A seguir, as variáveis que apresentaram uma contribuição relativa para a inércia inferior ao limite usualmente recomendado, de $1/Q$, em que Q é o número de variáveis (LE ROUX; ROUANET, 2004), foram descartadas, e uma nova análise de correspondência múltipla foi então realizada com as variáveis remanescentes. Foi identificada a relação entre as categorias por meio da

análise do mapa de perceptual da correspondência e da contribuição relativa das categorias para a inércia.

Para o desenvolvimento da análise de correspondência e geração do mapa perceptual foi utilizado o Software Stata 16, para Windows 10 Pro (STATA, 2018).

3. RESULTADOS

3.1 Distribuição dos genes candidatos a vacinas entre os rebanhos e *spa* tipos

As frequências dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas para a mastite bovina estão apresentadas nas Figuras 1 e 2, considerando os rebanhos e *spa* tipos, respectivamente. Os 218 isolados apresentaram amplificação nos nove genes candidatos a vacina, no rebanho A. O gene *sdrD* representou menos de 21% da amplificação nos rebanhos B, C e D, enquanto os outros genes tiveram frequências acima de 86%, 90% e de 100%, respectivamente (Figura 1). As comparações mostraram associação entre os rebanhos, e os genes *sdrD*, *sdrE* e *pgk* ($p \leq 0,05$), como indicado por asterisco*, na Figura 1.

Os *spa* tipos foram agrupados em quatro categorias, t605, t267, t6861 e outros (t002, t098, t127, t189, t306, t359 t1200, t1236, t1589 e t7433). Conforme mencionado anteriormente, 86% (186/216) dos isolados apresentaram os *spa* tipos t605 (91), t267 (61) e t6861 (34). O t605 foi identificado em 91 dos 97 (93,81%) dos animais pertencentes ao rebanho B, com o genótipo presente em todo o rebanho D (46/46 animais), e em 88,24% (45/51 animais) dos isolados no rebanho C. O rebanho B apresentou oito diferentes *spa* tipos, e ao rebanho A pertencem as duas cepas classificadas como *Unknowns*. Os resultados da distribuição da frequência absoluta, entre os *spa* tipos e os respectivos rebanhos, foram apresentados na Tabela 12, do Capítulo 1.

A distribuição dos nove genes entre os *spa* tipos foi semelhante ao observado nos rebanhos, uma vez que existiu uma predominância de 87,18% (34/39) do *spa* tipo t6861 em A, 76,25% (61/80) de t267 em B e, o total de 93,81% (91/97) para a soma dos rebanhos C e D. A frequência de cada gene, nos respectivos *spa* tipos foi apresentada na (Figura 2), com a categoria outros agrupando o restante dos genótipos.

Considerando o *sdrD* na categoria outros, houve amplificação de 56,7% dos isolados, enquanto t605 e t267 ficaram abaixo de 17%, e t6861 teve 100% de resultados positivos. Os *spa* tipos t605, t267 e t6861 apresentaram o gene *sdrE* em mais de 98% do isolados de *S. aureus*, enquanto na categoria outros foi encontrado em 53,3%. Para os sete genes candidatos a vacina

mostraram frequência superior a 93%, entre os *spa* tipos. A Figura 2 reuniu a frequência dos nove genes distribuídos nas categorias dos *spa* tipos.

Na Tabela 3, considerando a presença dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas nos rebanhos A, B, C e D, pode-se observar uma reduzida frequência de *sdrD*, nos rebanhos B, C e D, enquanto os outros oito genes foram identificados em mais de 86% dos isolados em cada rebanho.

Na Figura 3, a letra B corresponde à frequência absoluta dos nove genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas, no total de isolados. O gene *srdD* mostrou o pior desempenho, com amplificação em apenas 34,4% dos isolados. No restante dos isolados foi identificada a presença dos genes em mais de 92% das PCRs, e os melhores desempenhos (99,5%), para os genes *fusA* e *atpF*.

Em relação às comparações entre os nove genes alvos de vacinas e os rebanhos foram identificadas associações entre os genes *sdrD*, *sdrE* e *pgk* e os rebanhos. As maiores frequências foram entre o *sdrD* e rebanho A, o *sdrE* e os rebanhos A e D, enquanto o *pgk* esteve mais presente em A, B e D (Figuras 1 e 2) ($p \leq 0,05$).

Para as comparações entre os *spa* tipos e os nove genes alvos de vacinas observou-se que houve associação entre todos os *spa* tipos e os genes *sdrD* e *sdrE*, com 100% dos isolados do *spa* t6861 apresentando os dois genes. O gene *isdH* também mostrou associação com todos os *spa* tipos, e 100% dos isolados de t605 e t6861 amplificaram o gene (Figura 2) ($p \leq 0,05$). Os resultados das outras comparações não identificaram associações.

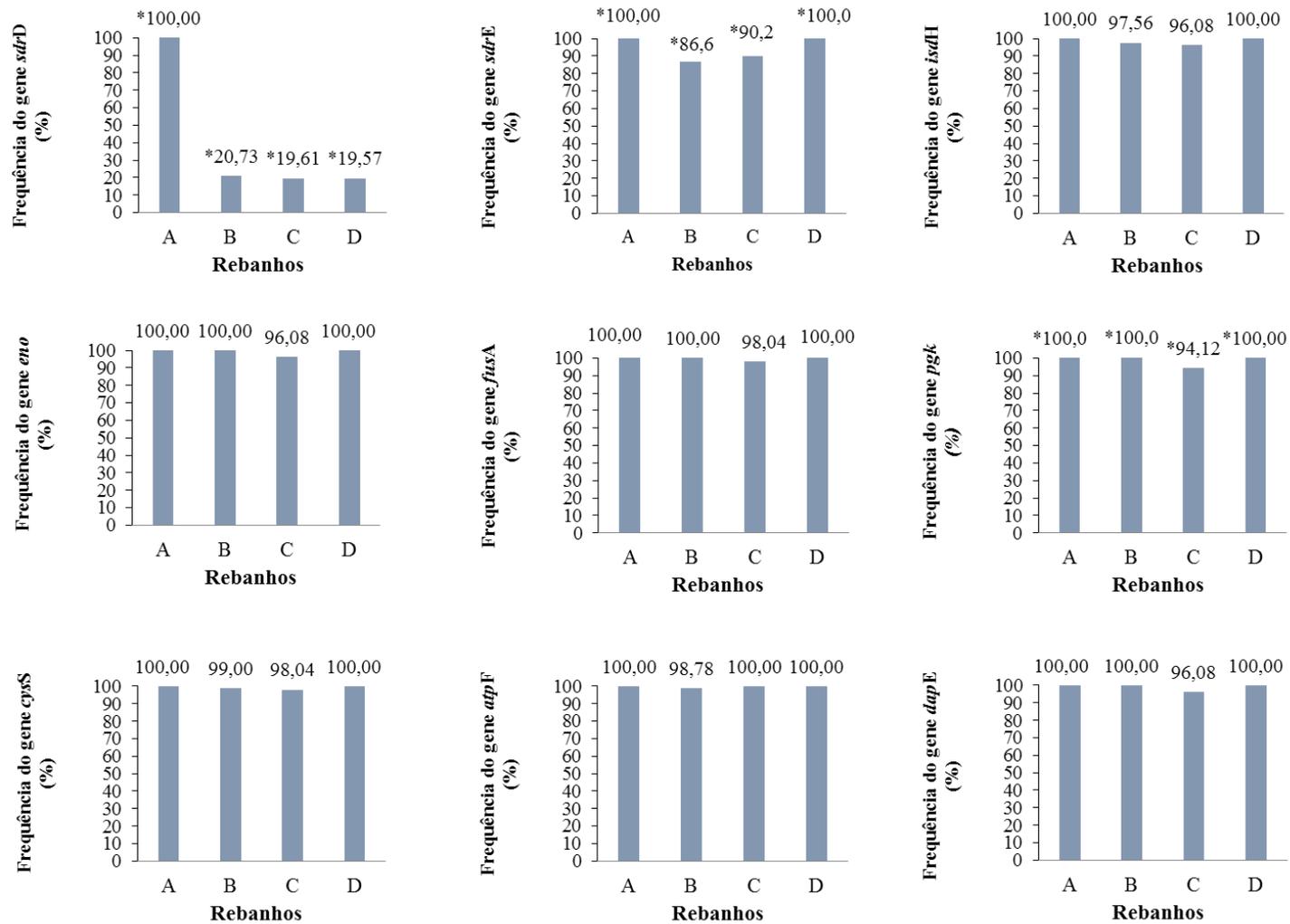


Figura 1. Frequência relativa dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas entre os rebanhos. *indicam associações estatisticamente significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

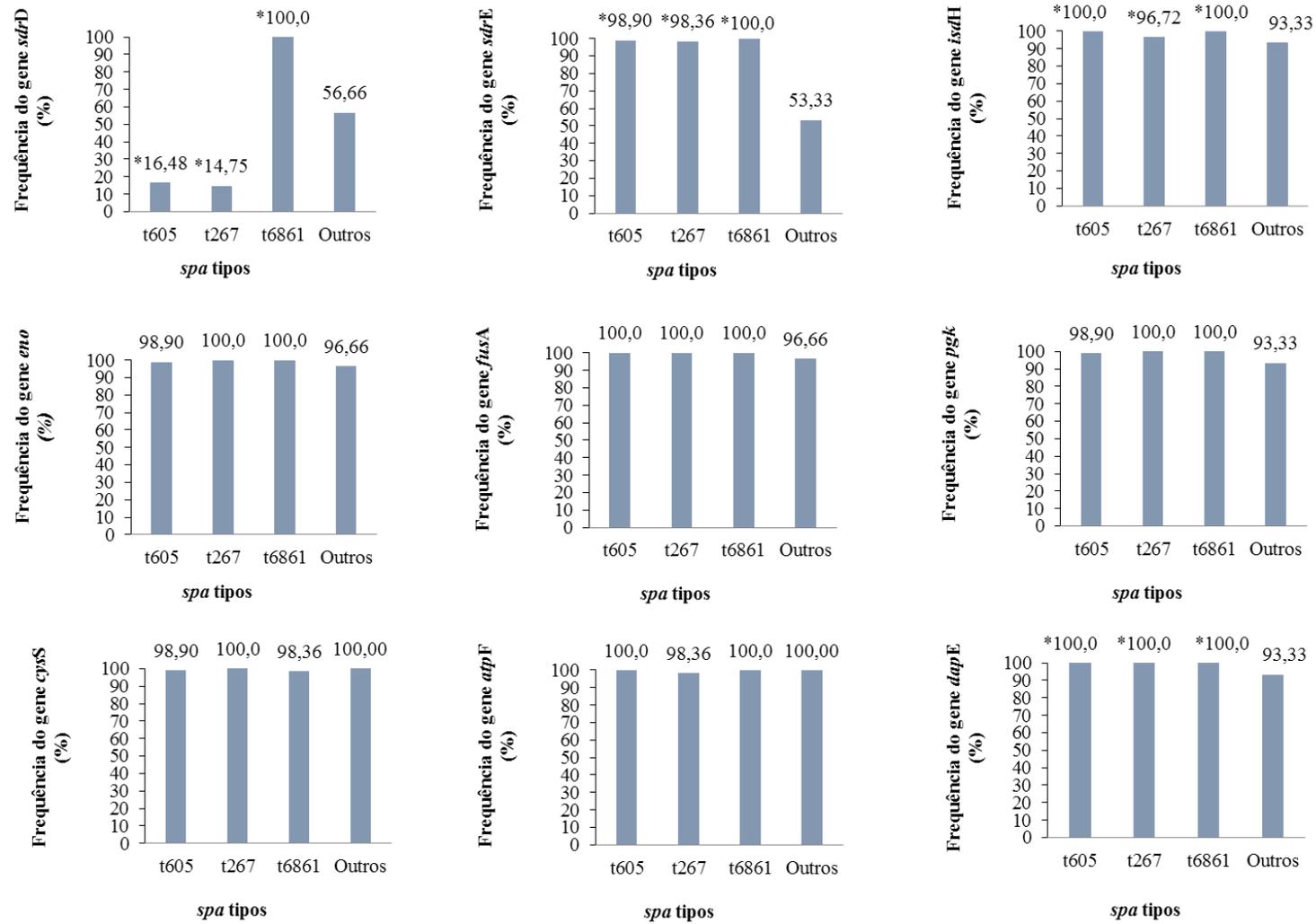


Figura 2. Frequência relativa dos genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas entre os *spa* tipos. *indicam associações estatisticamente significativas ao Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Distribuição da frequência dos genes alvos de vacinas, leucotoxinas e do transportador da lactose nos diferentes rebanhos e *spa* tipos

Rebanhos (n° de isolados)	Genes de virulência (qPCR)											<i>spa</i> tipo (total de isolados)	
	<i>sdrD</i> %	<i>sdrE</i> %	<i>isdH</i> %	<i>eno</i> %	<i>fusA</i> %	<i>pgk</i> %	<i>cysS</i> %	<i>atpF</i> %	<i>dapE</i> %	<i>lukED</i> %	<i>pvl</i> %		<i>lacE</i> %
A (39)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	<i>Unknow</i> (2) t002(3) t6861(34) t1200(1), t306(1) t1236(4), t127(10) t1589(1), t267(61) t359(1), t7433(1)
B (82*)	20,7	86,6	97,6	100	100	100	98,8	98,8	100	82	0	98,8	t098(4) t189(2), t605(45)
C (51)	19,6	90,2	96,1	96,1	98	94	98	100	96,1	90,2	3,9	100**	t605(46)
D (46)	19,6	100	100	100	100	100	100	100	100	95,7	0	100**	Total (216)
Total (218)	34,4	92,7	98,2	99,1	99,5	98,6	99,1	99,5	99,1	90	2	99,7	

Legenda. *Duas amostras do rebanho B foram descartadas no *spa* Typing, pois apresentaram erro no sequenciamento, mas foram utilizadas na qPCR.

** indicam que o cálculo desconsiderou 5 isolados do rebanho C e 1 do rebanho D, pois foram isolados de amostras de *swab* nasal.

3.2 Análise dos genes de leucotoxinas e superantígenos nos rebanhos e *spa* tipos

Na Figura 3 A foi apresentada a frequência absoluta dos genes *lukED* e *pvl* entre os isolados de *S. aureus*, dos quatro rebanhos e nas categorias dos *spa* tipos. O gene *lacE* (Figura 3 B) foi observado em mais de 98% dos rebanhos e *spa* tipos.

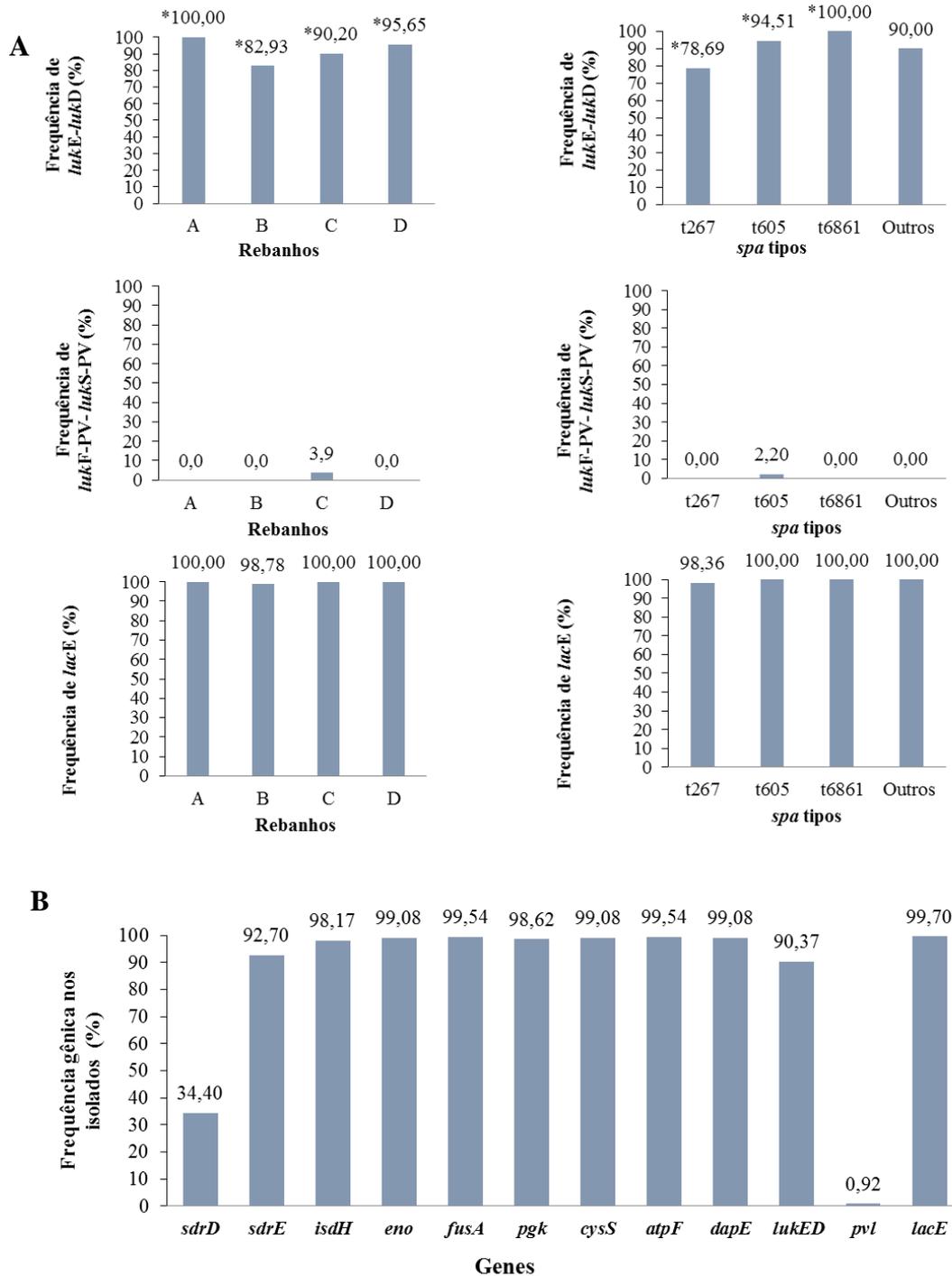


Figura 3. A: Frequência dos genes de leucotoxinas entre os rebanhos, e nas categorias de *spa* tipos. B: Frequência dos isolados distribuídos entre os genes alvos de vacinas, leucotoxinas e do transportador da lactose.

* indica associação estatisticamente significativa no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$).

A amplificação do gene *lukED* foi mais frequente nos rebanhos A (100%) e D (96%), e em relação aos *spa* tipos, o pior desempenho ocorreu nos isolados t267 (79%). o gene *pvl* foi encontrado em 3,9% (2/51) dos isolados no rebanho C, apenas no genótipo t605 (Figura 3 A).

Nenhum dos isolados deste estudo apresentou os genes *sea*, *seb*, *sec* e *tst*, portanto não puderam ser comparados entre os rebanhos e *spa* tipos.

Nas comparações entre os genes de leucotoxinas, rebanho e *spa* tipos (Figura 3 A), houve associação de *lukED* com todos os rebanhos, e no caso do rebanho A, o gene esteve presente em todos os isolados. O mesmo ocorreu na associação de *lukED* com os *spa* tipos, com 100% dos isolados relacionados ao t6861 amplificando o gene. A categoria outros corresponde a 90% dos isolados com *lukED* (Figura 3 A) ($p \leq 0,05$). Os resultados das outras comparações não identificaram associações.

3.3 Análise do gene *lacE* nos rebanhos e *spa* tipos

O gene *lacE* foi avaliado nos isolados das amostras de leite (210), e apresentou amplificação em 99,7% (Tabela 3), com um representante do *spa* tipo t267 (rebanho B), negativo para o gene (Figura 3 A) não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os *spa* tipos e rebanhos.

3.4 Análise das sequências do *spa* Typing

O dendrograma (Figura 4) permitiu uma visualização de todos os agrupamentos, considerando os 216 isolados. Desta forma foi possível a partir da sucessão de repetições realizar inferências sobre como os *spa* tipos se relacionam. O item 3.5.3 (Capítulo 1) apresenta as considerações das relações entre os diferentes *spa* tipos.

O dendrograma (Figura 4) representa todas as variáveis que mostraram associações no teste Exato de Fisher (genes *sdrD*, *sdrE*, *lukDE*, rebanhos e *spa* tipos). A distribuição espacial permitiu a observação do comportamento dos dados de forma conjunta, somado as informações das sucessões de repetição.

As Figuras 5 e 6 representam as caracterizações moleculares de todos os isolados de *S. aureus* de acordo com uma árvore (MST). Na os genes que mostraram associação no Teste Exato de Fisher foram identificados por cores (legenda), em seus *spa* tipos. Desta forma foi possível identificar a presença simultânea dos três genes em todos os isolados de t6861, enquanto o t605 apresentou maior frequência para o *lukED*, e t267 mostrou uma grande variação na distribuição dos três genes (Figura 5). O isolado t1589 (1/216) apresentou apenas o *sdrD*, identificado como de menor frequência entre os isolados (Figura 5). As letras A e B da Figura 6 retratam a distribuição de *sdrD* e *sdrE*, respectivamente, nos *spa* tipos. A cor cinza refere-se à ausência dos genes entre os isolados, apresentados na letra A.

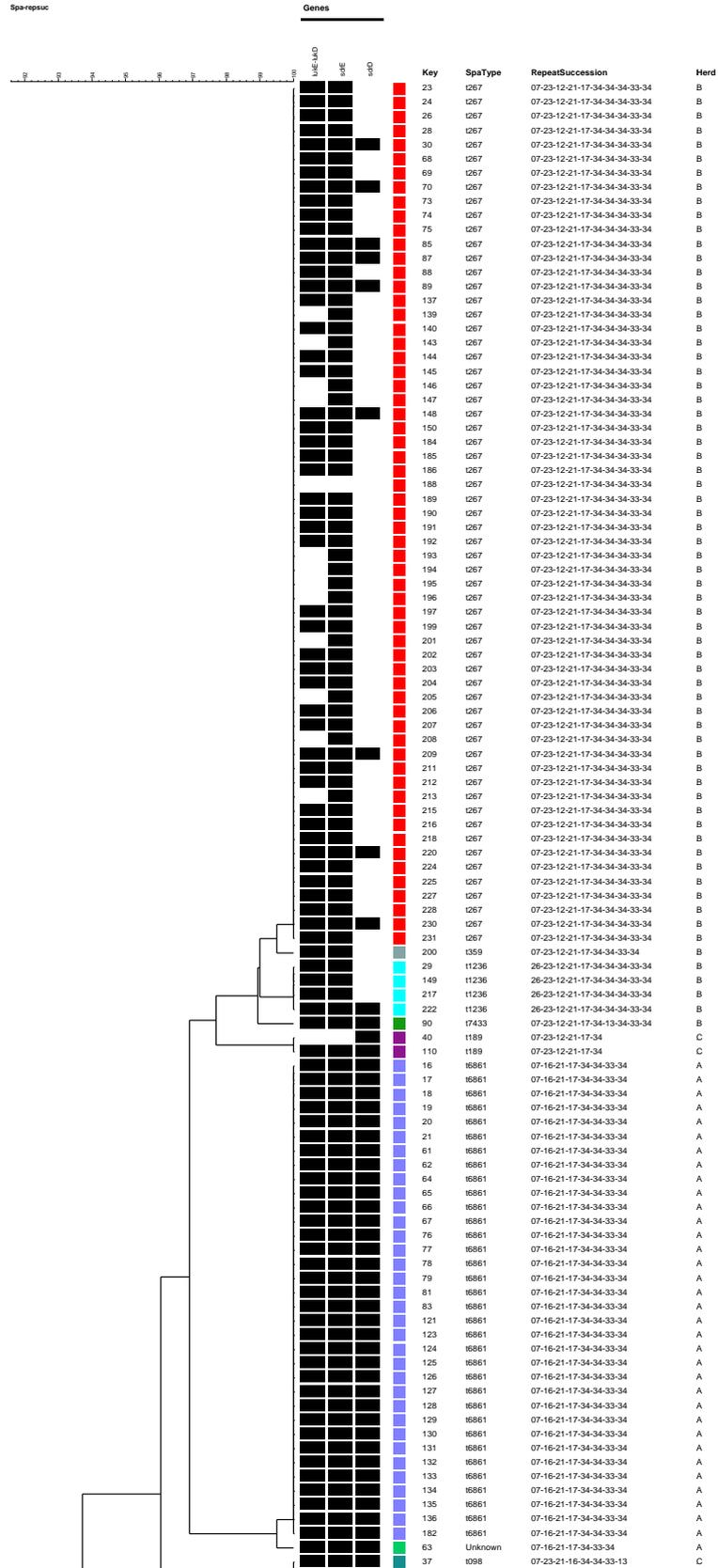


Figura 4. Dendrograma com o agrupamento das variáveis apresentadas no mapa perceptual, pela metodologia UPGMA.

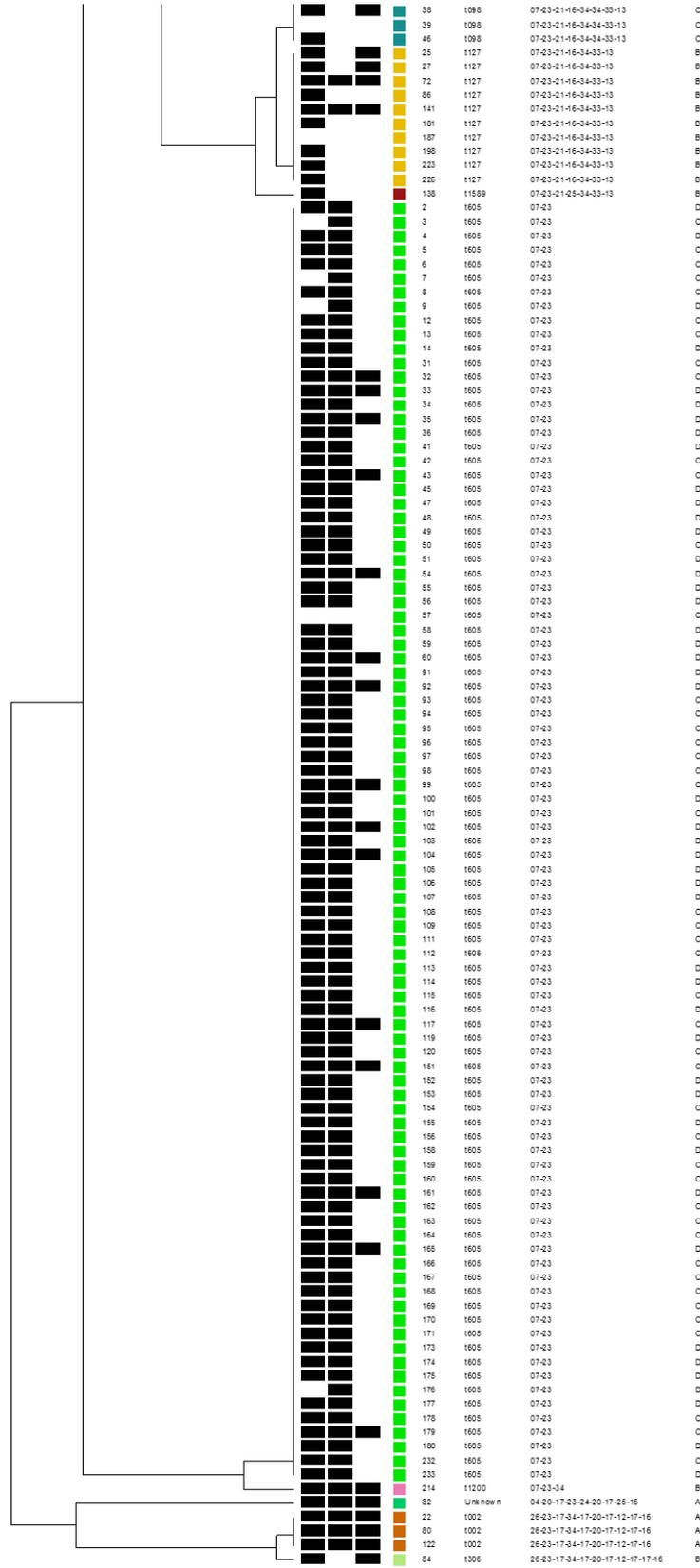


Figura 4. Dendrograma com o agrupamento das variáveis apresentadas no mapa perceptual, pela metodologia UPGMA. (cont...).

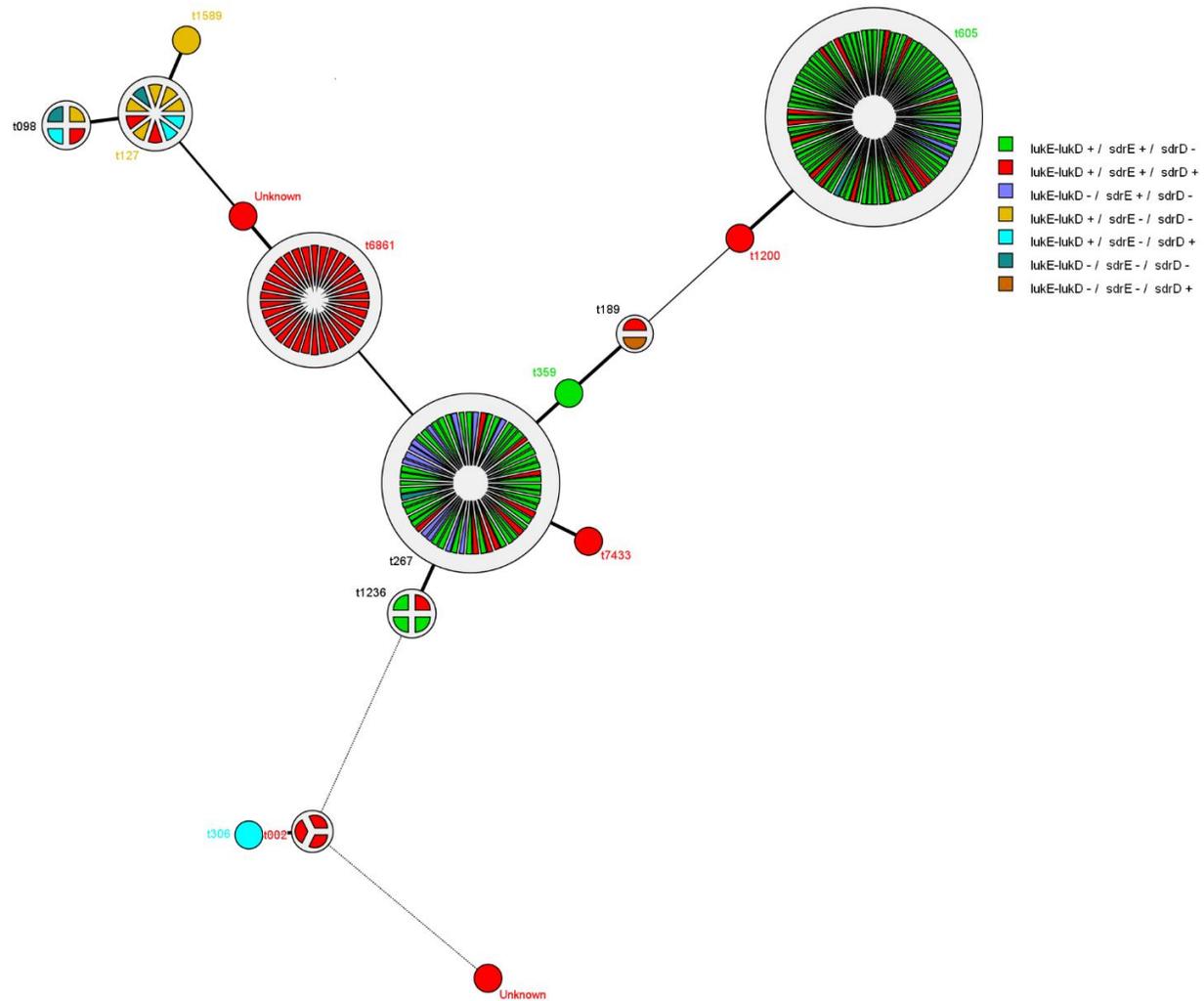


Figura 5. *Minimal spanning tree* (MST) dos 216 isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina distribuídas entre *lukE-lukD*, *sdrD* e *sdrE* nos *spa* tipos.

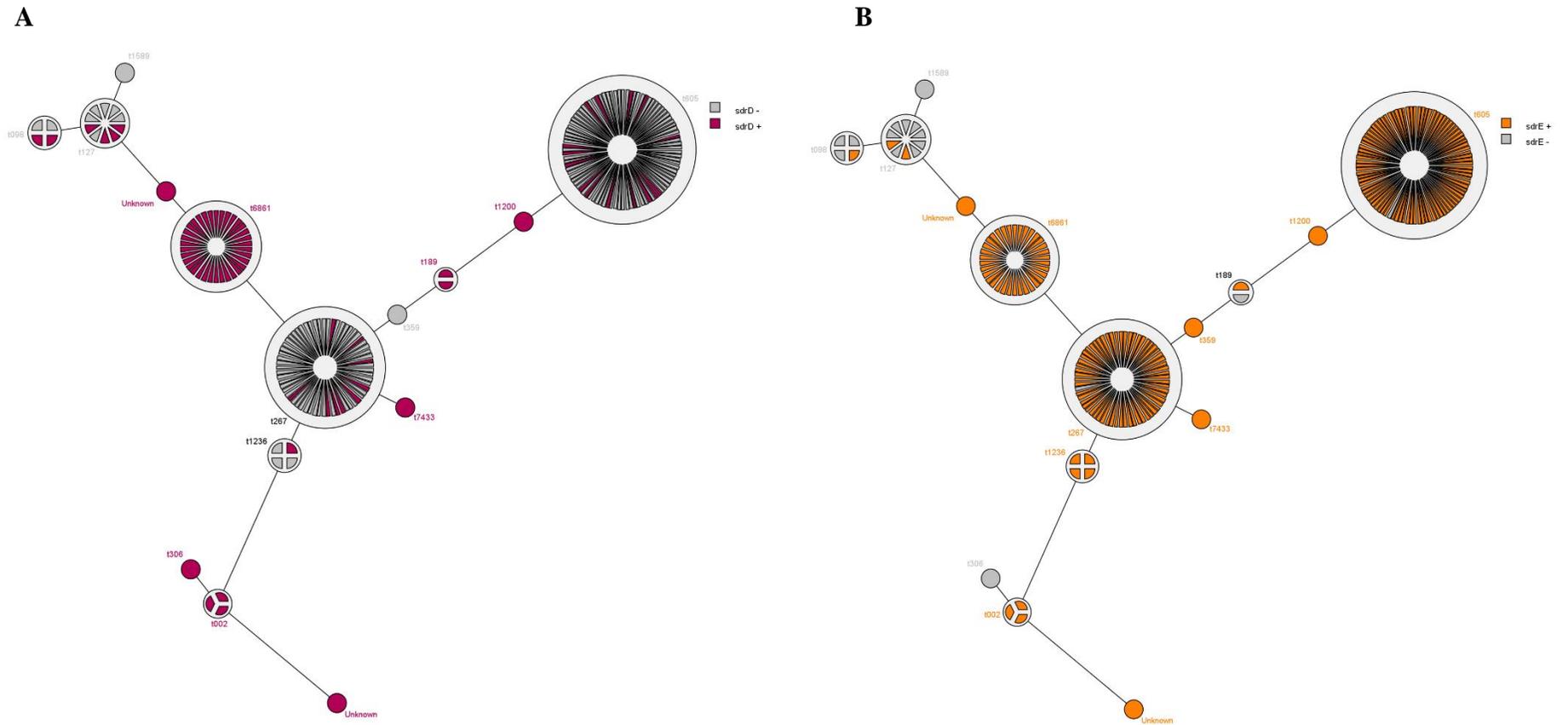


Figura 6. *Minimal spanning tree* (MST) dos 216 isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina. A: Distribuição de *sdrD* entre os *spa* tipos. B: Distribuição de *sdrE* entre os *spa* tipos.

3.5 Análise de correspondência dos resultados

No modelo de análise de correspondência e geração do mapa perceptual foram incluídas as variáveis: presença dos genes *sdrD*, *sdrE* e *lukDE* (presença e ausência), rebanhos (1-A, 2-B, 3-C e 4-D) e *spa* tipos (0-outros, 8-t267,11-t605 e 12-t6861) (Figura 7). Em relação à variabilidade observada, ou inércia, foi obtido o valor de 50,68%, decomposto na 1ª dimensão e responsável pela explicação de 49,09% do modelo, e a 2ª dimensão por 32,10%. Somadas, as dimensões explicam 81,19% do mapa perceptual.

Na letra A da Figura 7, o mapa perceptual representa a distribuição das variáveis dentro das duas dimensões (quatro quadrantes). Em B, os gráficos de posições relativas das observações permitem avaliar a distribuição dos isolados em cada variável. A presença de *lukED* esteve associada aos rebanhos A, C e D, e a ausência a B. O *sdrD* esteve associado ao rebanho A, ao contrário dos outros rebanhos que relacionaram a falta do gene. O rebanho B foi associado aos *sdrE* negativos, e A, C e D aos positivos. O grau de sangue foi incluído no mapa para mostrar sua grande associação aos rebanhos, contudo não alterou a inercia do modelo, pois as duas variáveis representam a mesma informação. Desta forma, o rebanho A está associado aos animais $\frac{1}{2}$ (.5) sangue, o rebanho B aos $\frac{3}{4}$ (.75) e C e D a raça holandesa (1), conforme indicado na letra B (Figura 7) referente ao gráfico de posições relativas da observação grau de sangue. O grau de sangue foi utilizado para mostrar a associação aos rebanhos.

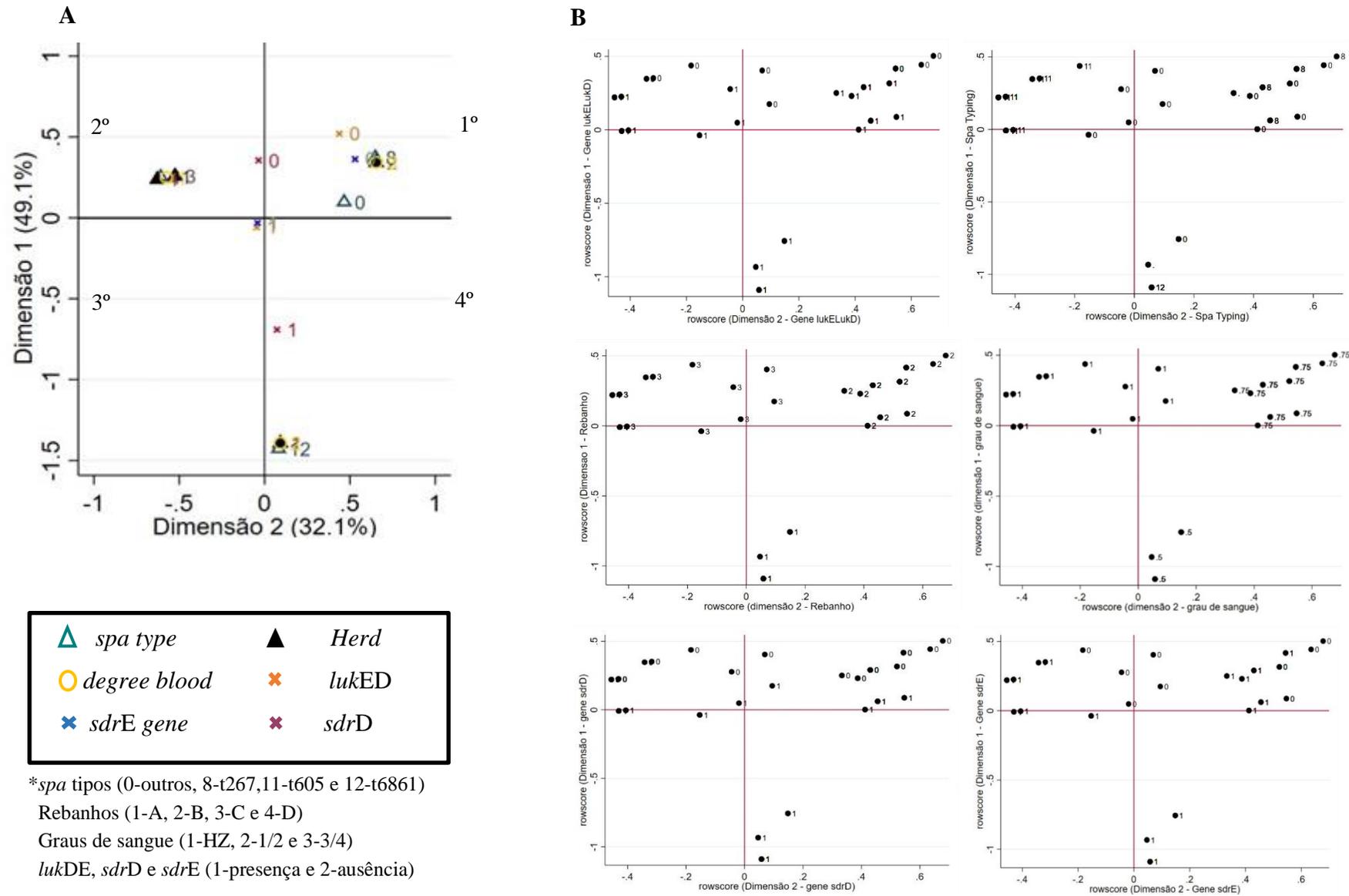


Figura 7. A: Mapa perceptual das variáveis com associação no Teste Exato de Fisher ($p \leq 0,05$), nos 4 quadrantes (1° ao 4°). B: Gráficos das posições relativas dos isolados.

4. DISCUSSÃO

KLEIN et al. (2012) enfatizam a necessidade de caracterizar a distribuição dos isolados de *S. aureus* em todo o mundo, a fim de melhorar a compreensão da patogênese nestas populações. A tipificação vem permitindo o agrupamento de características comuns, e no caso de *S. aureus* os até a junção de dados, como os obtidos pelas metodologias *spa* Typing e MLST.

A característica ubíqua indica o tamanho do desafio, e de fato, *S. aureus* vem causando sérios prejuízos à saúde humana e animal, assim como aos setores econômicos. No caso dos rebanhos leiteiros, o entendimento da variabilidade genética pode indicar novas estratégias específicas para a eliminação e controle dos patógenos causadores da mastite bovina.

Uma estratégia para desenvolvimento de vacinas contra *S. aureus* vem das noções de neutralização dos fatores de virulência do agente. Algumas pesquisas com o patógeno demonstraram que proteínas extracelulares e de superfície possuem grande potencial imunológico quando bovinos, humanos ou murinos são desafiados naturalmente ou experimentalmente (SHKRETA et al., 2004; DRYLA et al., 2005; PEREZ-CASAL et al., 2006; STRANGER-JONES et al., 2006; STER et al., 2010; LEITNER et al., 2011).

Proteínas agindo como fatores de virulência são essenciais para a sobrevivência e multiplicação de *S. aureus* (NAGASAWA et al., 2021), e dependendo do estágio da infecção e das condições fisiológicas dentro do hospedeiro, a expressão destes fatores promovem a ligação às matrizes extracelulares, colonização, invasão e bloqueio da resposta imune do hospedeiro (SHELDON et al., 2012).

As proteínas da família Sdr, como SdrD e SdrE são incluídas no grupo MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), e quando presentes em *S. aureus*, se localizam na superfície da membrana, com a capacidade de ligação ao fibrinogênio (LUZ, 2015). As duas são estruturalmente muito semelhantes à ClfA e ClfB (FOSTER et al., 2014).

Em 258 isolados de *S. aureus* de mastite clínica ovina, 75,9% foram positivos para o gene *sdrE* e nenhum amplificou para o gene *sdrD* (PALARETI et al., 2016). A presença simultânea dos genes *sdrD* e *sdrE* foi observada em isolados MRSA de mastite bovina subclínica, com a frequência de 95,9% e 100%, respectivamente (YANG et al., 2020). Em concordância, o estudo atual identificou elevada frequência do gene *sdrE* (92,6%), enquanto para *sdrD*, apresentou amplificação de 34,4% entre os isolados.

Um estudo, realizado com 212 isolados de mastite bovina em Shanghai e Zhejiang (China), identificou a presença dos *spa* tipos t267 e t359 associados aos complexos clonais CC 97 (ST97) e do *spa* tipo t189 correlacionado ao CC 188 (ST188). Os isolados do CC 97 (ST97/t267/t359) amplificaram 100% dos genes *sdrD* e *sdrE*, enquanto o CC188 (ST188/t189) apresentou 80% para o *sdrE* e nenhum resultado positivo para *sdrD* (LI et al., 2017). Nos resultados do presente estudo dos isolados de t267, foram identificados os genes *sdrD* em 14,5% e *sdrE* em 98,3%, e considerando t359 e t189 foram apenas 2 e 1 isolados, respectivamente, com ampliações variadas.

No leite, como em muitos ambientes *in vivo*, o ferro está presente em uma concentração muito baixa (10^{-18} M) e a maior parte encontra-se ligada às proteínas do hospedeiro, incluindo lactoferrina e transferrina, de modo que a concentração de ferro livre é insuficiente para crescimento de patógenos (ANDREWS et al., 2003). As proteínas da família Isd ligam-se à hemoglobina e extratos realizando o transporte do grupo heme através da parede e membrana celular para o citoplasma, onde o ferro é liberado (FOSTER et al., 2014). O gene *isdH* codificador da proteína IsdH foi analisado em 21 isolados de *S. aureus* obtidos de amostras clínicas humanas dos Estados Unidos, sendo identificado em 95% (REIJER et al., 2013). No presente estudo, o gene apresentou elevada frequência, sendo encontrado em 98,2% dos isolados (Figuras 1 e 2). Para colonizar a glândula mamária, os patógenos devem desenvolver sistemas de aquisição de ferro específicos e as proteínas relacionadas a esta função podem se apresentar como excelentes candidatas à produção de vacinas (STER et al., 2010). De fato, a frequente presença do gene no atual estudo indica que a proteína pode ser produzida, e assim, mantidas as várias funções metabólicas dependentes de ferro. Na literatura não foram observados relatos da presença do gene *isdH* com os *spa* tipos encontrados no atual trabalho.

Neste trabalho, os genes das proteínas enolase, fator de alongamento Ef-G (FAG), fosfogliceratoquinase, cisteinil-tRNA sintetase, a subunidade alfa da F0F1 ATP sintase, succinil diaminopimelato desuccinilase foram identificados em isolados de *S. aureus*, provenientes de amostras de leite bovino, pela primeira vez na literatura. O fato de os genes serem conservados entre os rebanhos sugere que suas proteínas são importantes no metabolismo celular, e, portanto, na sobrevivência de *S. aureus*. A manutenção destes genes em elevada frequência indica que suas proteínas podem ser potenciais alvos de ataques do sistema imune. Deste modo, podem ser consideradas fatores de virulência e sugestivas de utilização na formulação de vacinas que levariam a eliminação do patógeno. Os resultados confirmam o

sugerido por CUNHA et al. (2020), e demonstram o potencial destes alvos como ferramenta de investigação epidemiológica, na definição de possíveis antígenos para as vacinas da mastite bovina causada por *S. aureus*. As seis proteínas estão relacionadas a diferentes funções metabólicas e são importantes para a manutenção das atividades funcionais, como crescimento e multiplicação celular. Portanto, o bloqueio de suas atividades pode levar a eliminação do patógeno e a resultados promissores no controle da mastite bovina causada por este patógeno.

A leucotoxina LukED possui receptores nos linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos e está ligada à formação de poros que causam o rompimento das membranas celulares. A proteína LukED é codificada na ilha de patogenicidade vSaβ e está presente na maioria das cepas de *S. aureus* (MCCARTHY; LINDSAY, 2013). De fato, 90,38% dos isolados deste trabalho amplificaram o gene. Algumas cepas da linhagem de ruminantes, CC133 codificam um códon de parada prematura, e codificam apenas Luke, mas impedem a formação de LukED (GUINANE et al., 2010). No Brasil o *spa* tipo t10856 associado ao CC133 (ST133) foi identificado em fazendas do Estado de São Paulo (SILVA et al., 2013; ROSSI et al., 2019). O gene *lukED* foi descrito como parte do cromossomo, em 99% dos isolados de *S. aureus* de origem humana, enquanto o gene *pvl* localizado em profagos apresenta baixa frequência, com 2% do total (SPAAN et al., 2013). No entanto, NAIMI et al. (2003) identificaram na maioria dos isolados CA-MRSA a presença dos genes que codificam PVL (NAIMI et al., 2003). No atual estudo, houve equivalência quanto à baixa frequência dos isolados positivos para *pvl*, mas a ocorrência foi associada ao fenótipo susceptível para a oxacilina.

Para investigação da prevalência e caracterização molecular de fatores de virulência em *S. aureus*, foram coletadas 640 amostras de animais e pacientes saudáveis na província de Henan (China), de 2013 a 2014. Entre os genes avaliados, *lukED* apresentou maior prevalência (57,34%) e o *spa* tipo t189 foi o segundo mais encontrado (12,59%). Entretanto, poucos isolados amplificaram *pvl* (5,59%) e *tst* (2,80%) (LIU et al., 2018). No presente estudo com isolados de mastite bovina, a frequência elevada de *lukED* e reduzida em *pvl* foram semelhantes, enquanto os achados relacionados a *tst* e t189 não mostraram concordância.

Neste estudo, não foi avaliada a presença do gene *lukM*. No entanto, para a formação do bi-componente *lukM/lukF-PV* é necessário um segundo gene, o *lukF-PV* que foi identificado em dois isolados. O *lukM/lukF-PV* tem sido associado à transmissão horizontal por bacteriófagos latentes de origem bovina (SAB0782 e SAB0783) (YAMADA et al., 2005; ZOU et al., 2000). Em investigações anteriores, a proteína LukM/LukF-PV foi várias vezes mais

potente contra leucócitos bovinos, do que qualquer outra leucotoxina estafilocócica, incluindo a PVL, altamente ativa contra leucócitos humanos (BARRIO et al., 2006; RAINARD et al., 2003).

ROSSI et al. (2019) recuperaram ao longo de 12 meses, 116 cepas de *S. aureus* de 68 vacas com mastite subclínica. Nos resultados foram identificados os genes *sea* e *see*, em 24,1% dos isolados, sendo os genes *pvl* e *tst* presentes em 3,4% e 46,6% dos isolados, respectivamente, e nenhuma associação com o t605 (ST126, CC 126). De acordo com os resultados do atual estudo houve concordância apenas na identificação e frequência do gene *pvl*, pois os dois isolados apresentaram genótipo t605 e não foram detectados genes relacionados a superantígenos. Um estudo epidemiológico com 79 isolados de *S. aureus* coletados de vacas, cabras, ovelhas e búfalas com mastite também não identificou o gene *pvl* (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) e a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) são toxinas superantigênicas (SAG), estruturalmente relacionadas, que partilham vários graus de homologia na sequência de seus aminoácidos (PINTO, 2014). Os genes *se* (*staphylococcal enterotoxins*) e *tst* são encontrados principalmente, em uma variedade de elementos genéticos móveis, e podem diferir quanto a presença entre os isolados de *S. aureus*. A toxicidade biológica dos SAG de estafilococos torna-os contribuintes críticos, pois causam infecções potencialmente fatais, devido a resistência ao calor, ácidos, proteólise e dessecação (SPAULDING et al., 2013).

A TSST-1 (antiga SEF) pode estar presente simultaneamente, com outras enterotoxinas, principalmente, as dos tipos SEB e SEC (SCHMITZ et al., 1998). No entanto, não foram encontradas associações devido à ausência do gene *tst* nos isolados avaliados deste trabalho.

FERENS et al., (1998) demonstraram que SEC afeta a resposta imune bovina e pode contribuir para a persistência da mastite na glândula mamária. O gene possui variantes antigênicas, *sec1*, *sec2*, *sec3*, *sec* bovina e *sec* ovina.

Um cenário da distribuição de alguns superantígenos de *S. aureus* foi realizado nas regiões de Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco. A região de Minas Gerais apresentou os genes *sea*, *seb*, *sec* e *tst*, contraponto os resultados deste estudo que mostrou não haver amplificação nos isolados (ALBUQUERQUE, 2014).

Em relação aos resultados da avaliação dos genes *sea*, *seb*, *sec1* (enterotoxinas clássicas) e *tst* (enterotoxina-like), não foram identificadas amplificações nas reações de PCR em tempo real. De forma semelhante, outros estudos com *S. aureus* em isolados de mastite bovina também não

detectaram os genes *sea* e *seb* (SILVA et al., 2005), *seb* e *sec* (KHORAMROOZ et al., 2016), os genes das enterotoxinas clássicas (FREITAS et al., 2008) e VÁZQUEZ et al. (2011) também não identificaram em 27 isolados, os genes que codificam as enterotoxinas SEA, SEB, SEC e TSST-1, corroborando com os achados deste trabalho. HATA et al. (2008) ao avaliarem 391 isolados, tiveram resultados negativos para *sea*, em 99,5% das ampliações. Entretanto, essa enterotoxina clássica vem sendo encontrada em aproximadamente 80% das intoxicações alimentares (PINCHUK et al., 2010; HENNEKINNE et al., 2012; FISHER et al., 2018). O teste para o gene da enterotoxinas TSST-1 (*tst*) foi realizado em 90 cepas de *S. aureus* com amplificação de 42,2% (CHAPAVAL et al., 2006).

Em mais de 170 isolados de *S. aureus*, MITRA et al. (2013) identificaram que os *spa* tipos, *t002*, *t1200* e *t6861* estavam relacionados à ausência dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *tst*. De forma contrária, os resultados do presente trabalho não identificaram qualquer associação entre a presença dos genes de superantígenos e os *spa* tipos.

A complexidade da regulação da virulência de *S. aureus* decorre do grande número de reguladores globais envolvidos no processo (NOVICK, 2003; BRONNER et al., 2004; CHEUNG et al., 2004) e a expressão do gene *sea* tem sido descrita na literatura como independente de *agr* (LE LOIR et al., 2003), considerado um dos mais importantes reguladores do patógeno. Nos resultados deste atual trabalho, a ausência de *sea* não permitiu as comparações com o gene *agr*. O estudo do gene *agr* está descrito no capítulo 1.

A distribuição mundial das cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas mostrou-se bastante variada (VÁZQUEZ et al., 2011), e o leite cru contaminado na fazenda pode levar a problemas subsequentes, como as intoxicações alimentares.

As cepas mais prevalentes podem expressar certos genes de maneira diferenciada, de forma a melhorar a capacidade de superação frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, e assim colonizar com sucesso, o tecido mamário (SHARER et al., 2010). A hipótese anterior mencionada pelos autores foi confirmada neste estudo atual que identificou um mesmo *spa* tipo amplificando diferentes genes de virulência como os ligados a leucotoxinas.

A multiplicação celular de *S. aureus* é em grande parte devido à disponibilidade de carboidratos simples, como glicose e lactose, sugerindo, desta forma, uma associação entre a expressão de EII e a mastite, pelo fato da enzima afetar o crescimento de *S. aureus* em ambiente rico em lactose, como o leite (SHARER et al., 2010). O aumento da taxa de crescimento vem sendo

descrito como um dos muitos fatores que contribuem para a virulência de *S. aureus* na mastite (ODIERNO et al., 1994). Os achados deste atual estudo confirmam a importância do gene *lacE* representado pela alta frequência (99,7%) de amplificação entre os isolados de mastite bovina.

As associações significativamente estatísticas representadas pelo mapa perceptual indicam possíveis alvos vacinais, assim como indicam que a presença de *lukED* nos rebanhos, pode ser um importante fator de virulência a se monitorar nos rebanhos.

5. CONCLUSÕES

De forma inédita os genes *eno*, *fusA*, *pgk*, *cysS*, *atpF* e *dapE* foram identificados e, sugere-se que seus fragmentos amplificados são conservados nos rebanhos, sendo, portanto, importantes alvos para o desenvolvimento de uma vacina para a mastite causada por *S. aureus*.

A elevada frequência de *sdrE* e *isdH* também demonstrou a aplicabilidade destes genes aos inquéritos epidemiológicos que buscam identificar alvos conservados do DNA de *S. aureus*.

Entre as proteínas indicadas como possíveis alvos vacinais, o gene codificador da *serine-aspartate repeat protein D* mostrou o pior desempenho entre os rebanhos B, C e D. No entanto, o gene *sdrD* pode ser adequado para inquéritos epidemiológicos com o *spa* tipo t6861 e rebanhos ½ sangue, e assim, ser importante como alvo de desenvolvimento de vacinas, ou em estudos que buscam um marcador molecular que avalia as diferenças entre os genes.

O *spa* tipo t6861 não foi descrito anteriormente no Brasil, sendo observado em um único trabalho na Índia (2013), fato que sugere uma possível chegada e manutenção da cepa em rebanhos brasileiros.

O gene *lukDE* pode ser considerado um marcador molecular de novos estudos epidemiológicos, visto que sua elevada amplificação apresentou associação estatisticamente significativa com os rebanhos e *spa* tipo.

O gene *pvl* representa um gene de origem humana, e mesmo em baixa frequência indica um sinal de alerta para a transmissão interespecie e preocupa pelo potencial dano, quando os bi-componentes formam o gene *lukM-lukF-PV*.

A ausência dos genes *sea*, *seb*, *sec1* e *tst* não descarta a presença de outros genes codificadores de toxinas, mas confirma a ausência destes quatro importantes superantígenos.

A presença de *lacE* na maioria dos isolados indica que o gene pode ser, assim como os listados anteriormente, um candidato nas avaliações epidemiológicas que buscam alvos vacinais conservados.

A robustez e praticidade da técnica *spa* Typing na identificação de diferentes cepas de *S. aureus* permitem que a ferramenta de tipagem seja indicada para futuros estudos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Development of penicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. **Microbial Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 247–256, 1998.
- ABREU, J. A. P. DE. **Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 89. 2016.
- ACOSTA, A. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Pernambuco State, Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 4, p. 1037–1041, 2013.
- AIRES-DE-SOUSA, M. et al. High Interlaboratory Reproducibility of DNA Sequence-Based Typing of Bacteria in a Multicenter Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 619–621, 2006.
- AIRES-DE-SOUSA, M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3845–3849, 2007.
- AJAYI, C. et al. Genetic variability in the *sdrD* gene in *Staphylococcus aureus* from healthy nasal carriers. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.
- AKKOU, M. et al. New host shift from human to cows within *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis and nasal carriage of animal's caretakers. **Veterinary Microbiology**, v. 223, n. August, p. 173–180, 2018.
- ALBUQUERQUE, M. S. **Pesquisa de genes toxigênicos em isolados de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de vacas na microrregião Garanhuns, Estado de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns. p. 57. 2014.
- ALJASIR, S. F.; D'AMICO, D. J. The effect of protective cultures on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production. **Food Microbiology**, v. 91, n. April, p. 103541, 2020.
- ALVES, M. DE F. N. F. et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 2175–2179, 2020.
- ANDERSON, K. L. et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 4921–4930, 2012.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 215–237, 2003.
- ARTURSSON, K. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. **Veterinary Microbiology**, v. 193, p. 156–161, 2016.
- ASADOLLAHI, P. et al. Distribution of the most prevalent *spa* types among clinical isolates of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* around the world: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–16, 2018.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183–193, 2011.

- BARDIAU, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 181–186, 2013.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877–1895, 2006.
- BARRIO, M. B.; RAINARD, P.; PRÉVOST, G. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2068–2074, 2006.
- BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. [s.l.: s.n.].
- BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 449–455, 2011.
- BONSAGLIA, E. C. R. et al. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, n. August, p. 130–135, 2018.
- BOSS, R. et al. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 515–528, 2016.
- BOSWIHI, S. S.; UDO, E. E.; ALFOUZAN, W. Antibiotic resistance and typing of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Kuwait hospitals, 2016–2017. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.
- BRODERICK, D. et al. Epidemiological typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* recovered from patients attending a maternity hospital in Ireland 2014–2019. **Infection Prevention in Practice**, v. 3, n. 1, p. 100124, 2021.
- BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: Complexity and applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 183–200, 2004.
- BROUILLETTE, E.; TALBOT, B. G.; CEVDM, M. The Fibronectin-Binding Proteins of *Staphylococcus aureus* May Promote Mammary Gland Colonization in a Lactating Mouse Model of Mastitis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2292–2295, 2003.
- CALDAS, T.; LAALAMI, S.; RICCHARME, G. Chaperone Properties of Bacterial Elongation Factor EF-G and Initiation Factor IF2*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 855–860, 2000.
- CASTRO, R. D. **Fatores de patogenicidade, perfil de resistência a antimicrobianos e diversidade clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru, soro-fermento, manipuladores e queijo minas artesanal da região de Campos das Vertentes, Brasil**. Tese (Doutorado pelo Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 127. 2019.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, 2009.
- CHAPAVAL, L. et al. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (tst) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 165–169, 2006.
- CHEN, F. J. et al. mecA-positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1679–1683, 2012.
- CHEUNG, A. L. et al. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 40, p. 1–9, 2004.

- COELHO, S. M. O. et al. Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3305–3310, 2011.
- COSTA, G. M. DA et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 297–302, 2013.
- COSTA, F. N. et al. Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 5, p. 1089–1097, 2018.
- COSTA, G. M. et al. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 733–735, 2012.
- CÔTÉ-GRAVEL, J.; MALOUIN, F. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4727–4740, 2018.
- CUCARELLA, C. et al. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2177–2185, 2004.
- CUNHA, A. F. **Proteínas antigênicas de *Staphylococcus aureus* com potencial para produção de vacinas contra mastite bovina**. Tese (Doutorado pelo Departamento de Medicina Preventiva). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 79. 2015.
- CUNHA, A. F. et al. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy and infected dairy cows with a distinct mastitis history and vaccinated with a polyvalent mastitis vaccine. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4588–4605, 2020.
- CUNHA, M. DE L. R. DE S. DA. Methods for the Identification, Characterization, and Tracking the Spread of *Staphylococcus aureus*. In: ***Staphylococcus aureus***. Botucatu: Elsevier Inc., 2017. p. 105–125.
- DA SILVA, E. R.; DO CARMO, L. S.; DA SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1–2, p. 103–107, 2005.
- DE VliegHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025–1040, 2012.
- DEVRIESE, L. A.; VAN DAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (Cloxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains Isolated from Bovine Mastitis Cases. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 19, n. 7, p. 598–605, 1972.
- DIAS-SOUZA, M. V et al. Evaluation of Antimicrobial and Anti-biofilm activities of Anacardium occidentale stem bark extract. **Journal of Natural Products**, v. 6, p. 198–205, 2013.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, A. G. et al. Aspectos estructurales y funcionales de la N-Succinil-L, L-diaminopimelato desuccinilasa, una enzima clave para el crecimiento bacteriano y un blanco para el control antimicrobiano Structural and Functional Features of a N-Succinyl-L, L-diaminopimelate de. **TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, v. 22, p. 1–16, 2019.
- DIVERS, T.; PEEK, S. **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle**. 2nd Edition [s.l.] 24th October 2007, 2008.
- DRYLA, A. et al. Comparison of Antibody Repertoires against *Staphylococcus aureus* in Healthy Individuals and in Acutely Infected Patients. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 3, p. 387–398, 2005.
- EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário Leite 2020**. Juiz de Fora: [s.n.]. Anuário Leite, 2020.
- EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário Leite 2021**. Juiz de Fora: [s.n.]. Anuário Leite, 2020.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2017**. Trends from 2010 to 2017. Amsterdam, The Netherlands: [s.n.].

EVENSON, M. L. et al. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 311–316, 1988.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary *primers* to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 39, n. 4, p. 729–735, 1995.

FERENS, W. A. et al. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 573–580, 1998.

FESSLER, A. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 619–625, 2010.

FEY, P. D.; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 917–933, 2010.

FISHER, E. L.; OTTO, M.; CHEUNG, G. Y. C. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–18, 2018.

FITZGERALD, J. R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: Origin, evolution and public health threat. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 192–198, 2012.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus* HHS Public Access. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 2014.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A. **Molecular Medical Microbiology**. 2^{ed}. [s.l.: s.n.].

FOURNIER, C. et al. Bovine *Staphylococcus aureus* : Association of virulence genes , genotypes and clinical outcome. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 439–448, 2008.

FOX, L. K.; ZADOKS, R. N.; GASKINS, C. T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 3–4, p. 295–299, 2005.

FRANCKLYN, C. S.; MINAJIGI, A. tRNA as an active chemical scaffold for diverse chemical transformations. **FEBS Letters**, v. 584, n. 2, p. 366–375, 2010.

FREITAS, M. F. L. DE et al. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 617–621, 2008.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595–603, 2011.

GONG, R. et al. Evaluation of clumping factor a binding region a in a subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 11, p. 1746–1752, 2010.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1367–1378, 2002.

GOUDARZI, M. et al. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the toxic shock syndrome toxin gene: high prevalence of clonal complex 22 strains and the emergence of new spa types t223 and t605 in Iran. **New Microbes and New Infections**, v. 36, p. 100695, 2020.

GRABER, H. U. et al. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1442–1451, 2009.

GRACE, D.; FETSCH, A. ***Staphylococcus aureus* - A foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview**. Chapter 1 ed. Berlin, Germany: Elsevier Inc., 2018.

- HARMSSEN, D. et al. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. **Society**, v. 41, n. 12, p. 5442–5448, 2003.
- HATA, E. et al. Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from humans and bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 564–569, 2008.
- HATA, E. et al. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2130–2139, 2010.
- HAUBERT, L. et al. First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfcG* and transposon family Tn916-1545. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. October, p. 242–247, 2017.
- HAVERI, M. et al. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1–2, p. 97–102, 2005.
- HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815–836, 2012.
- HOLTFRETER, S. et al. Clonal Distribution of Superantigen Genes in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates †. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 45, n. 8, p. 2669–2680, 2007.
- HOLTFRETER, S.; KOLATA, J.; BROKER, B. M. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* – The anti-*S. aureus* antibody response. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 176–192, 2010.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2019**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/pesquisa/18/16459>> Acesso em 20 de outubro de 2020.
- ISO. **ISO 13366-2/International Dairy Federation (IDF) 148-2 – Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters**. Brussels, Belgium, 2006.
- ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: Genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 1, p. 41–52, 2003.
- JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 2016.
- JANSEN, K. U. et al. Vaccine review: “*Staphylococcus aureus* vaccines: Problems and prospects”. **Vaccine**, p. 1–8, 2013.
- JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 163–173, 2004.
- JOO, H. S.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 12, p. 1503–1513, 2012.
- KANEKO, J. et al. Pantón–valentíne leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-Treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 11, p. 1960–1962, 1997.

- KÄPPELI, N. et al. *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**, v. 102, p. 3274–3281, 2019.
- KHORAMROOZ, S. S. et al. Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 45–51, 2016.
- KLAAS, I. C.; ZADOKS, R. N. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. April 2017, p. 166–185, 2018.
- KLEIN, R. C. et al. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1–2, p. 183–188, 2012.
- KLOTZ, M. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4683–4687, 2003.
- KURODA, M. et al. Whole genome sequencing of MRSA. **Lancet**, v. 357, p. 1225–1240, 2001.
- LADEIRA, C. V. G. **Perfil genotípico de *Staphylococcus aureus* e variáveis zootécnicas e climáticas associadas à mastite em vacas mestiças**. Tese (Doutorado pelo Departamento de Tecnologia e Inspeção). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 63. 2017.
- LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 127–141, 1999.
- LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 99–107, 2006.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2003.
- LE ROUX, B.; ROUANET, H. **Geometric Data Analysis: From Correspondence Analysis to Structured Data Analysis**. Dordrecht: [s.n.].
- LEITNER, G. et al. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, n. 1–2, p. 25–35, 2011.
- LI, T. et al. Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. April, p. 1–10, 2017.
- LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. G. *Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 378–385, 2004.
- LIU, B. et al. Prevalence, resistance pattern, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy animals and sick populations in Henan Province, China. **Gut Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2018.
- LOCATELLI, C. et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 608–619, 2017.
- LU, J. et al. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 127, p. 1–9, 2018.
- LUNDBERG, Å. et al. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 2, 2014.
- LUZ, A. C. DE O. **Perfil de Virulência de Isolados Clínicos de *Staphylococcus aureus* Relacionados a Diferentes Clones Epidêmicos**. Dissertação (Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 104. 2015.

- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug resistant, extensively drug resistant and pandrug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MAGRO, G. et al. Virulence genes of *S. aureus* from dairy cow mastitis and contagiousness risk. **Toxins**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2017.
- MARQUES, V. F. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 161–170, 2013.
- MARQUES, V. F. et al. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 118–124, 2017.
- MARSHALL, S. A. et al. Proposed MIC Quality Control Guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards Susceptibility Tests Using Seven Veterinary Antimicrobial Agents: Ceftiofur, Premafloxacin, and Spectinomycin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 2027–2029, 1996.
- MARTINS, T. et al. Intramammary treatment with gentamicin in lactating cows with clinical and subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 283–289, 2016.
- MATOS, J. S. et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* from Sites Other than the Lactating Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, 1991.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032–1035, 2000.
- MEKONNEN, S. A. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows in small holder farms of North-Western Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2018.
- MELCHIOR, M. B. et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1–2, p. 83–89, 2009.
- MINGOTE, S. A. **Análise de dados através de Estatística Multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte; Editora UFMG, 2005.
- MISTRY, H. et al. Prevalence and characterization of oxacillin susceptible mecA-Positive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in India. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–10, 2016.
- MITRA, S. D. et al. *Staphylococcus aureus* spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 6, p. 1604–1615, 2013.
- MOLINERI, A. I. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 188, n. January, 2021.
- MONCKE, S. et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.
- MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* Biofilm: A Complex Developmental Organism Graphical Abstract HHS Public Access. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365–376, 2017.
- NAGAEV, I. et al. Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 433–439, 2001.

- NAGASAWA, Y. et al. Intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus* increases IgA antibodies to iron-regulated surface determinant-A, -B, and -H in bovine milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 235, n. August 2020, p. 110235, 2021.
- NAIMI, T. S. et al. Comparison of Community- and Health Care - Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Journal of the American Medical Association**, v. 290, n. 22, p. 2976–2984, 2003.
- NEDBALCOVA, K.; NECHVATALOVÁ, K.; KUČEROVÁ, Z. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and mutant prevention concentration (MPC) of selected antimicrobials in bovine and swine *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* isolates. **Acta Veterinaria Brno**, v. 84, n. 2, p. 83–89, 2015.
- NG, J. W. S. et al. Phylogenetically distinct *Staphylococcus aureus* lineage prevalent among indigenous communities in northern Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2295–2300, 2009.
- NONNEMANN, B. et al. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2515–2524, 2019.
- NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1429–1449, 2003.
- NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum Sensing in Staphylococci. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 541–564, 2008.
- O'HARA, F. P. et al. *spa* Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable Performance in a Macroepidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States . **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 1, p. 88–96, 2015.
- ODIERNO, L. et al. Pathogenicity in mice of *Staphylococcus aureus* mutants deficient in exoprotein synthesis. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 249–258, 1994.
- OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450–460, 2006.
- OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207–228, 2008.
- OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 1–26, 2018.
- PAIANO, M.; BEDENDO, J. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from healthy newborns. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 11, n. 4, p. 841–846, 2009.
- PALARETI, G. et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.
- PARISI, A. et al. MRSA in swine, farmers and abattoir workers in Southern Italy. **Food Microbiology**, v. 82, n. June 2018, p. 287–293, 2019.
- PEDROSO, S. H. S. P. et al. Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 312–318, 2016.
- PEREIRA, U. P. et al. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 2–4, p. 117–124, 2011.
- PEREZ-CASAL, J. et al. Immune responses to a *Staphylococcus aureus* GapC/B chimera and its potential use as a component of a vaccine for *S. aureus* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 85–97, 2006.

- PÉREZ, V. K. C. **Detection of virulence and antimicrobial resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil.** Dissertação (Mestrado pelo Departamento de Ciências Veterinária). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2019.
- PICCININI, R.; BORROMEO, V.; ZECCONI, A. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 1–2, p. 100–105, 2010.
- PICHETTE-JOLETTE, S. et al. Partial prediction of the duration and the clinical status of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infections based on the phenotypic and genotypic analysis of isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 228, n. October 2018, p. 188–195, 2019.
- PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2177–2197, 2010.
- PINTO, J. B. **Expressão e caracterização do polimorfismo genético do sistema quórum sensing agr; suscetibilidade aos antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos e alimentares de *Staphylococcus aureus*.** Dissertação (Mestrado pelo Departamento de Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 137. 2014.
- PROCTOR, R. A. Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? **Vaccine**, v. 30, n. 19, p. 2921–2927, 2012.
- QUECK, S. Y. et al. RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Cell**, v. 10, n. 32, p. 150–158f., 2008.
- RABELLO, R. F. et al. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 1505–1511, 2007.
- RABELLO, R. F. et al. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals**, v. 10, p. 552, 2020.
- RAINARD, P. et al. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 272–277, 2003.
- REEVE, S. M. et al. MRSA Isolates from United States Hospitals Carry dfrG and dfrK Resistance Genes and Succumb to Propargyl-Linked Antifolates. **Cell Chemical Biology**, v. 23, p. 1458–146, 2016.
- REIJER, P. M. et al. Characterization of the Humoral Immune Response during *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Global Gene Expression by *Staphylococcus aureus* in Human Blood. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- RICHARDSON, E. J. et al. Gene exchange drives the ecological success of a multi-host bacterial pathogen. **Nature Ecology and Evolution**, v. 2, n. 9, p. 1468–1478, 2018.
- ROSA, D. L. S. O. **Imunogenicidade de proteínas recombinantes de *Staphylococcus aureus* associadas ou não ao Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF).** Tese (Doutorado pelo Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem animal. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 87. 2016.
- ROSSI, B. F. et al. Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, n. November 2018, p. 45–50, 2019.
- RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.
- SAINI, V. et al. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1921–1929, 2012.

- SAKWINSKA, O. et al. *Staphylococcus aureus* Host Range and Human-Bovine Host Shift. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5908–5915, 2011.
- SALAUDDIN, M. et al. Molecular Detection of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis Milk in Bangladesh. **Veterinary Science**, v. 7, p. 36, 2020.
- SANTOS, A. L. DOS et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.
- SANTOS, R. P. **Identificação por diferentes métodos e caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados da glândula mamária e de fossas nasais de vacas leiteiras**. Mestrado (Dissertação) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 76. 2017.
- SANTOS, R. P. et al. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1–9, 2020.
- SCHLEGELOVÁ, J. et al. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 327–334, 2003.
- SCHMITZ, F. J. et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Dusseldorf by six genotypic methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 341–351, 1998.
- SCHUKKEN, Y. H. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, p. 579–596, 2003.
- SCHWENDIMANN, L. et al. Staphylococcal Enterotoxin Gene Cluster: Prediction of Enterotoxin (SEG and SEI) Production and of the Source of Food Poisoning on the Basis of v Saß Typing . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 5, p. 1–15, 2020.
- SHARER, M. V. et al. Differential Expression of the Lactose Transporter Gene Affects Growth of *Staphylococcus aureus* in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2373–2381, 2010.
- SHEET, O. H. et al. Characterisation of *mecA* gene negative *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk from Northern Germany. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 6, p. 845–855, 2019.
- SHELDON, J. R. et al. The iron-regulated staphylococcal lipoproteins. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. 41, 2012.
- SHENKMAN, B. et al. Adherence Properties of *Staphylococcus aureus* under Static and Flow Conditions: Roles of agr and sar Loci, Platelets, and Plasma Ligands. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4473–4478, 2001.
- SHKRETA, L. et al. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. **Vaccine**, v. 23, n. 1, p. 114–126, 2004.
- SHORE, A. C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.
- SILVA, J. G. et al. First report of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST126 harbouring the *mecC* variant in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 3, p. 1–7, 2020a.
- SILVA, J. G.; ALCÂNTARA, A. M.; MOTA, R. A. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin-resistant: Literature review. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 223–228, 2018.
- SILVA, N. C. C. et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 6856–6862, 2013.

- SILVA, V. et al. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Lineages in Wild Animals in Europe: A Review. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 122, 2020b.
- SIMON, A. C. et al. Molecular characterization methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the pig production chain in northern Italy. **Italian Journal of Food Safety**, v. 9, n. 2, p. 120–124, 2020.
- SMITH, E. M. et al. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4737–43, 2005a.
- SMITH, E. M. et al. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4731–4736, 2005b.
- SOMMERHÄUSER, J. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 91–102, 2003.
- SPAAN, A. N. et al. Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus*: A Biological Tug of War. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 629–650, 2013.
- SPAAN, A. N. et al. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Pantone–Valentine Leukocidin and γ -Hemolysin CB with Human C5a Receptors. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 3, p. 1034–1043, 2015.
- SPAUDING, A. R. et al. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 422–447, 2013.
- STATACORP LLC. **Stata**. Release 16. [College Station]: Texas, 2018. 1 software.
- ŠTĚPÁN, J.; PANTUČEK, R.; DOŠKAŘ, J. **Molecular Diagnostics of Clinically Important Staphylococci**. **Folia Microbiologica**, v. 49, n. 4, p. 353–86, 2004.
- STER, C. et al. Evaluation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated proteins as vaccine targets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, n. 3–4, p. 311–318, 2010.
- STRANGER-JONES, Y. K.; BAE, T.; SCHNEEWIND, O. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 45, p. 16942–16947, 2006.
- TALBOT, B. G.; LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. **Livestock Production Science**, v. 98, n. 1–2, p. 101–113, 2005.
- TAREKGNE, E. K. et al. Enterotoxin gene profile and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine bulk milk and milk products of Tigray Region, Northern Ethiopia. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 8, p. 1387–1395, 2016.
- TENHAGEN, B. A. et al. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2542–2551, 2006.
- THORNSBERRY, C. et al. The Activity of a Combination of Penicillin and Novobiocin Against Bovine Mastitis Pathogens: Development of a Disk Diffusion Test. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 413–421, 1997.
- VAN BELKUM, A. et al. Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 222–232, 1997.
- VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. **Science**, v. 365, n. 6459, 2019.

- VÁZQUEZ, H. C. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in Mexico. **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia**, v. 21, n. 4, p. 308–316, 2011.
- VEH, K. A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 155–168, 2015.
- VICKERS, A. A.; CHOPRA, I.; NEILL, A. J. O. Intrinsic novobiocin resistance in *Staphylococcus saprophyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4484–4485, 2007.
- VIJAYAN, K. et al. Surveillance of variant *mecA* gene and analysis of efflux pump in *mecA* negative MRSA infections. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 5, p. 2007–2011, 2017.
- VRIELING, M. et al. Bovine *Staphylococcus aureus* secretes the leukocidin LukMF' to kill migrating neutrophils through CCR1. **mBio**, v. 6, n. 3, p. 1–9, 2015.
- WALDRON, D. E.; LINDSAY, J. A. Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5578–5585, 2006.
- WANG, D. et al. Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9560–9569, 2016.
- WANG, X. et al. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 527–534, 2014.
- WEINERT, L. A. et al. Molecular dating of human-to-bovid host jumps by *Staphylococcus aureus* reveals an association with the spread of domestication. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 829–832, 2012.
- WENDLANDT, S. et al. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 338–349, 2013.
- YAMADA, T. et al. Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of lukM-lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 1–2, p. 97–103, 2005.
- YANG, F. et al. Short communication: Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 1, p. 840–845, 2020.
- YI, Y. et al. Analysis of the genetic diversity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bovine subclinical mastitis case in Xinjiang, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 9, p. 568–575, 2018.
- YU, X. et al. Characterization of essential enolase in *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 897–905, 2011.
- ZADOKS, R. N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 357–372, 2011.
- ZHANG, L. et al. Virulence gene profiles: Alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2018.
- ZOU, D. et al. Prophage, phiPV83-pro, carrying panton-valentine leukocidin genes, on the *Staphylococcus aureus* P83 chromosome: comparative analysis of the genome structures of phiPV83-pro, phiPVL, phi11, and other phages. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 12, p. 2631–2643, 2000.

ZUBAIR S. et al. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus*, strain ILRI_Eymole1/1, isolated from a Kenyan dromedary camel. **Standards in Genomic Sciences**, v. 10, n. 109, p. 1-12, 2015.

APÊNDICES

Considerações Finais

O trabalho permitiu constatar a frequência dos diferentes genes ligados aos fatores de virulência de *S. aureus* em isolados de origem bovina, e a partir destes resultados formular a hipótese de que a presença dos genes codificadores para formação de biofilme pode ter relação com os elevados registros de resistência, como também sugerir que a elevada frequência dos genes *sdrE*, *isdH*, *eno*, *fusA*, *pgk*, *cysS*, *atpF* e *dapE* indica que os mesmos são conservados e têm potencial de investigação nos inquéritos epidemiológicos voltados para o desenvolvimento de vacinas.

Perspectivas Futuras

A investigação da ancestralidade do *spa* tipo 6861 poderá auxiliar na compreensão da epidemiologia da mastite bovina causada por *S. aureus*. Por fim, destaca-se a importância de ampliar os estudos com a técnica de *spa* Typing que se mostrou adequada, robusta e de fácil execução.