

## MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PATOGENICO DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

## MOLECULAR MARKERS FOR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PATHOGENIC POTENTIAL OF *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus*

Bianca de Souza Moreira<sup>1</sup>, Juliana da Silva Menezes Azola<sup>2</sup>, Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Mestre e discente do curso de especialização em Biologia Molecular e Genética, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

<sup>2</sup>Doutora e discente do curso de especialização em Biologia Molecular e Genética, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

<sup>3</sup>Doutora, com pós-doutorado, docente e coordenadora do curso de especialização em Biologia Molecular e Genética, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

\*Endereço para correspondência: Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP 37130-000, Alfenas-MG. Tel: (35) 3701-9687, E-mail: cibelegouvea@hotmail.com

### RESUMO

A introdução das técnicas de Biologia Molecular na medicina diagnóstica, como a PCR estabeleceu nova era na detecção e caracterização de micro-organismos. A PCR ainda reduz o tempo necessário para a confirmação dos dados laboratoriais, importante para os patógenos que causam infecções sérias, de rápida progressão e disseminação, permitindo o tratamento precoce e adequado, reduzindo a morbidade e mortalidade. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão sobre recentes aspectos da patogênese de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bactérias importantes para a saúde humana e animal e sua identificação por PCR.

**Palavras-Chave:** genética; microbiologia; PCR.

### ABSTRACT

The introduction of Molecular Biology techniques in diagnostic medicine, such as PCR, established a new era in the detection and characterization of microorganisms. PCR reduces the time required for confirmation of laboratory data, important for pathogens that cause serious infections, rapid progression and spread, allowing early and appropriate treatment, reducing morbidity and mortality. This work aims to present a review on recent aspects of the pathogenesis of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* important bacteria for human and animal health and its identification by PCR.

**Key Words:** genetics; microbiology; PCR.

### INTRODUÇÃO

A introdução das técnicas de Biologia Molecular na medicina diagnóstica e sua aplicação na microbiologia clínica estabeleceu uma nova era na detecção e caracterização de micro-organismos. Existem vários métodos para a identificação molecular, dentre esses, destacam-se os fundamentados na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia

da polimerase (PCR), especialmente, úteis para organismos de difícil detecção pelos métodos microbiológicos tradicionais, tanto de importância médica como veterinária. A PCR ainda reduz o tempo necessário para a confirmação dos dados laboratoriais, importante para os patógenos que causam infecções sérias, de rápida progressão e disseminação, como as infecções causadas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e ainda permite a identificação conjunta de

vários micro-organismos presentes em amostra única (1-3).

A técnica de PCR possibilita a amplificação específica de segmentos da molécula de DNA de interesse. Para tanto, utilizam-se os *primers*, pequenas sequências iniciadoras da replicação do DNA, complementares à sequência do DNA de interesse. Em seguida, a enzima DNA polimerase, catalisa a síntese de trechos da molécula de DNA, a partir dos iniciadores. Na reação, a temperatura comporta-se como uma aliada, provocando a desnaturação (com o objetivo de separar as fitas da molécula de DNA), seguida de sucessivos ciclos de hibridização e extensão, gerando, portanto, inúmeras e repetidas cópias do segmento de DNA de interesse. Outros fatores são influenciadores da reação, como a concentração de magnésio e os nucleotídeos presentes (3,4).

Este trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão sobre recentes aspectos da patogênese de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bactérias importantes para a saúde humana e animal e sua identificação por PCR.

## IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa presente no trato gastrointestinal de vários animais, incluindo os humanos. A maioria das cepas é comensal e raramente causa doença, exceto em hospedeiros imunodeprimidos e na presença de lesões da barreira gastrointestinal. Entretanto, algumas cepas adquiriram fatores específicos de virulência (patótipos), por meio de transposons, pró-fagos e plasmídeos e podem causar amplo espectro de doenças em humanos, demais mamíferos e em aves. O processo patogênico dá-se em várias etapas: colonização da mucosa, evasão dos sistemas de defesa do hospedeiro, multiplicação, infecção e dano ao hospedeiro. São encontrados dois grandes grupos de *E. coli* patogênicas: os patógenos intestinais, que causam diarreia (abordados no presente trabalho) e os extraintestinais, que causam várias infecções em humanos e animais, tais como: do trato urinário, pneumonia, meningite, septicemia e outras (5, 6, 7).

Assim, os patótipos de *E. coli* que causam diarreia são classificados com base no conjunto de genes de virulência presentes e nas características da doença. Esses patótipos incluem as *E. coli*: enteropatogênicas (EPEC); produtoras de shigatoxina (STEC), que incluem as enterohemorrágicas (EHEC); enterotoxigênicas (ETEC); difusamente aderentes (DAEC); enteroagregativas (EAEC); enteroinvasivas (EIEC) e aderente-invasivas (AIEC). Assim, as *E. coli* patogênicas constituem uma família de bactérias geneticamente heterogêneas e com evolução contínua (7).

A patogenicidade da *E. coli* depende da aquisição dos fatores de virulência, estruturas ou produtos que auxiliam o agente infeccioso a se instalar e a provocar alterações, causando desequilíbrios no hospedeiro. Estes são codificados por genes de virulência, adquiridos por transposons, plasmídeos e pró-fagos e transferidos entre os diferentes isolados, sendo identificados por métodos moleculares, como PCR, mediante a amplificação e detecção de genes característicos para cada patótipo (8).

Com relação aos diferentes patótipos de *E. coli*, EPEC foi o primeiro patótipo descrito, compreende um grupo diverso de bactérias não invasivas que causam a lesão do tipo A/E (“attaching and effacing”). Após a adesão à superfície das células epiteliais do intestino delgado, as bactérias causam alterações do citoesqueleto da célula intestinal, com acúmulo de filamentos de actina, abaixo do sítio de adesão bacteriana. Inicialmente, as bactérias aderem-se localmente, às células intestinais, por meio de fímbrias BFP (feixes formadores de pili), codificadas por genes dos pili tipo IV. Esses genes estão localizados no plasmídeo EAF (fator de aderência da EPEC). Essa ligação proporciona inúmeros eventos que resultam em danos às microvilosidades intestinais do hospedeiro. A presença do plasmídeo caracteriza a EPEC típica (tEPEC), contudo, há o subtipo atípico (aEPEC), no qual o plasmídeo de virulência, EAF, não está presente. As EPEC apresentam ainda genes encontrados no locus LEE (“locus of enterocyte effacement”), localizado na Ilha de Patogenicidade Cromossômica (PAI). O locus LEE codifica componentes estruturais do sistema de secreção do tipo III (T3SS), reguladores, translocadores, chaperonas e moléculas efetoras, que alteram diversos

processos de sinalização na célula hospedeira. Este locus também abriga o gene *eae*, que codifica a proteína intimina, expressa na face externa da membrana da bactéria e o gene para o seu receptor Tir, que é translocado da bactéria para a superfície das células epiteliais intestinais do hospedeiro, o que permite a firme adesão das bactérias às células epiteliais (5,9,10,11).

O patótipo STEC inclui as cepas produtoras da shigatoxina, potente citotoxina que paralisa a síntese proteica e induz apoptose das células do colo intestinal, codificada pelos genes *stx<sub>1</sub>* e *stx<sub>2</sub>*, adquiridos por fago lambdaídeo. Estas bactérias também podem apresentar o locus LEE, albergando, assim, o gene *eae*. Esse grupo inclui as *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC), sendo importante na microbiologia: veterinária (animais como reservatório, especialmente bovinos), ambiental (água e solo), de alimentos (contaminação, manuseio e preparação), além da clínica (saúde pública, vigilância sanitária e doenças humanas) (5,8).

Quanto às ETEC, compreendem um grupo diverso de patógenos, sendo o principal agente causal da diarreia dos viajantes e é endêmica em países em desenvolvimento. São capazes de produzir enterotoxina, semelhante à toxina colérica, que promove excessiva secreção de fluídos, causando a diarreia aquosa. São conhecidos dois tipos de enterotoxinas, as termoestáveis (ST) e as termolábeis (LT). Entre as primeiras, são relatados os subtipos STa (associada à patologia humana) e STb. Com relação às termolábeis, são conhecidos os subtipos LT-I e LT-II, predominantes em isolados humanos e animais respectivamente. Além dos genes para produção de ST e/ou LT, as ETEC apresentam mais de 25 antígenos de superfície (CS), antes chamados de fatores de colonização, para a aderência ao epitélio intestinal. Os genes que codificam as toxinas, CS e outras adesinas são localizados em plasmídeos. Além dos humanos, a produção de suínos também é, adversamente, afetada por este patótipo de *E. coli*, importante agente causal de morte de porcos neonatos e recém-desmamados (5,8).

As *E. coli* EAEC compreendem um grupo heterogêneo, que causa diarreia aquosa e persistente em crianças de países em desenvolvimento e desenvolvidos. Foram

assim denominadas por apresentarem padrão difuso de adesão às células em cultura, HEp-2 e HeLa. Nesse grupo, foram descritos dois tipos de adesinas codificadas por uma família de operons relacionados, que incluem as adesinas fimbriais e afimbriais, denominadas adesinas Afa/Dr, que induzem efeito citopático, caracterizado pelo desenvolvimento de longas extensões celulares que envolvem a bactéria aderente. Essas bactérias secretam também o autotransportador de toxina (Sat), envolvido na patogênese (8,10-12).

O patótipo EAEC é o grupo de descrição mais recente, está amplamente distribuído, sendo o agente causal de diarreia endêmica e epidêmica, provocando diarreia persistente em crianças de áreas endêmicas, em pessoas imunocomprometidas e é a segunda causa mais frequente da diarreia dos viajantes. É caracterizada pelo padrão de aderência agregativa em células em cultura, HEp-2 e HeLa. A colonização da mucosa intestinal pelas bactérias ocorre por fimbrias de aderência agregativa (AAF), codificadas por genes localizados no plasmídeo pAA. São descritos 4 tipos de AAF (I a IV), além de adesinas não fimbriais. O ativador transcricional, AggR, localizado no plasmídeo pAA, regula a biogênese de AAFs. A aderência das EAEC à mucosa intestinal (predominantemente colônica) é caracterizada pela formação de uma fina camada de muco agregante, no interior da qual as bactérias sobrevivem. A formação do biofilme é atribuída à atividade dos genes *fis* e *yafK*. A secreção de dispersina (codificada no pAA) facilita o movimento das bactérias na superfície celular, permitindo a subsequente agregação e aderência. A dispersina é altamente imunogênica e translocada por um transportador complexo, o cassete ligante de ATP (ABC) (8,10-12).

*E. coli* EIEC são patógenos intracelulares facultativos e compartilham características bioquímicas e genéticas, além de propriedades patogênicas com *Shigella* spp. Colonizam a mucosa colônica, onde ocorre a invasão de células M, macrófagos e células epiteliais, resultando em diarreia aquosa, que em casos severos é seguida de disenteria, com presença de muco e sangue. A aquisição do plasmídeo de invasão (pINV), provavelmente, foi o evento mais importante na evolução dessas bactérias a partir da *E. coli* não patogênica. Um terço desse grande

plasmídeo de cópia única codifica elementos IS, que permitem a invasão do epitélio intestinal pela bactéria. Essa região codifica muitos componentes do sistema de secreção 3 (T3SS), como translocadores, ativadores transcricionais, efetores e chaperonas. Além dos genes localizados no pINV, genes cromossômicos são necessários para a patogênese e essas bactérias podem ainda produzir a toxina Sen, acentuando a enterotoxicidade (10,12).

O patótipo AIEC está associado à Doença de Crohn e à Doença Inflamatória Intestinal, afetando principalmente, o intestino delgado. Não expressa os fatores de virulência encontrados nos demais patótipos de *E. coli* e as bases genéticas para o fenótipo invasivo e pró-inflamatório não são bem conhecidas. O genoma das AIEC apresenta regiões homólogas a *E. coli* extraintestinal, mas são fenotipicamente distintas. Esse patótipo apresenta fatores de adesão a receptores específicos do epitélio intestinal, promovendo a colonização da mucosa, a invasão das células intestinais e de macrófagos, acompanhadas de replicação intracelular, sem induzir a morte da célula hospedeira. A adesão é mediada pelas fímbrias do tipo I, expressando a subunidade adesiva FimH, localizada na extremidade da fímbria. Mutações específicas no gene *fimH* resultam na proteína FimH com capacidade de aderência aumentada ao antígeno carcinoembrionário relacionado à molécula de adesão celular 6 (CEACAM6), um receptor glicosilado localizado na face apical do enterócito, normalmente expresso em portadores da Doença de Crohn. Foram identificados ainda vários reguladores de genes de virulência, que necessitam de estudos de genômica funcional para a compreensão do seu papel na sobrevivência e crescimento das AIEC e, finalmente, genes envolvidos na captação de ferro, essencial para a virulência de *E. coli* extraintestinais (5, 13).

A diarreia é um dos quatro problemas de saúde mais importantes mundialmente e a segunda causa de morte de crianças com até 5 anos de idade. Dentre os agentes etiológicos prevalentes da doença destacam-se as *E. coli*: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC) e shigatoxigênica (STEC) (14,15). No Brasil, há poucos estudos sobre a prevalência de *E. coli* enteropatogênicas. Durante décadas a

tEPEC foi o principal enteropatógeno causador de diarreia em crianças no Brasil (16-18), contudo, estudo recente aponta a maior frequência de EAEC, seguida de aEPEC e STEC como agentes causais de diarreia em crianças com até 5 anos de idade (11).

Tradicionalmente, a identificação dos diversos patótipos de *E. coli* baseia-se na identificação de sorotipos utilizando-se anticorpos contra os antígenos da superfície celular: O (polissacarídeo), com cerca de 186 diferentes antígenos; H (flagelar), com 53 diferentes antígenos e o K (capsular), pouco utilizado, pois poucos laboratórios são capazes de identificá-lo. Avanços nas técnicas moleculares possibilitaram o estabelecimento de subtipos de *E. coli* baseados em características genéticas e sorotipagem molecular, mais discriminatórios que os métodos de análise fenotípica (7). A Tabela 1 sumariza diversos trabalhos utilizando técnicas de PCR para a identificação de diversos patótipos de *E. coli*.

### ***Staphylococcus aureus***

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, componente da microbiota humana e presente em diversas partes do corpo como fossas nasais, garganta, intestino e pele. Como comensal, a bactéria pode ser carregada sem prejuízos a saúde dos indivíduos, contudo, em situações de imunossupressão e quando há rompimento da barreira cutânea a presença de *S. aureus* pode favorecer a ocorrência de infecções, geralmente, piogênicas, de pele e tecidos moles, como foliculite, furunculose, carbúnculo e impetigo. Pode ainda ocasionar doenças mais graves e até mesmo fatais, como osteomielite, endocardite, pneumonia necrosante, artrite bacteriana e intoxicações, como a Síndrome da Pele Escaldada e a Síndrome do Choque Tóxico. É uma bactéria também importante no âmbito veterinário, causando doenças como a mastite bovina, caprina e ovina. As doenças infecciosas em animais de produção apresentam grande impacto na economia, pois diminuem a produção pecuária, um setor que se destaca na economia do país. É importante mencionar que *S. aureus* tem sido isolado também de alimentos, sendo importante causa de intoxicação alimentar. Devido ao seu potencial de patogenicidade, a caracterização e identificação correta de *S.*

*aureus* é de extrema importância para o sucesso do tratamento das doenças, por ele ocasionadas (23-25).

**Tabela 1.** Identificação de patótipos de *Escherichia coli* por técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR)

| Patótipo* | Gene                        | Amostra            | Técnica       | Referência |
|-----------|-----------------------------|--------------------|---------------|------------|
| EPEC      | <i>eae, bfpA, bfpB</i>      | fezes diarreicas   | PCR           | 11         |
|           | <i>eae, bfp, EAF</i>        | fezes diarreicas   | PCR           | 17         |
|           | <i>eae, bfpA</i>            | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 19         |
|           | <i>escV, bfpB</i>           | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 20         |
| STEC      | <i>eae, stx1, stx2</i>      | fezes diarreicas   | PCR           | 11         |
|           | <i>escV, stx1, stx2</i>     | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 20         |
| EHEC      | <i>VT1, VT2, VT2e, HLY</i>  | fezes diarreicas   | PCR           | 17         |
|           | <i>eae, stx1, stx2</i>      | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 19         |
| ETEC      | <i>elt, est</i>             | fezes diarreicas   | PCR           | 11         |
|           | <i>LT-I, STI</i>            | fezes diarreicas   | PCR           | 17         |
|           | <i>elt, est</i>             | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 19         |
|           | <i>elt, estIa, estIb</i>    | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 20         |
|           | <i>LT, ST</i>               | fezes diarreicas   | PCR           | 21         |
| DAEC      | <i>afa/dr</i>               | fezes diarreicas   | PCR           | 21         |
| EAEC      | <i>aatA, aggR</i>           | fezes diarreicas   | PCR           | 11         |
|           | <i>aggE</i>                 | fezes diarreicas   | PCR           | 17         |
|           | <i>aggR</i>                 | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 19         |
|           | <i>astA, aggR, pic</i>      | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 20         |
| EIEC      | <i>ipaH</i>                 | fezes diarreicas   | PCR           | 11         |
|           | <i>invE</i>                 | fezes diarreicas   | PCR           | 17         |
|           | <i>ipaH</i>                 | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 19         |
|           | <i>invE</i>                 | fezes diarreicas   | PCR multiplex | 20         |
| AIEC      | <i>fimH, malB</i>           | sangue humano      | PCR           | 13         |
|           | <i>chuA, yjaA, TspE4.C2</i> | biópsia intestinal | PCR           | 22         |

\*Patótipos de *Escherichia coli*: EPEC, enteropatogênicas; STEC, produtoras de shigatoxina; EHEC, enterohemorrágicas; ETEC, enterotoxigênicas; EIEC, enteroinvasiva; EAEC, enteroagregativa; DAEC, difusamente aderentes; AIEC, aderente-invasiva.

A bactéria *S. aureus* é um patógeno importante em relação à resistência aos antibióticos, pois cepas resistentes surgiram logo após a introdução da penicilina e a sigla MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) é utilizada para identificar as cepas resistentes à meticilina, enquanto a sigla MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina) é utilizada para identificar as cepas sensíveis a esse antibiótico. As infecções por MRSA, primordialmente, nosocomiais (HA-MRSA), tornaram-se ainda mais preocupantes após a década 1980, quando foram registrados os primeiros casos de cepas comunitárias resistentes à meticilina (CA-MRSA) e os dados relativos a sua ocorrência no Brasil ainda são escassos (23, 26). Somada à resistência, ocorre em cepas de *S. aureus*, as colônias variantes pequenas (SCV), uma variação morfológica, que a princípio acreditava-se fazer parte do ciclo de crescimento normal da bactéria, porém, nas últimas duas décadas, tem-se observado que este fenótipo está associado à infecções persistentes e recorrentes, que pode ocorrer após anos de aparente cura, como infecções respiratórias de pacientes com fibrose cística, osteomielite, infecções persistentes de pele, feridas e próteses (25).

No Brasil *S. aureus* é responsável por 20% das infecções sanguíneas nosocomiais, é o principal patógeno causador de infecções na pele e tecidos moles, a segunda causa mais frequente de infecções respiratórias e ainda tem sido encontrado em creches e alimentos (crús e preparados). O clone de MRSA, mais frequente no Brasil, é o denominado Brasileiro (ST239-SCCmec tipo III), que apresenta ampla distribuição, sendo responsável por 1/5 de todos os isolados HA-MRSA com resistência múltipla a antibióticos mundialmente. Recentemente, outros clones têm sido descritos no Brasil, incluindo o MRSA suscetível a oxacilina e MSSA resistente a vancomicina (23-31).

Os estudos genômicos de *S. aureus* demonstram variação geográfica, clínica e quanto à origem de hospedeiros. O principal grupo estudado compreende os isolados de infecções humanas, que são, majoritariamente, MRSA. Foi demonstrado que a resistência à meticilina depende da presença dos genes *mec* (*mecA*, *mecB* e *mecC*) presentes no elemento móvel SCC (SCCmec), que codificam uma proteína específica ligante de penicilina (PBP2a). Até

o momento, 11 tipos de SCCmec (tipo I a XI) foram descritos em MRSA, sendo prevalentes no Brasil os tipos III e IV SCCmec. O elemento SCCmec carrega também os genes que controlam a expressão dos genes *mec*. O gene *mecR1* codifica a proteína transdutora de sinal, MecR1 e o *mecI* codifica a proteína repressora MecI, que também atua como carreadora para troca de informação genética entre cepas de *S. aureus*. SCCmec localiza-se próximo à origem de replicação no cromossomo de *S. aureus*, inserido no sítio attB. Assim, esse elemento abriga 3 complexos gênicos: complexo de genes *mec* (genes, sequências de inserção e ORFs); complexo de genes *ccr*, de recombinases sítio-específico, responsáveis pela excisão e integração (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC* e ORFs) e região de junção (região J) (24-32).

No complexo de genes *ccr*, podem ser inseridos genes de resistência múltipla a antibióticos e de resistência a metais pesados, e a SCCmec pode ser inserida no cromossomo bacteriano por ação das recombinases sítio-específicas *ccrAB* e/ou *ccrC*. Assim, diferentes cepas podem trocar informação genética para a adaptação a novos ambientes e em resposta à pressão de seleção pelos antibióticos. Até o momento, foram descritos 8 alótipos de complexos de genes *ccr*. Baseado na localização de genes regulatórios e nas diferentes sequências de inserção, o complexo de genes *mec* é dividido em 5 classes e a região J em J1, J2 e J3, de acordo com sua localização na SCCmec. A região J inclui ainda os reguladores e elementos genéticos como integrase, o transposon Tn554 (resistência a eritromicina), plasmídeos pT181 (resistência a tetraciclina), pUB110 (resistência a aminoglicosídeo), transposon Tn4001 e sequências de inserção (32).

Determinantes adicionais de resistência podem aumentar a patogenicidade da bactéria, bem como complementos que potencializam os determinantes de toxinas e virulência, em ilhas genômicas denominadas MGEs. Estas incluem os genes *lukF* e *lukS* localizados em sequência no genoma de *S. aureus*, em uma região denominada pró-fago, que contem 5 sequências repetitivas similares ao sítio de ligação da recombinase de bacteriófagos de *S. aureus*. Tais genes codificam a leucocidina Pantón-Valentine (PVL), tóxica

para neutrófilos, um potente fator de virulência relacionado às infecções da pele, de tecidos moles e doenças severas e marcador molecular da CA-MRSA. Ainda, os genes *sec4*, *sel2*, *sek* e *seq*, localizados na ilha Sa3 codificam enterotoxinas associadas ao dano tecidual direto, à superestimulação ou desregulação dos mediadores inflamatórios inatos e produção de citocinas. Outras ilhas genômicas como vSa $\alpha$ , vSa $\beta$ , vSa $\gamma$  são polimórficas, com relação ao conteúdo de genes de virulência, mas conservadas nas diversas linhagens. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) também são encontrados entre os diversos isolados de *S. aureus*. Os SNP advêm de mutação e recombinação na região próxima à origem de replicação, possibilitando o surgimento de novos clones patogênicos (24,33).

Outras infecções estafilocócicas também são descritas. Este é o caso de *Staphylococcus* coagulase-negativos (CoNS), que eram considerados comensais encontrados na pele, entretanto, foram reconhecidos como importante causa de infecções em humanos. Assim, é importante a distinção entre cepas de *S. aureus* e CoNS. O gene *femA* codifica uma proteína de 48 kDa importante para a síntese de peptidoglicanas da parede celular, tanto em MSSA como em MRSA, sendo um fator que influencia a resistência a metilicina. Este gene é altamente conservado em *S. aureus* e não ocorre em CoNS, assim, esse gene pode ser utilizado para a diferenciação de cepas de *S. aureus* e CoNS e ainda tem sido utilizado para a identificação de SCV e da presença de *S. aureus* em diferentes amostras (34-36).

Outro gene extensamente utilizado para identificação de *S. aureus* é o *coa*, o qual codifica a proteína coagulase estafilocócica, sendo esta considerada um importante critério microbiológico para a identificação da espécie. Sua aplicação no diagnóstico tem sido eficiente por se tratar de um gene altamente conservado dentro da espécie. Entretanto, é um gene altamente polimórfico, devido às suas sequências variáveis na região de codificação 3'

(repetições em tandem de 81 bp), o que contribui para estudos epidemiológicos, permitindo a diferenciação entre cepas de *S. aureus*. Os produtos de amplificação do gene *coa* podem apresentar tamanhos distintos, variando de 550-875 bp (37-39).

O gene *spa* também é utilizado para identificação direta de *S. aureus*, o qual codifica a proteína A (adesina), um dos fatores de virulência da espécie. Assim como o gene *coa*, o *spa* é altamente conservado na espécie e trata-se também de um gene polimórfico (repetições em tandem de 24bp, na região X). A tipagem desta região altamente variável do gene (região X) tem sido utilizada como o principal método de genotipagem de *S. aureus*, isso se deve ao seu elevado poder discriminatório, precisão, reprodutibilidade e fácil interpretação (40-42).

Os genes 16S e 23S do rRNA são utilizados para identificar quase todas as espécies de estafilococos e as sequências obtidas podem ser comparadas com as registradas no banco de Diferenciação Ribossômica de Micro-organismos (RIDOM – “Ribosomal Differentiation of Microorganisms”). Estes genes são muito conservados, sendo uma opção confiável para a identificação de *S. aureus* (43). Assim, vários genes têm sido utilizados como marcadores moleculares para a identificação e caracterização de *S. aureus*. Os genes *nuc*, *clfA*, *eap*, *coa* e *sodM*, são bons marcadores para SCV; *mecA* para identificação de MRSA; 16S rRNA, especialmente o gene *rpoB*, para a determinação de espécie e subespécie (27).

Tradicionalmente, a caracterização, identificação e estudos populacionais de *S. aureus* são realizadas por métodos fenotípicos. Entretanto, o desenvolvimento de técnicas moleculares possibilitou a distinção de isolados de *S. aureus* e a compreensão da estrutura populacional. Dentre as técnicas moleculares a PCR é uma ferramenta muito utilizada para a identificação e caracterização dessa bactéria. A Tabela 2 apresenta trabalhos utilizando técnicas de PCR para a identificação e caracterização de *S. aureus*.

**Tabela 2.** Identificação e caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)

| Patótipo*  | Gene                         | Amostra                      | Técnica           | Ref |
|------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-----|
| SA         | <i>femA, 16S</i>             | crianças com fibrose cística | PCR em tempo real | 34  |
|            | <i>femA, 16S, mecA</i>       | alimentos                    | PCR multiplex     | 36  |
|            | <i>coa</i>                   | várias                       | PCR               | 37  |
| SCV        | <i>mecA, femA, 16S</i>       | sangue humano                | PCR multiplex     | 35  |
| SA-SE      | <i>coa, nuc, sea</i>         | várias                       | PCR               | 39  |
| MRSA/MSSA  | <i>coa, agr</i>              | várias                       | PCR               | 38  |
|            | <i>mecA, spa, sa442</i>      | humana                       | PCR               | 40  |
|            | <i>spa</i>                   | humana                       | PCR               | 41  |
| MRSA/PVL   | <i>spa, lukS-PV, lukF-PV</i> | swab nasal                   | PCR               | 44  |
| MRSA       | <i>16S, femA, mecA, lukS</i> | swab nasal                   | PCR               | 45  |
|            | <i>mecA</i>                  | swab nasal                   | PCR               | 29  |
| SA mutante | <i>spa</i>                   | swab nasal                   | PCR               | 42  |

\*SA, *Staphylococcus aureus*; SCV, colônias variantes pequenas; SA-SE, *S. aureus* produtor de enterotoxina; MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina; MSSA, *S. aureus* sensível a meticilina; PVL, leucocidina Pantón-Valentine.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias *E. coli* e *S. aureus* são importantes patógenos humanos e de animais. A sua rápida e precisa identificação e caracterização permite o tratamento precoce e adequado, reduzindo a morbidade e mortalidade causadas por esses patógenos. As técnicas moleculares são mais específicas e rápidas que as técnicas microbiológicas convencionais (fenotípicas), principalmente, para micro-organismos como estes, tão diversos genética e fenotipicamente. Essas técnicas são, também, apropriadas para triagem,

identificação, caracterização, estudos de genética microbiana e da relação patógeno-hospedeiro, entretanto, o aprimoramento das técnicas é necessário para que o tempo de análise e o número de etapas seja reduzido, bem como sejam desenvolvidos reagentes mais eficientes para a extração de ácidos nucleicos de amostras variadas e para reduzir a variabilidade dos resultados, como no caso de bactérias Gram-positivas, pois a presença da parede celular dificulta a extração de ácidos nucleicos, o que pode trazer interferência nos resultados.

## REFERÊNCIAS

- (1) MILLAR, B.C.; XU, J.; MOORE, J.E. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. **Current Issues in Molecular Biology**, Wymondham, v. 9, n. 1, p. 21-39, jan. 2007.
- (2) CAI, H.Y.; CASWELL, J.L.; PRESCOTT, J.F. Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals:



- a diagnostic laboratory perspective. **Veterinary Pathology**, Madison, v. 51, n. 2, p. 341-350, mar. 2014.
- (3) VALONES, M.A.; GUIMARÃES, R.L.; BRANDÃO, L.A.; DE SOUZA, P.R.; DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, A.; CROVELA, S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1-11, jan. 2009.
- (4) LIMA, L. M. **Conceitos básicos de técnicas em Biologia Molecular**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008.
- (5) CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 26, n. 4, p. 822-880, out. 2013.
- (6) GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. New York: Wiley-Blackwell, 2010, p. 267-308.
- (7) FRATAMICO, P.M.; DEBROY, C.; LIU, Y.; NEEDLEMAN, D.S.; BARANZONI, G.M.; FENG, P. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 7, p. 644, maio 2016.
- (8) KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 123-140, fev. 2004.
- (9) SILVA, J.A.; SILVA, W.D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 3, p. 175-196, set./dez. 2005.
- (10) SANCHEZ-VILLAMIL, J.; NAVARRO-GARCIA, F. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Future Microbiology**, London, v. 10, n. 6, p. 1009-1033, jun. 2015.
- (11) DIAS, R.C.B.; DOS SANTOS, B.C.; DOS SANTOS, L.F.; VIEIRA, M.A.; YAMATOGLI, R.S.; MONDELLI, A.L.; SADATSUNE, T.; SFORCIN, J.M.; GOMES, T.A.T.; HERNANDES, R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 124, n. 4, p. 299-308, abr. 2016.
- (12) JAFARI, A.; ASLANI, M.M.; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, Tehran, v. 4, n. 3, p. 102-117, set. 2012.
- (13) NAZARETH, N.; MAGRO, F.; MACHADO, E.; RIBEIRO, T.G.; MARTINHO, A.; RODRIGUES, P.; ALVES, R.; MACEDO, G.N.; GRACIO, D.; COELHO, R.; ABREU, C.; APPELBERG, R.; DIAS, C.; MACEDO, G.; BULL, T.; SARMENTO, A. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Escherichia coli* in blood samples from patients with inflammatory bowel disease. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 204, n. 6, p. 681-692, dez. 2015.
- (14) MAJOWICZ, S.E.; SCALLAN, E.; JONES-BITTON, A.; SARGEANT, J.M.; STAPLETON, J.; ANGULO, F.J.; YEUNG, D.H.; KIRK, M.D. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 11, n. 6, p. 447-455, jun. 2014.
- (15) PIRES, S.M. FISCHER-WALKER, C.L. LANATA, C.F. DEVLEESSCHAUWER, B. HALL, A.J. KIRK, M.D. DUARTE, A.S. BLACK, R.E. ANGULO, F.J. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0142927, dez. 2015.
- (16) FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.B.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic

- Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 359-363, jul. 2005.
- (17) ORLANDI, P.P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; PEREIRA DA SILVA, L.H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 507-517, abr. 2006.
- (18) SCALETSKY, I.C.A.; SOUZA, T.B.; ARANDA, K.R.S.; OKEKE, I.N. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. **BMC Microbiology**, London, v. 10, p. 25, jan. 2010.
- (19) ARANDA, K.R.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 267, n. 2:145-150, fev. 2007.
- (20) MÜLLER, D.; GREUNE, L.; HEUSIPP, G.; KARCH, H.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, M.A. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 73, n. 10, p. 3380-3390, maio 2007.
- (21) MERAZ, I.M.; JIANG, Z.-D.; ERICSSON, C.D.; BOURGEOIS, A.L.; STEFFEN, R.; TAYLOR, D.N.; HERNANDEZ, N.; DUPONT, H.L. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Diffusely Adherent *E coli* as likely causes of a proportion of pathogen-negative travelers' diarrhea - a PCR-based study. **Journal of Travel Medicine**, Oxford, v. 15, n. 6, p.412-418, nov. 2008.
- (22) RASO, T.; CRIVELLARO, S.; CHIRILLO, M.G.; PAIS, P.; GAIA, E.; SAVOIA, D. Analysis of *Escherichia coli* isolated from patients affected by Crohn's disease. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 2, p. 131-137, ago. 2011.
- (23) EVANGELISTA, S.S.; OLIVEIRA, A.C. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 68, n. 1, p. 136-143, jan./fev. 2015.
- (24) FITZGERALD, J.R.; HOLDEN, M.T.G. Genomics of natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 70, p. 459-478, set. 2016.
- (25) KAHL, B.C.; BECKER, K.; LÖFFLER, B. Clinical significance and pathogenesis of Staphylococcal small colony variants in persistent infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 29, n. 2, p. 401-427, abr. 2016.
- (26) ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 52, n. 9, p.1138-1143, maio 2011.
- (27) ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T.C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, London, v. 16, n. 1, p. 115, jun. 2016.
- (28) CHAMON, R.C.; RIBEIRO, S.S.; COSTA, T.M.; NOUÉR, S.A.; SANTOS, K.R.N. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, nov. 2016 (in press). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.015>.
- (29) BRAGA, E.D.V.; AGUIAR-ALVES, F.; FREITAS, M.F.N.; SILVA, M.O.; CORREA, T.V.; SNYDER, R.E.; ARAÚJO, V.A.; MARLOW, M.A.; RILEY, L.W.; SETÚBAL, S.; SILVA, L.E.; CARDOSO, C.A.A. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. **BMC Infectious**

- Diseases**, London, v. 14, p. 538, out. 2014.
- (30) PANESSO, D.; PLANET, P.J.; DIAZ, L.; HUGONNET, J.E.; TRAN, T.T.; NARECHANIA, A.; MUNITA, J.M.; RINCON, S.; CARVAJAL, L.P.; REYES, J.; LONDOÑO, A.; SMITH, H.; SEBRA, R.; DEIKUS, G.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E.; ROSSI, F.; ARTHUR, M.; ARIAS, C.A. Methicillin-susceptible, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 10, p.1844-1848, out. 2015.
- (31) COSTA, W.L.R.; FERREIRA, J.S.; CARVALHO, J.S.; CERQUEIRA, E.S.; OLIVEIRA, L.C.; ALMEIDA, R.C.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meats and prepared foods in public hospitals in Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 80, n. 1, p. M147-150, jan. 2015.
- (32) LIU, J.; CHEN, D.; PETERS, B.M.; LI, L.; LI, B.; XU, Z.; SHIRLIFF, M.E. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 101, p. 56-67, nov. 2016.
- (33) MOON, B.Y.; PARK, J.Y.; ROBINSON, D.A.; THOMAS, J.C.; PARK, Y.H.; THORNTON, J.A.; SEO, K.S. Mobilization of genomic islands of *Staphylococcus aureus* by temperate bacteriophage. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. e0151409, mar. 2016.
- (34) JOHNSON, E.J.; ZEMANICK, E.T.; ACCURSO, F.J.; WAGNER, B.D.; ROBERTSON, C.E.; HARRIS, J.K. Molecular identification of *Staphylococcus aureus* in airway samples from children with cystic fibrosis. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0147643, jan. 2016.
- (35) KIM, N.-H.; KANG, Y.M.; HAN, W.D.; PARK, K.U.; PARK, K.-H.; YOO, J.I.; LEE, D.-G.; PARK, C.; SONG, K.-H.; KIM, E.S.; PARK, S.W.; KIM, N.J.; OH, M.D.; KIM, H.B. Small-colony variants in persistent and recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Microbial Drug Resistance**, New York, v. 22, n. 7, p. 538-544, out. 2016.
- (36) XU, B.; LIU, L.; LIU, L.; LI, X.; LI, X.; WANG, X. A multiplex PCR assay for the rapid and sensitive detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **Journal of Food Science**, Chicago, v.77, n. 1, p.M638-M642, nov. 2012.
- (37) GHARIB, A.A.; ADEL ATTIA, A.A.; BENDARY, M.M. Detection of the *coa* gene in *Staphylococcus aureus* from different sources by polymerase chain reaction. **International Journal of Microbiological Research**, Navi Mumbai, v. 4, n. 1, p. 37-42, jan./mar. 2013.
- (38) WATANABE, S.; ITO, T.; SASAKI, T.; LI, S.; UCHIYAMA, I.; KISHII, K.; KIKUCHI, K.; SKOV, R.L.; HIRAMATSU, K. Genetic diversity of staphylocoagulase genes (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 5, p. e5714, maio 2009.
- (39) MOGHASSEM HAMIDI, R.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S.S.; POORMONTASERI, M.; DERAKHSHANDEH, A. Association between the enterotoxin production and presence of *Coa*, *Nuc* genes among *Staphylococcus aureus* isolated from various sources, in Shiraz. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz, v. 16, n. 4, p. 381-384, out./dez. 2015.
- (40) SHAKERI, F.; SHOJAI, A.; GOLALIPOUR, M.; ALANG, S.R.; VAEZ, H.; GHAEMI, E.A. *Spa* diversity among MRSA and MSSA strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. **International Journal of Microbiology**, Cairo, v. 2010, article ID 351397, jul. 2010.
- (41) SHAKERI, F.; MANSOURIAN, A.R.; GHAEIM, E.A. *Staphylococcus aureus* protein A gene typing by PCR-RFLP. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 7, n. 27, p. 3448-3452, jul. 2013.

- (42) VOTINTSERA, A.A.; FUNG, R.; MILLER, R.R.; KNOX, K.; GODWIN, H.; WYLLIE, D.; BOWDEN, R.; CROOK, D.W.; WALKER, A.S. Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. **BMC Microbiology**, London, v. 14, p. 63-73, mar. 2014.
- (43) BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; von EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, nov. 2004.
- (44) PIRES, F.V.; CUNHA, M.L.R.S.; ABRAÃO, L.M.; MARTINS, P.Y.F.; CAMARGO, C.H.; FORTALEZA, C.M.C.B. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e92537, mar. 2014.
- (45) AL-TALIB, H.; YEAN, C.Y.; AL-KHATEEB, A.; HASAN, H.; RAVICHANDRAN, M. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a newly developed dry reagent-based polymerase chain reaction assay. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 484-490, dez. 2014..

Enviado: 15/03/2017  
Revisado: 03/05/2018  
Aceito: 10/06/2018