JULIANA AIZAWA PORTO DE ABREU

Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de
isolados de mastite bovina.

São Paulo

2016

JULIANA AIZAWA PORTO DE ABREU

Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3444
FMVZ

Abreu, Juliana Aizawa Porto de
Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina. / Juliana Aizawa Porto de Abreu. -- 2017.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Mastite. 3. Antibiograma. 4. *mecA*. 5. *spa* Typing. I. Título.

São Paulo, 25 de maio de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina", protocolado sob o CEUA nº 6323200215, sob a responsabilidade de Marcos Bryan Heinemann, foi aprovado na reunião de 25/05/2015, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Study of the molecular diversity of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis", protocol number CEUA 6323200215, under the responsibility Marcos Bryan Heinemann, was approved in the meeting of day 05/25/2015, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ABREU, Juliana Aizawa Porto de

Título: Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os que contribuíram com ensinamentos e incentivos para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado os caminhos e escolhas que levaram até a realização desta etapa dos meus estudos.

Agradeço a minha família sem a qual não poderia ser nada do que sou hoje. José e Nelcione por me ensinar sobre amor incondicional, respeito e princípios; por todos os momentos que me proporcionaram e espero que ainda possam proporcionar; pelo apoio com que pude contar tantas vezes. Rodrigo pelo amor que não se apaga e por ter me ensinado o que é uma bactéria, entre tantas outras coisas.

Aos meus amigos por me trazer alegria e força nos momentos em que eu não conseguia achar em mim mesma. Do CSA/Band Christiane e Fernanda. Da VETUSP75, Deise, Mosk, Rango e Sen; Maria e Sipá. Do VPS, Antonio, Bruna, Cris, Dani, Herbert, Hilda, Pi e Sol. Dessas raízes para a vida.

Agradeço a todos que ajudaram diretamente e indiretamente na realização deste projeto, em especial à Dra Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito (Embrapa Gado de Leite) e Dr Alessandro de Sá Guimarães (Embrapa Gado de Leite). A FAPESP (2015/10332-6) pelo apoio financeiro, e a Embrapa Gado de Leite e o Laboratório Vida Vet pelo apoio técnico.

E um agradecimento especial a Antonio Francisco de Souza Filho, Gisele Oliveira de Souza, Sheila Oliveira de Souza e Sueli Akemi Taniwaki Miyagi que além da ajuda na realização do projeto foram os amigos que faziam o dia a dia mais leve.

Ao meu orientador, Marcos Bryan Heinemann, pelos ensinamentos, dedicação ao experimento e compreensão em relação a fatores externos a ele.

E a todos os docentes e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo acolhimento e amizade nesse período. E por fim os alunos do LZB Cassia, Eleine, Israel, Nicolas e Osvaldo pela paciência.

Meu sincero agradecimento

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”

– Louis Pasteur

RESUMO

ABREU, J. A. P de. **Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina.** [Study of the molecular diversity of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis].

A mastite bovina é considerada a enfermidade de maior impacto na pecuária leiteira mundial. Apesar da adoção de práticas de manejo para minimizar a ocorrência desta, os resultados não são satisfatórios para o controle de *Staphylococcus aureus*, o principal agente causador. Além da importância veterinária, possui implicações na saúde humana devido ao uso extensivo de antibióticos no tratamento e controle da doença e devido ao potencial de disseminação zoonótica de *S. aureus*. A principal preocupação em relação à resistência aos antimicrobianos é referente à meticilina, mediada pelo gene *mecA*. Estudos moleculares são importantes para o conhecimento da diversidade genética dos agentes causadores de mastite. A tipagem por sequenciamento de um único locus, do gene da região X da proteína A de *S. aureus* (*spa* Typing), tem sido utilizada com sucesso para investigar estrutura populacional, sendo adequada para estudos epidemiológicos. O presente projeto teve como objetivo pesquisar o perfil de resistência aos antimicrobianos e a presença de genes de resistência à meticilina e de *S. aureus* isolados de mastite bovina, além de compreender a diversidade genética, identificar possíveis novos perfis e conhecer a distribuição destes isolados. Os resultados encontrados foram a ausência de resistência à meticilina no antibiograma, confirmada pela ausência do gene *mecA*, e a baixa prevalência de multirresistência aos antimicrobianos testados. Apesar de mais de 58,74% dos isolados (242/412) serem resistentes a pelo menos um antibiótico, 53,64% (221/412) correspondem a resistência à ampicilina. Foram determinados 44 *spa* tipos diferentes, sendo os três mais frequentes t605 (57,45%), t002 (8,4%) e t127 (8,13%). Não houve associação entre a distribuição dos *spa* tipos e as variáveis analisadas de ano, estado, município e fazenda, e perfil de resistência aos antimicrobianos. Este é o primeiro estudo que utiliza o *spa* typing para avaliar uma coleção temporalmente diversa e, portanto, representativa da região estudada ao longo de 22 anos. Logo, espera-se que a descrição dos tipos de *S. aureus* obtidos contribua para a compreensão dos aspectos epidemiológicos envolvidos na transmissão do patógeno e do papel dos hospedeiros como reservatórios para linhagens resistentes. Tal compreensão é imprescindível para a prevenção, controle e tratamento da mastite bovina.

Palavras Chaves: *Staphylococcus aureus*, mastite, antibiograma, *mecA*, *spa* Typing.

ABSTRACT

ABREU, J. A. P. **Study of the molecular diversity of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis** [Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina].

Bovine mastitis is considered the disease of greatest impact in global dairy industry. Despite the adoption of management practices to minimize its occurrence, the results are not satisfactory for the control of *Staphylococcus aureus*, the major causative agent. Besides veterinary importance, there are also implications for human health due to the extensive use of antibiotics in treatment and control of the disease and due to the potential for zoonotic spread of *S. aureus*. The main concern regarding antimicrobial resistance is methicillin resistance mediated by the *mecA* gene. Molecular epidemiology studies are important for the understanding of the genetic diversity of the causative agents of mastitis. Typing by sequencing of a single locus of the X region gene of the *S. aureus* protein A (*spa* Typing) has been successfully used to investigate population structure. This project aims to investigate the antimicrobial susceptibility profile and the presence of methicillin resistance genes in *S. aureus* isolated from bovine mastitis, in addition to understanding the genetic diversity, identifying possible new profiles and knowing the distribution of these isolates. The results obtained to the present were the absence of methicillin resistance in the antibiogram, confirmed by the absence of *mecA* gene, and the low prevalence of multidrug resistance to antimicrobials. Even though resistance to at least one antibiotic was present in more than 58,74% of the isolates (242/412), ampicillin resistance corresponds to 53.64% (221/412). Different *spa* types were determined, the three most frequent being t605 (57.45%), t002 (8.4%) and t127 (8.13%). There was no association between the *spa* type distribution and the variables of year, state, municipality, farm, and antibiotic resistance profile analyzed. This is the first study that uses *spa* Typing to evaluate a collection as temporarily diverse and representative of the region studied in 22 years. Therefore, it is expected that the results of this study, by allowing comparison of the profile of *S. aureus* from different sources (animals and property), will contribute to the understanding of the epidemiological aspects involved in the transmission of the pathogen and the role of hosts as reservoirs for pathogenic strains. Such understanding is essential for the prevention, control and treatment of bovine mastitis.

Key words: *Staphylococcus aureus*, mastitis, antibiogram, *spa* Typing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel com as bandas específicas compatíveis com <i>Staphylococcus aureus</i> (359pb), CP: controle positivo, CN: controle negativo, CE: controle da extração. <i>Ladder</i> de 50pb.....	43
Figura 2 - Antibiograma pelo método de disco difusão. Destaque para sensibilidade à OXA (diâmetro do halo $\geq$ 13mm) e CFO (diâmetro do halo $\geq$ 22)	46
Figura 3 - Gel com os resultados de ausência do gene de resistência à meticilina, <i>mecA</i> . CP: controle positivo (163pb), CN: controle negativo, CE: controle da extração. <i>Ladder</i> de 100pb.....	48
Figura 4 - Resultado da amplificação da região x do gene da proteína A. <i>Ladder</i> de 100pb.....	49
Figura 5 - Dendrograma agrupando pela metodologia de Ward os perfis de multirresistência de <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, com os respectivos dados de genótipo, ano de isolamento, fazenda, município e estado.....	59
Figura 6 - Dendrograma agrupando pela metodologia UPGMA as sucessões de repetição das 6 fazendas com maior número de amostras coletadas, com os respectivos dados de ano de isolamento, fazenda, município e estado.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados para a identificação do gene da termonuclease <i>nuc</i> de <i>S. aureus</i>	36
Tabela 2 - Primers utilizados para a identificação do gene de resistência a meticilina <i>mecA</i>	38
Tabela 3 - Primers utilizados no <i>spa</i> Typing.....	39
Tabela 4 - Perfil de resistência aos antibióticos testados ao longo do tempo e frequência de perfis intermediários e resistentes (I+R) no período de 1994 até 2016.....	45
Tabela 5 - Isolados que apresentaram perfil de multirresistência aos antibióticos testados considerando a definição de de Magiorakos et al., 2011 ou Shwarz et al., 2010.....	47
Tabela 6 - Frequência dos <i>spa</i> tipos obtidos.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de intermediários e resistentes ao longo do tempo.....	44
Gráfico 2 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 369 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com os genótipos identificados	52
Gráfico 3 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 369 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com o ano de isolamento.....	53
Gráfico 4 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 369 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com o estado de origem	54
Gráfico 5 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 369 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com o município de origem.....	55
Gráfico 6 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 369 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com a fazenda de origem.....	56
Gráfico 7 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 83 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com o genótipo identificado.....	62
Gráfico 8 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 83 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com o município de origem.....	62
Gráfico 9 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 83 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com a fazenda de origem	63
Gráfico 10 - <i>Minimal spanning tree</i> (MST) de 83 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina analisadas por <i>spa</i> Typing de acordo com o ano de isolamento.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC – amoxicilina/ácido clavulânico
AMP – ampicilina
ATCC – *American Type Culture Collection*
BHI – *Brain Heart Infusion*
CA-MRSA – *community associated MRSA*
CC – complexo clonal
CCS – Contagem de Células Somáticas
CFL –cefalotina
CFO – cefoxitina
CIP – ciprofloxacina
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CTF – ceftiofour
DNA – *Deoxyribonucleic acid*
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENO – enrofloxacin
ERI – eritromicina
GEN – gentamicina
HA-MRSA – *hospital associated MRSA*
IgG – imunoglobulina G
IN – Instrução Normativa
LA-MRSA – *livestock associated MRSA*
mecA – principal gene responsável pela resistência à meticilina
MDR –*multi drug resistant*
MRSA – *methicillin resistant Staphylococcus aureus*
MRNAS –*methicillin-resistant non-aureus staphylococci*)
MSSA – *methicillin susceptible Staphylococcus aureus*
MST – *minimum spanning trees*
NEO – neomicina
OXA – oxacilina
PBP – *penicillin binding protein*
PNM – penicilina g/novobiocina
RBQL – Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite
RNA – *Ribonucleic acid*
SCC – *staphylococcal chromosomal cassette*
SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo
spa – gene da proteína A do gênero *Staphylococcus spp.*
SSM –*slipped strand mispairing*
ST– *sequence type*
SUT – trimetoprima/ sulfametoxazol
TET – tetraciclina
VNTR – *variable number tandem repeats*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	AMOSTRAS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.2	PROCEDIMENTO APÓS O RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS	35
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA	35
4.4	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.5	ANTIBIOGRAMA	37
4.6	PESQUISA DO GENE DE RESISTÊNCIA À METICILINA.....	38
4.7	<i>spa</i> Typing	38
4.7.1	Amplificação da região repetida da proteína A do <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.7.2	Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA	39
4.7.3	Edição de sequências	40
4.7.4	Análise de sequências	41
5	RESULTADOS.....	43
5.1	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA de <i>S. aureus</i>	43
5.2.	ANTIBIOGRAMA	43
5.3	PESQUISA DO GENE DE RESISTÊNCIA À METICILINA.....	48
5.4.	<i>spa</i> Typing	48
5.4.1.	Amplificação da região repetida da proteína A do <i>Staphylococcus aureus</i>	48
5.4.2	Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA	49
5.4.3	Edição de sequências	49
5.4.4	Análise de sequências	50
6.	DISCUSSÃO.....	64
7.	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A	88
	APÊNDICE B.....	89

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma enfermidade de importância em diversas áreas da medicina veterinária como, por exemplo, clínica de ruminantes, doenças infecciosas, farmacologia, tecnologia de produtos de origem animal e inspeção de alimentos. A importância econômica desta doença na pecuária leiteira é inegável e o maior impacto, tanto na saúde animal quanto na economia, é causado por *Staphylococcus aureus*, um dos principais agentes causadores da mastite contagiosa.

Tal bactéria é comensal de diversas espécies de mamíferos, além de ser encontrada no ambiente. É uma bactéria ubíqua, por vezes não devidamente relacionada às diversas enfermidades que pode causar, as quais vão desde infecções de pele até sepse. Fatores como virulência e estado imune do hospedeiro determinam que portadores saudáveis da bactéria se tornem doentes. Outros fatores como a resistência a antimicrobianos podem dificultar o tratamento e serem relevantes no âmbito da saúde pública.

O *S. aureus* frequentemente presente na pele e narina de seres humanos hígidos pode se tornar um patógeno oportunista e estes podem se infectar com estirpes tipicamente relacionadas aos bovinos. A maior preocupação em relação à saúde humana existe em torno de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina ou MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), principal responsável por infecções hospitalares e também causa de alta mortalidade fora do ambiente nosocomial.

A importância de *Staphylococcus aureus* no cenário das infecções mamárias em bovinos e na saúde pública explica o grande interesse nos estudos sobre a diversidade genética deste micro-organismo. A aplicação de técnicas moleculares tem contribuído significativamente para a identificação, caracterização e definição da distribuição de isolados de *S. aureus*. No entanto, é importante aliar tal informação a características fenotípicas de modo a determinar quais delas podem estar relacionadas às diferenças genotípicas.

Assim é necessário caracterizar não só a diversidade molecular de *S. aureus* em uma região como também de caracterizar fenotipicamente os isolados. A descrição do perfil de resistência é uma forma de fazer isso. Além de haver o interesse, sobretudo, de investigar a presença de MRSA nos isolados.

A caracterização genotípica foi realizada por meio do *spa* Typing. A técnica foi escolhida por suas vantagens metodológicas, além de ser a elegida por órgãos de vigilância para o estudo de surtos de MRSA, característica fenotípica investigada neste estudo. A vantagem de gerar resultados livres de ambiguidade, facilmente comparáveis e de alta qualidade; permite

inferências sobre a origem, disseminação e relações evolutivas em relação às estirpes obtidas em outras regiões e países ao longo do tempo.

A presente pesquisa tem como ponto de partida a maior coleção de bactérias de interesse para o gado leiteiro do país e é o primeiro estudo com amostras representativas de mais de 20 anos. Diferenciar os isolados de *S. aureus* contidos nessa coleção não só esclarece o cenário epidemiológico da região estudada, como também permite que questões biológicas sejam futuramente abordadas sobre os mecanismos de resistência, evolução molecular e patogênese.

Logo, o objetivo do estudo ao descrever características fenotípicas e genotípicas de tal amostragem, é gerar maior compreensão da distribuição do patógeno na região e hipóteses a serem esclarecidas. E, por meio do conhecimento futuro dessas questões biológicas, auxiliar na prevenção e tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*, bem como no planejamento de estratégias a serem adotadas para seu controle.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos e a frequência dos genes para resistência à meticilina nos isolados de *S. aureus*;

Caracterizar genotipicamente os isolados de *S. aureus* pela técnica de *spa* Typing;

Utilizar os perfis alélicos obtidos para realizar a análise filogenética intraespecífica dos isolados de *S. aureus* provenientes de leite bovino, além de determinar diversidade genética destes no espaço e tempo estudados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MASTITE

A mastite é considerada a enfermidade de maior impacto na pecuária leiteira mundial. Embora as atuais práticas de manejo como a redução à exposição por patógenos ambientais e higiene aplicada na ordenha tenham contribuído para reduzir a ocorrência da mastite, a infecção intramamária ainda representa um grande desafio na cadeia produtiva do leite. Essa enfermidade pode ser dividida em clínica e subclínica. A mastite clínica é a que além da inflamação de pelo menos um quarto mamário, existe visível mudança na aparência do leite em virtude da resposta inflamatória à infecção e na mastite subclínica apesar da infecção estar presente não existem mudanças visíveis no estado do animal e no leite (BLOWEY; EDMONSON, 2010).

É possível que a mastite clínica se apresente na forma aguda com sinais severos e repentinos ou na forma crônica com sinais que persistem por um longo tempo de forma mais branda. Tanto a forma clínica quanto a subclínica da doença podem ainda ser divididas em contagiosa e ambiental, dependendo do organismo que está causando a infecção da glândula mamária. Os micro-organismos contagiosos podem ter como origem a ordenhadeira e ordenhadores. Os ambientais são os que normalmente não infectam a glândula mamária, mas podem o fazer quando o ambiente, os tetos e o úbere ou lesões nestes, e a ordenhadeira estão contaminados (GEORGE et al., 2007).

As medidas de controle, cuja base é a mesma desde a década de 60, visam a redução da incidência da mastite contagiosa com o estabelecimento de cinco principais pontos de controle: tratar casos clínicos; desinfetar tetos antes e após a ordenha; terapia da vaca seca após a lactação; abate de casos crônicos; e manutenção regular da ordenha mecânica (NEAVE et al. 1969, apud BLOWEY; EDMONSON, 2010). Tais medidas tiveram sucesso em reduzir a contagem das células somáticas (CCS), presentes no leite em virtude da resposta inflamatória aos micro-organismos. Já a mastite ambiental aumentou desde o estabelecimento das medidas de controle, pois apesar da melhora na higiene e no ambiente das vacas esta não acompanhou o aumento do rebanho e da produção de leite (BLOWEY; EDMONSON, 2010). E de acordo com o proposto por Scherpenzeel et al. (2016) as mesmas medidas devem ser adotadas atualmente, a não ser pela terapia de vaca seca que para evitar o surgimento de resistência bacteriana só deve ser utilizada seletivamente, apenas em casos de mastite clínica, e não em todos os quartos mamários de todas as vacas leiteiras do rebanho.

Dentre os principais agentes responsáveis pela mastite contagiosa, o *S. aureus* se sobressai por ser na maioria das vezes responsável por casos de mastite subclínica e mastite

crônica recorrentes (GURJAR et al., 2012) de difícil controle. Outros patógenos implicados são *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma spp.* Enquanto entre os organismos causadores de mastite ambiental mais frequentes estão o *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus* coagulase negativos e coliformes (GEORGE et al., 2007; GURJAR et al., 2012). Todos geram aumento da CCS, parâmetro avaliado laboratorialmente.

No Brasil, os dados dos laboratórios que compõem a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL), têm demonstrado que a CCS continua elevada em diferentes regiões do país (ESTEVES et al., 2010). Em 2009 a RBQL verificou que em 1.343.704 de amostras (21,7%) de leite apresentaram-se fora dos padrões legais (> 750.000 cel/mL, IN 62) nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e 51% possuíam CCS acima de 400.000 cel/mL, padrão legal que entrará em vigor a partir de 01 de julho de 2016, nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (BRASIL, 2011). Patógenos, entre os quais se destaca o *S. aureus*, levam ao significativo aumento da celularidade do leite (G.N. SOUZA, J.R.F. BRITO, E.C. MOREIRA, M.A.V.P. BRITO, 2009) e podem comprometer o programa nacional para melhoria da qualidade de leite estabelecido pelo IN 51 (BRASIL, 2002), e posteriormente pela IN 62 (BRASIL, 2011).

3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria do grupo dos cocos que em ágar sangue produz colônias opacas e brilhantes de coloração branco acinzentada e hemólise incompleta, podendo apresentar pigmento amarelado. É ainda Gram, catalase e coagulase-positiva; anaeróbica facultativa; com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro; não esporulada; geralmente sem cápsula; e imóvel. Essa bactéria pode apresentar-se na forma de cocos isolados, pareados, em cadeias curtas, ou agrupados em formato de cacho de uvas (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2005). Está entre os agentes mais frequentemente isolados de casos de mastite tanto no Brasil (LANGONI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; CASTELANI et al., 2013) quanto no mundo (FERGUSON et al., 2007; DUFOUR et al., 2012).

A espécie ocupa um papel importante na etiologia das infecções intramamárias do gado leiteiro, sendo considerada um patógeno primário e o agente mais usualmente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas (BRITO et al., 1999). A prevalência de *S. aureus* é, porém, apontada por outros autores como menor que a de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) isolados a partir do leite, no entanto a patogenicidade dos SCN é discutida atualmente. Sua descrição varia desde a serem micro-organismos protetores ou indiferentes para a saúde do

úbere, até serem causa de mastite subclínica e mastite clínica branda (DE VLIEGHER et al., 2012).

Em um estudo realizado por Rall et al. (2014), a prevalência para o gênero *Staphylococcus spp.* foi de 22,5% em amostras provenientes de vacas saudáveis e 27,4% de vacas com mastite. Entre as espécies isoladas, *S. aureus* foi a única a apresentar diferença significativa entre esses dois grupos, sendo mais prevalente em vacas com mastite (17,5%) do que em vacas saudáveis (1,6%). Esse estudo foi conduzido em 11 propriedades leiteiras do estado de São Paulo. Em diferentes regiões do país e do mundo e até entre rebanhos a prevalência varia, pois depende do sistema de manejo adotado (DE VLIEGHER et al., 2012).

Além de sua prevalência, a importância de *S. aureus* existe por ser um dos agentes de mais difícil controle (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006). Uma vez estabelecido no rebanho, é de difícil eliminação, pois gera infecções crônicas, pode apresentar resistência aos antibióticos e existe uma dificuldade em realizar o diagnóstico e tipagem do micro-organismo (GEORGE et al., 2007). Associa-se a isto, o fato que a resposta à terapia antimicrobiana não tem apresentado resultados satisfatórios nas infecções intramamárias por este agente, mesmo quando a bactéria é sensível ao antimicrobiano *in vitro*, tornando a prática economicamente inviável (ZAFALON et al., 2007).

A importância do *S. aureus* também é denotada pela epidemiologia das doenças veiculadas ao homem por alimentos, frequentemente leite e derivados, devido ao seu potencial de produção de enterotoxinas causadoras de gastroenterites (NORMANNO et al., 2007; VERAS et al., 2008), sendo deste modo um importante patógeno dos seres humanos. Nos Estados Unidos da América, *S. aureus* é o principal responsável por infecções hospitalares (NNIS, 2004; (SIEVERT et al., 2013), que incluem pneumonia, infecções de sítio cirúrgico e sangue, que podem gerar complicações como endocardite, osteomielite e choque séptico. Possui tropismo por diversos tecidos devido à sua grande variedade de fatores de virulência, relacionados à patogênese e adquiridos muitas vezes por elementos genéticos móveis (LOWY, 1998). Dentre as infecções hospitalares causadas por organismos resistentes a antibióticos o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) é a causa mais frequente (SIEVERT et al., 2013).

3.3 RESISTÊNCIA À METICILINA

A importância da mastite por *S. aureus* sob o ponto de vista de saúde pública não pode ser menosprezada. A contínua importância deste patógeno se deve à sua propensão a se tornar resistente aos antimicrobianos, com especial atenção para a resistência à meticilina (WEESE;

VAN DUIJKEREN, 2010). Uma das razões para o desenvolvimento da Penicilina G foi o combate a esse micro-organismo, mas pouco tempo após a introdução do seu uso, foi encontrada produção generalizada de penicilinase pela espécie. Com o desenvolvimento da meticilina e outros agentes estáveis a penicilinase, como a oxacilina, foi possível tratar *S. aureus* resistente à penicilina. Mas não demorou até que a resistência à meticilina e às outras drogas da classe fosse relatada (COLLIGNON; COURVALIN; AIDARA-KANE, 2008).

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, conhecidos pela sigla em inglês, MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) foram inicialmente associados às infecções hospitalares, na década de 60, e por isso denominados hospital-associated MRSA (HA-MRSA). Posteriormente, nos anos 90, surgiram infecções em comunidades, os community-associated MRSA (CA-MRSA). Além dos casos em que a origem das infecções era pessoas com exposição a instituições de saúde, ocorreu uma mudança na epidemiologia pela emergência de MRSA em comunidades de indivíduos saudáveis, sem uma relação com o ambiente hospitalar como fator de risco (CHAMBERS, 2001). E um terceiro grupo epidemiológico recentemente descrito na Europa e já disseminado mundialmente, são os *S. aureus* resistentes à meticilina provenientes dos animais de produção de alimentos, inclusive bovinos, os *livestock-associated MRSA* (LA-MRSA) (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014).

O principal gene responsável pela resistência à meticilina, descrito por Utsui e Yokota (1985) há mais de 30 anos, encontra-se em um elemento genético móvel da célula bacteriana: o *staphylococcal cromossomal cassette* (SCCmec) e codifica para uma proteína modificada: a *penicillin binding protein* PBP2' ou PBP2a, com baixa afinidade aos antibióticos beta-lactâmicos como as penicilinas e cefalosporinas (CHAMBERS, 1997). Não é o único responsável pela resistência, sendo que um homólogo do gene *mecA*, o gene *mecC*, já foi descrito (PATERSON et al., 2012).

A descoberta do gene *mecC*, que antes de ser renomeado por Paterson et al. (2012) era chamado de *mecA*_{LGA251}, foi em um estudo epidemiológico de mastite bovina no Reino Unido (GARCIA ALVAREZ et al., 2011a). O isolado foi coletado em 2007, no entanto, um estudo retrospectivo na Dinamarca e Reino Unido mostrou que o gene já estava presente na população de bovinos e humanos há muito tempo, sendo que o isolado mais antigo conhecido foi obtido a partir de sangue de um ser humano em 1975 (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011b).

Independentemente do gene responsável, em humanos tem sido descrito o aumento no número de infecções e da mortalidade por MRSA, sendo o número de mortes similar à soma das mortes causadas pela tuberculose, hepatites virais e síndrome da imunodeficiência humana

adquirida (BOUCHER; COREY, 2008). Nos Estados Unidos da América, o *S. aureus* é uma das principais causas de mortalidade em humanos, levando a mais de 18.000 mortes por ano e aproximadamente 290.000 hospitalizações, e ainda quase 12 milhões de visitas médicas e tratamentos (KLEVENS et al., 2007; ZECCONI; SCALI, 2013). Na Europa, ocorreram aproximadamente 100.000 episódios de bacteremia por *S. aureus* por ano em 2002 (COLLIGNON; COURVALIN; AIDARA-KANE, 2008). Dessas o risco de mortalidade pelas infecções por MRSA é maior que nas infecções que não apresentam resistência à meticilina, de 34%, enquanto a pelas infecções por MSSA é de 25% (COSGROVE et al., 2003).

Atualmente MRSA isolado de mastite bovina já foi descrito em vários países da Europa e já se disseminou para diversas partes do globo. Na verdade, a primeira descrição de MRSA em animais, em 1972 foi em uma vaca (DEVRIESE et al., 1975) no Reino Unido. Desde então, baixa prevalência de MRSA e gado leiteiro tem sido descrita (LEE, 2003; KWON et al., 2005; JUHÁSZ-KASZANYVITSKY et al., 2007; MOON et al., 2007). MRSA parece não ser um patógeno de importância para a mastite bovina o que é uma surpresa para um patógeno detectado a tanto tempo e que pode ser transmitido pelo contato próximo de humanos com o gado leiteiro (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010). O destaque em relação a esse grupo epidemiológico de isolados provenientes de animais de produção, é da linhagem CC398 que já foi isolada, além do primeiro relato em suínos (VOSS et al., 2005) em diversas espécies de animais produtores de alimentos.

No Brasil a detecção do gene *mecA* é pouco reportada e ocorreu apenas em dois estudos. O primeiro, no estado de São Paulo, detectou a presença de MRSA carreando o gene *mecA* em 4 das 36 vacas com mastite de um rebanho de 100 vacas, ou seja, em 11,1% das vacas com mastite e 4% de todas as vacas do rebanho (SILVA et al., 2014). O segundo estudo foi realizado no estado da Paraíba detectou a presença do gene *mecA* em 22 das 64 vacas com mastite por *S. aureus*, ou seja, 32,8% de MRSA no total de amostras de *S. aureus* coletada de 15 fazendas no nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2016).

O potencial zoonótico dos LA-MRSA não está bem esclarecido, no entanto, existem evidências de transmissão de isolados de gado leiteiro aos seres humanos (PANTOSTI, 2012; SULEIMAN et al., 2012). Há grande preocupação, em particular na Europa, com o LA-MRSA do complexo clonal CC398. Suínos são os principais reservatórios desse clone, antes do relato de 2005 considerado raro. Mas este tipo foi também encontrado em novilhos, frango, cavalos e com menor prevalência em gado de leite, animais de companhia e animais silvestres (BAL et al., 2016). Entretanto na Ásia o CC9 é predominante em animais de produção. Outras linhagens

como o CC1, CC5, CC97, CC121, CC130 e o ST425 e ST433 também estão relacionadas a animais de produção (WEINERT et al., 2012; FELTRIN et al., 2016).

A disseminação dos genes responsáveis pela resistência à meticilina, cuja disposição é cromossomal, não é tão simples quanto a disseminação dos genes plasmidiais que codificam para as penicilinas (CHAMBERS, 2001). Mas embora a transferência horizontal dos *SCCmec* seja rara ela é possível e foi descrita. Acredita-se que os MRSA existentes atualmente diversificaram-se a partir da aquisição desse elemento genético por MSSA com posterior integração destes ao seu cromossomo, sendo que onze tipos de *SCCmec* já foram descritos (*SCCmec* I–XI) (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000) e ainda que os CA-MRSA tenham se originado da transferência horizontal de *SCCmec* de outras espécies do gênero *Staphylococcus spp.*, que por serem menores que os demais tipos de *SCCmec* existentes nos HA-MRSA disseminaram-se de maneira explosiva (HIRAMATSU et al., 2013).

Além da grande relevância de MRSA em diversas espécies de animais produtores de alimentos e na saúde humana, existe uma crescente preocupação com a emergência desse patógeno em animais de companhia, animais silvestres, e ainda no produto final, ou seja, no alimento. Há ainda uma preocupação de que colonização ou infecção por MRSA seja uma doença ocupacional para médicos veterinários e animais terapêuticos (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010).

Em relação aos animais de companhia, diferente dos LA-MRSA, a emergência da resistência nestes animais pode ter origem humana. Enquanto MRSA de animais de produção parece ter evoluído de maneira independente em espécies de produção de alimentos, havendo posterior disseminação e adaptação ao hospedeiro; a caracterização molecular de MRSA isolado de animais de companhia indica possível transmissão entre pessoas e *pets* que vivem juntos, uma vez que frequentemente são encontrados em cães linhagens comumente presentes em humanos. Existem ainda relatos da transmissão de HA-MRSA de pessoas hospitalizadas para os cães e outras espécies, como parte de programas de zooterapia (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010).

Já nos alimentos, MRSA tem sido encontrado em uma alta porcentagem das amostras de carne testadas, havendo possibilidade de transmissão via cadeia alimentar. Contudo, a carne não parece ser uma forma importante de transmissão ou então a distribuição geoespacial seria mais semelhante à dos casos relacionados ao contato direto com a criação de suínos. Outra evidência disso é a baixa incidência em funcionários de matadouros (LARSEN et al., 2015), sendo mais provável que a rota contrária ocorra e linhagens associadas ao ser humano sejam encontradas em produtos de origem animal (BASANISI et al., 2017).

O fator de risco mais importante da transmissão de LA-MRSA para humanos é o ocupacional, ou seja, o contato com animais positivos, especialmente os suínos, para MRSA que é mais frequente em profissionais que trabalham diretamente com os animais colonizados. No entanto, baseando-se no conhecimento existente sobre *S. aureus* é possível que a posterior transmissão humano-humano tenha uma contribuição maior na disseminação (LEKKERKERK et al., 2015). Assim, medidas para combater a transmissão em reservatórios animais em expansão são urgentes (BAL et al., 2016).

É possível que no futuro a divisão nos três grupos epidemiológicos tenha relevância limitada, uma vez que clones têm sido transmitidos de uma espécie hospedeira para outra com facilidade. Mesmo quando são estão melhores adaptados a um hospedeiro como é o caso dos LA-MRSA, tem obtido sucesso em voltar a colonizar a população humana de onde emergiu. Pessoas com contato direto com animais de produção, como fazendeiros, veterinários e funcionários de matadouro são frequentemente colonizados ou apresentam infecções por LA-MRSA. A significativa sobreposição existe também entre os clones de HA-MRSA e CA-MRSA desde que os serviços de saúde têm sido cada vez mais fornecidos em casa, além de ser difícil encontrar comunidades sem nenhuma exposição direta ou indireta ao ambiente hospitalar (BAL et al., 2016).

No entanto, mais estudos são necessários para compreender a transmissão entre espécies e o risco que cada uma impõe em relação a saúde pública, especialmente estudos da distribuição molecular dos isolados (PANTOSTI, 2012). Afinal, a falta de estudos que esclareçam o risco de transmissão e relevância dos animais como reservatórios de MRSA, pode levar a conclusões prematuras.

3.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS DEMAIS ANTIMICROBIANOS

É comum que HA-MRSA apresentem resistência a múltiplos antimicrobianos, limitando ainda mais o tratamento. Já os casos de MRSA recentemente descritos, que não estiveram associados a contato direto ou indireto com instituições de saúde, frequentemente apresentam resistência apenas para a classe dos beta-lactâmicos (ADCOCK et al., 1998; HEROLD et al., 1998). Esse perfil de resistência trouxe mais uma prova de que a origem provável desses CA-MRSA foi um reservatório na própria comunidade, com menor pressão seletiva que nos hospitais, assim o fenótipo de multirresistência teria menor vantagem adaptativa. Além da evidência fornecida pela tipagem que mostrou que as que as linhagens das duas origens eram distintas (CHAMBERS, 2001).

Os genes *mecA* e *mecC* não são os únicos responsáveis pela resistência aos beta-lactâmicos. Ainda que sejam os responsáveis por conferir resistência aos membros dessa classe que não são degradados por penicilinas, como a meticilina e as cefalosporinas, o gene *blaZ* é o responsável por resistência aos demais beta-lactâmicos, como a penicilina e a ampicilina. A maioria dos *S.aureus* isolados de bovinos que carrega o gene *blaZ* o faz no seu cromossomo, diferente do que ocorre nos isolados proveniente dos seres humanos, nos quais o gene *blaZ* é principalmente plasmidial (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006).

Entre outras classes de antibióticos os respectivos genes frequentemente responsáveis pelo fenótipo de resistência estão: os macrolídeos (*msrA*, *msrB*, *ermA*, *ermB*, *ermC*), as tetraciclina (*tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*), os aminoglicosídeos (*aacA-aphD*, *aadD*, *aphA*, *aadE*, *sat4*), e o trimetoprim (*dfrA*, *dfrB*, *dfrG*, *dfrK*). Além das quinolonas cuja resistência é adquirida por uma mutação no gene cromossomal da DNA girase (*gyrA* and *gyrB*) ou da topoisomerase IV (*grlA* and *grlB*) ou do promotor do transportador NorA (*PnorA*) (ARGUDÍN et al., 2014; BRENNAN et al., 2016). Muitos desses genes já foram descritos em plasmídeos e, assim, podem sofrer transferência horizontal como: *tetK*, *tetL*, *aacA-aphD*, *aadD*, *aphA*, *dfrA*, *dfrG* e *dfrK* (WEIGEL, 2003; KADLEC et al., 2012; ARGUDÍN et al., 2014; NURJADI et al., 2014; GHANBARI et al., 2016).

O fenótipo conferido por esses genes tem sido descrito no mundo todo por meio da realização de antibiogramas pelas técnicas de disco difusão ou microdiluição. Varia com a distribuição geográfica, mas alta incidência de resistência a penicilinas naturais ou semissintéticas, frequentemente utilizadas no tratamento da mastite, está sempre presente (OLIVER; MURINDA, 2012; RUEGG et al., 2015; THOMAS et al., 2015; WANG et al., 2015; BEN SAID et al., 2016; MEHMETI et al., 2016).

No Brasil não existem testes padronizados, ou seja, um padrão na utilização dos antibióticos a serem utilizados no antibiograma, nem foi realizada uma adequada revisão sistemática dos perfis de resistência obtidos até o momento. Com os dados existentes é possível afirmar que há destaque para a alta porcentagem de resistência às penicilinas. Em Pernambuco e na Bahia, Krewer et al. (2015) encontraram em *Staphylococcus spp.* maior resistência a amoxicilina (67,4%) seguida pela ampicilina (67%), sendo ambas da classe das penicilinas. Santiago-Neto et al. (2014), no Rio Grande do Sul, encontraram em estafilococos coagulase positiva maior resistência aos macrolídeos seguida pelas penicilinas. Robles et al. (2014) identificaram 83% de resistência a penicilina em *S. aureus* isolado de mastite bovina de 2009 até 2012, no estado de São Paulo. No estado de Goiás houve resistência de 100% para penicilina e 3,2% para gentamicina (FONTANA et al., 2010). Segundo Acosta et al (2016), os maiores

índices de resistência nos micro-organismos causadores de mastites em ruminantes são para penicilina, ampicilina, amoxicilina e neomicina, com destaque para as bactérias do gênero *Staphylococcus spp.*

Na América do Norte e no Brasil, estudos retrospectivos do perfil de resistência de isolados provenientes de mastite bovina registrados por laboratórios de rotina mostraram que não houve muita variação do perfil de resistência de *S. aureus* ao longo do tempo. No caso do Brasil, 20 anos foram estudados (KOWALSKI et al., 2015) e no caso dos EUA 9 anos (LINDEMAN et al., 2013). Mas de acordo com Kowalski et al. (2015) foi possível perceber diminuição estatística da resistência a penicilinas ao longo do tempo para *Staphylococcus spp.* Assim como Oliver, Murinda e Jarayao (2011) que também relataram a redução da resistência a ampicilina e eritromicina ao longo do tempo, para o patógeno *S. aureus*.

A resistência aos antimicrobianos deve ser considerada um fenômeno em evolução (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). E por esse motivo é essencial que seja monitorada constantemente para otimizar o uso dos antibióticos. No caso da mastite, o impacto do tratamento para a saúde animal e humana, além da segurança dos alimentos é uma preocupação antiga (TAYLOR, 1999). Muitos estudos foram realizados e não suportam que a emergência e disseminação de resistência entre os patógenos isolados de gado leiteiro ocorra, mesmo que muitos dos antibióticos utilizados na indústria leiteira tem sido os mesmos por décadas. (OLIVER; MURINDA; JAYARAO, 2011).

No entanto, é claro que o uso de antibióticos em vacas leiteiras adultas e em outros animais de produção de alimentos pode contribuir para o surgimento de resistência antimicrobiana, fazendo desta uma questão a ser estudada. A identificação de fatores de risco associados com a resistência antimicrobiana é uma informação que pode ajudar a elaborar recomendações práticas para o uso prudente de antimicrobianos (BEURON et al., 2014).

3.5 MÉTODOS DE TIPAGEM

A caracterização fenotípica de isolados de *S. aureus* é frequentemente realizada por meio do perfil de resistência dos isolados (MULLIGAN; MASLOW; ARBEIT, 1993). Outra maneira clássica de caracterizar essa espécie de acordo com a expressão de fenótipo foi a descrita por Devriese et al. (1984), a qual é um método de biotipagem baseado em 4 testes fenotípicos: produção de staphylokinase, beta-hemolisina, coagulação de plasma bovino e crescimento em cristal violeta. A combinação destes testes resulta em 4 biotipos hospedeiro-específicos: humano, ave, bovino e ovino, além de biótipos sem hospedeiro definido. Embora existam limitações envolvidas em sistemas de caracterização fenotípica, como fatores externos

diferentes regulando a expressão do fenótipo de bactérias da mesma linhagem ou a grande quantidade de bactérias não tipáveis por não expressar o fenótipo.

O desenvolvimento de sistemas de genotipagem, especialmente após a implementação ampla do sequenciamento *high throughput* (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977), tem contribuído sobremaneira para o rastreamento e compreensão da disseminação de diversos agentes infecciosos, especialmente bactérias (JOO et al., 2001; RABELLO et al., 2005, 2007). Tais sistemas baseiam-se nas observações de que isolados da mesma espécie podem apresentar ampla variabilidade no DNA, decorrente de eventos genéticos como mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações (TENOVER et al., 1997).

Embora métodos fenotípicos utilizados anteriormente à tipagem molecular, como morfologia das colônias, sorologia, tipagem de fagos, produção de toxinas e perfil de resistência aos antimicrobianos, tenham sido úteis; eles não possuem o poder discriminatório dos métodos baseados no DNA, os quais incluem a análise do perfil de plasmídeos, do perfil eletroforético após restrição enzimática de DNA cromossomal e tipagem por PCR (MATHEMA; MEDIAVILLA; KREISWIRTH, 2008).

Características da espécie e da população a serem estudadas com tais técnicas moleculares são essenciais para a escolha do sistema de tipagem para o estudo. Uma das características que precisa ser considerada é o quão clonal é a espécie, ou seja, em que medida a recombinação homóloga contribui para a emergência de novos clones e para a diversificação destes (FEIL et al., 2003). Essa diversidade intraespecífica é a base para a escolha de um marcador molecular com taxa de polimorfismo adequada. A escolha também dependerá se o estudo pretende avaliar microvariação, como no caso de uma investigação de surto, ou macrovariação como é o caso de estudos filogenéticos e análises baseadas em população (KOREEN et al., 2004).

Apenas recentemente Feil et al. (2003) estabeleceu que *Staphylococcus aureus* possui uma população essencialmente clonal, cujas variações se devem principalmente a eventos mutacionais e raramente a eventos de recombinação. A característica estudada para calcular e avaliar como uma população se diversifica é denominada desequilíbrio de ligação ou *linkage disequilibrium*, que de maneira simplificada é a associação não randômica de alelos entre dois ou mais loci gênicos. Essa associação é influenciada por diversos fatores que são equacionados de modo a obter um valor para a população a ser estudada (SLATKIN, 2008). No caso de *S. aureus* foi possível determinar que a velocidade de ocorrência de eventos genéticos determina alto desequilíbrio de ligação na espécie, tornando possível o uso de um único locus para tipagem (KOREEN et al., 2004), já que a recombinação homóloga, evento genético que torna necessário

o uso de múltiplos loci conservados para diminuir o efeito desse evento genético, não é esperada na espécie (COOPER; FEIL, 2006).

Antes da diversidade da população ser conhecida, dois métodos amplamente aceitos para a tipagem de bactérias já eram utilizados para estudar a distribuição e diversidade de *S. aureus*. Esses métodos são o *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e o *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE); sendo o primeiro utilizado para estudos de longo prazo ou da epidemiologia global da população e o segundo para estudo de surtos ou da epidemiologia local do patógeno (MATHEMA; MEDIAVILLA; KREISWIRTH, 2008). Para estudos como os primeiros em que é interessante verificar variações na distribuição geográfica, frequência e propriedades de virulência e resistência de certas linhagens; o marcador deve acumular variação relativamente devagar. Enquanto em estudos nos quais a distribuição geográfica e temporal é limitada, o interessante é ter um marcador que acumule variação rapidamente. Não havia sido estabelecido até o trabalho de KOREEN et al. (2004) um marcador que servisse a ambos propósitos, podendo indexar tanto macro quanto microvariação genética.

O PFGE, muito utilizado para tipagem de *S. aureus*, é considerado o padrão ouro para surtos de MRSA (STROMMENDER et al., 2006), e é a técnica mais aceita em geral para genotipagem bacteriana. Suas vantagens são ter aplicação à todas as espécies e ser altamente discriminatória. Consiste no uso de enzimas de restrição que cortam o cromossomo bacteriano de uma dada espécie de maneira infrequente, gerando um perfil de macrorestrição do cromossomo inteiro. Por eletroforese dos fragmentos e comparação dos perfis obtidos é possível determinar tipos dentro daquela população (MATHEMA, MEDIAVILLA e KREISWIRTH, 2008). Linhagens de *S. aureus* podem ser consideradas idênticas ou relacionadas de maneira próxima, e, portanto, podem ser agrupadas em famílias, quando existe diferença de até 6 bandas entre estas (KOREEN et al., 2004). Embora seja útil para discernir entre linhagens relacionadas recentemente ou de maneira próxima, tem habilidade limitada para relacionar isolados distantes geograficamente e temporalmente. Além desta limitação, possui as desvantagens de ser tecnicamente exigente e trabalhoso, e de não ser reprodutível e comparável entre laboratórios devido à subjetividade na interpretação e ao viés técnico, mesmo quando o protocolo foi padronizado (VAN BELKUM et al., 1998; HALLIN; FRIEDRICH; STRUELENS, 2009).

As limitações do PFGE levaram ao desenvolvimento de técnicas de genotipagem como o MLST, que é atualmente considerado o padrão ouro das técnicas com base em sequenciamento de DNA (MAIDEN et al., 1998). As vantagens da técnica são: reprodutibilidade, interpretação objetiva e inequívoca, além da produção de dados exportáveis

e acessíveis (HALLIN; FRIEDRICH; STRUELENS, 2009; CODY; BENNETT; MAIDEN, 2014). Consiste no sequenciamento de 7 loci altamente conservados com aproximadamente 500 pb cada e para cada locus com sequência nova é atribuído um número alélico. Assim, cada isolado recebe um perfil alélico de 7 dígitos também conhecido como ST ou *sequence type* e os STs podem ainda ser agrupados em complexos clonais (CC), quando um ST tem pelo menos 5 dos 7 alelos idênticos a pelo menos um outro ST do grupo. Como mudanças alélicas são tratadas como eventos genéticos únicos, é possível levar em conta a transferência horizontal de alelos e a recombinação (CODY; BENNETT; MAIDEN, 2014). Por esse motivo é utilizada principalmente em espécies altamente recombinogênicas como *Neisseria spp.* (FEIL; ENRIGHT; SPRATT, 2000). No entanto um número crescente de bancos de dados tem sido criado para diversas espécies, como, por exemplo, o PubMLST. Atualmente, *S. aureus* contem 3732 tipos e 31814 isolados em seu banco de dados e o MLST é aplicado nessa espécie para identificação de MRSA predominantes em epidemias, evolução da espécie e análises populacionais. (<http://pubmlst.org/saureus/>). As desvantagens da técnica são as de ser trabalhosa e cara em relação a metodologias focadas em um único locus (HALLIN; FRIEDRICH; STRUELENS, 2009).

Com o objetivo de gerar dados de maneira rápida e menos custosa - sem perder a reprodutibilidade, interpretação objetiva e inequívoca, e a produção de dados exportáveis e acessíveis do MLST - foram desenvolvidas técnicas cujo alvo é um locus único. Estas técnicas já vinham sendo utilizadas e estudos de epidemiologia local, sendo comparadas com a técnica de PFGE. No entanto a hipótese de Koreen et al. (2004) era de que o sequenciamento de um locus único, no caso o gene que codifica a proteína A de *S. aureus*, poderia ser utilizado também para detectar macrovariações em uma espécie com baixo nível de recombinação. A escolha informada do marcador genético que irá detectar de maneira adequada a variação intra-específica é fundamental. Características necessárias do marcador são ser um gene ubíquo na população sob consideração e estar presente em cópia única.

Embora genes altamente conservados sejam tipicamente considerados como os melhores candidatos a marcadores genéticos, a importância da função do gene para a detecção de variação intra-específica não está bem estudada e pouca variação pode resultar em baixa resolução da técnica de tipagem. Por outro lado, muita variação como a esperada em genes codificando proteínas com interação com o hospedeiro também seria inadequada. Contudo, contrariando expectativas, técnicas utilizando genes altamente variáveis, que codificam proteínas da parede celular de *S. aureus*, foram tão informativas quanto o MLST (COOPER; FEIL, 2006). Recentemente, a genotipagem baseada na análise de DNA repetitivo,

especificamente os VNTRs (variable number tandem repeats) tem sido utilizada por apresentar resolução tanto para estudos de longo quanto curto prazo. Dentre estes genes altamente variáveis utilizados com esse propósito está o *spa*, utilizado para a técnica de *spa* Typing (MATHEMA; MEDIAVILLA; KREISWIRTH, 2008).

3.6 *spa* Typing

O *spa* Typing é uma metodologia que consiste em analisar o polimorfismo da região X do gene *spa*, o qual codifica para a proteína A e está presente em todas as estirpes de *S. aureus*. Esta região é composta por um número variável de repetições de 21 a 27 pb flanqueadas por regiões bem conservadas, e possui diversidade atribuída à deleções e/ou duplicações das repetições ou mais raramente às mutações pontuais. Cada repetição se diferencia dos outros por pelo menos uma mutação pontual e um tipo pode ser diferenciado do outro pela ordem de suas repetições. (FRENAY, 1996; SHOPSIN et al, 1999).

A proteína A é um componente da parede celular que se liga ao peptídeoglicano por sua extremidade COOH. Sua função biológica não está totalmente esclarecida em relação a todos os hospedeiros. Acredita-se que essa proteína se ligue pela sua extremidade NH₂ ao fragmento Fc de IgG, funcionando como um fator de virulência ao inibir a fagocitose do *S. aureus* por linfócitos polimórficos (HALLIN; FRIEDRICH; STRUELENS, 2009). No entanto em alguns hospedeiros, como as vacas, não está clara qual seria a função da proteína A uma vez que esta não forma complexos insolúveis com a IgG presente no soro bovino (ATKINS et al., 2008).

Todavia, a função da proteína A parece não ser de importância para a tipagem uma vez a maioria das mudanças de nucleotídeos dentro das repetições do gene *spa* resulta em mutações sinônimas, indicando que este gene não sofre pressões de seleção externas, resultantes da interação da proteína com o hospedeiro ou ambiente externo (SHOPSIN et al., 1999; COOPER; FEIL, 2006). Assim a região X do gene *spa* é candidata para genotipagem pois tem variabilidade o suficiente para discernir entre as estirpes mas é estável o suficiente para agrupar estirpes relacionadas (SHOPSIN et al., 1999).

Para a escolha desse marcador foi necessário conhecer detalhadamente a estrutura do gene *spa*. Este possui quatro a cinco unidades de ligação à IgG, com 160 pb cada, em sua região N-terminal (FRENAY et al., 1996) e em sua região C-terminal, chamada de região X, possui um número variável de repetições de 24 pb em geral. A região X é dividida ainda em uma região constante, Xc, que codifica para ligação à parede celular e a região Xr com as repetições. A região Xr varia em tamanho de acordo com o número de repetições que pode ser de 2 a 16. A deleção e ou inserção de repetições ocorre frequentemente nessa região pelo mecanismo de

slipped strand mispairing (SSM) durante a replicação do DNA, no qual o desemparelhamento da fita molde com a fita nova, sem reparação posterior pela DNA polimerase, gera uma repetição a menos ou mais, se um loop for gerado na fita molde ou nova, respectivamente (HALLIN; FRIEDRICH; STRUELENS, 2009).

Essas repetições, consideradas minissatélites de DNA por possuírem de 10 até 100 pb (RAMEL, 1997), juntamente com repetições menores de 1 até 10 pb, os microsatélites, são denominadas VNTRs. O genoma de procariotos geralmente possui VNTRs e estes têm sido frequentemente utilizados para genotipagem de bactérias. Em *S. aureus* essa estrutura repetitiva foi encontrada em dois genes bem conservados: *spa*, que codifica para a proteína A, e *coa*, que codifica para a coagulase (MATHEMA; MEDIAVILLA; KREISWIRTH, 2008). Koreen et al. (2004) demonstrou que o gene *spa* apresenta maior poder discriminatório por atender dois critérios, possuir maior taxa de mutação dos nucleotídeos dentro das repetições e ter repetições com menor número de pb que o gene *coa*. O primeiro critério aumenta a variabilidade encontrada pelo marcador em isolados relacionados e o segundo critério torna as repetições mais susceptíveis a deleções e duplicações.

Uma década antes, Frenay et al. (1994) foi o primeiro a utilizar o *spa* Typing, naquela época a região X era amplificada e seu tamanho estimado por eletroforese. Pouco depois o mesmo grupo melhorou a técnica com análise da sequência (FRENAY et al., 1996). Desde então a técnica tem sido usada para diversos propósitos epidemiológicos. Seu uso foi tornou-se irrestrito após a introdução de softwares que permitem a fácil análise dos dados obtidos e comparação entre laboratórios (HARMSSEN et al., 2003). Além da simplificação da nomenclatura alfanumérica introduzida por Kreiswirth (SHOPSIN et al., 1999), pela nomenclatura de Harmsen et al. (2003). Essa nomenclatura é mais utilizada mundialmente mais por ser a contemplada no banco de dados e por ter simplificado a nomenclatura existente, adotando um sistema numérico, com o número do tipo precedido da letra “t”.

A técnica foi validada para o uso em surtos há tempos (SHOPSIN et al., 1999), com poder discriminatório - medido pelo índice de Simpson como descrito por Hunter (1990) - próximo ao PFGE. Adicionalmente, sua habilidade em designar tipos e reprodutibilidade inter e intra-laboratorial mostrou ser de 100% (HALLIN et al., 2007). Apenas em 2004, Koreen et al. estabeleceu que o *spa* Typing podia ser utilizado com sucesso para análises a longo prazo e desde então tem sido utilizada com sucesso para tipagem de populações, com índice de Simpson comparável ao MLST (FARIA et al., 2008; HALLIN; FRIEDRICH; STRUELENS, 2009). Embora em ambientes com pressões seletivas específicas, como é o caso de infecção persistente em pacientes com fibrose cística, é necessário avaliar a influência na velocidade de mutação ou

clock speed e se o poder discriminatório da técnica seria comprometido por essa característica (KAHL et al., 2005).

A capacidade do *spa* Typing de indexar tanto micro quanto macrovariação soluciona a busca de longa data por um marcador genético que possa acumular variação genética de maneira tão lenta quanto variações no cromossomo e tão rápida quanto as variações entre linhagens, por mecanismos independentes. As mutações pontuais, que ocorrem em uma velocidade muito menor na região X do gene *spa*, avaliam a macrovariação enquanto as variações no número de repetições, que ocorrem com velocidade muito maior avaliam microvariação (KOREEN et al., 2004).

As principais vantagens do *spa* Typing em relação a técnicas já utilizadas são sua simplicidade e rapidez, por envolver o sequenciamento de um único locus. Além do preço acessível e da facilidade provida por sistemas *high throughput* no armazenamento de dados em um bando de dados compartilhável na internet, com portabilidade e possibilidade de comparar resultados entre laboratórios (MATHEMA; MEDIAVILLA; KREISWIRTH, 2008). Atualmente o crescente banco de dados desenvolvido por Harmsen et al. (2003) conta com 16550 tipos, 724 repetições, designados a partir de 159151 isolados de 130 países (<http://www.spaserver.ridom.de/>), sendo o maior banco de dados para *S. aureus*, superando o banco de dados do MLST.

O *spa* Typing tem sido utilizado mundialmente, principalmente para diferenciar estirpes em surtos de HA e CA-MRSA em humanos. No entanto, existem relatos do uso da técnica para o estudo da distribuição de LA-MRSA e ainda de MSSA em animais. Como por exemplo os estudos com isolados de leite bovino de no Canadá (SAID et al., 2010), na Suíça (HUBER et al., 2010), na Coreia (HWANG et al., 2010), na Alemanha (JOHLER; LAYER; STEPHAN, 2011) e nos Estados Unidos da América (HARAN et al., 2012)

No Brasil, Lange et al. (1999) investigou o poder discriminatório do *spa* Typing em isolados provenientes de mastite bovina, no entanto, apenas o tamanho do amplificado após eletroforese foi considerado e as sequências não foram estudadas, tornando os resultados da análise de rRNA spacer e *coa* avaliados da mesma forma, apenas por eletroforese, mais discriminatórios. Mais tarde Aires-de-Souza et al. (2007) realizou o primeiro trabalho de caracterização de isolados provenientes de diferentes espécies animais incluindo *spa* Typing, no Rio de Janeiro, sendo que seis desses isolados eram provenientes de mastite bovina. Silva et al. (2013) realizou uma investigação maior em MSSA isolado de mastite, descrevendo os tipos mais frequentes no estado de São Paulo. Enquanto Oliveira et al. (2016) utilizou a técnica para caracterizar isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina na Paraíba.

O aumento da disponibilidade de resultados de caracterização por *spa* Typing, mundiais e brasileiros, torna possível a comparação das sequências entre *Staphylococcus aureus* de diferentes origens (animais e propriedades), que é útil na compreensão do papel dos hospedeiros como reservatórios para linhagens patogênicas e dos aspectos epidemiológicos envolvidos na transmissão do patógeno. Tal aplicação de técnicas moleculares tem contribuído significativamente para a identificação, caracterização e definição da distribuição clonal de isolados, possibilitando a criação de hipóteses a serem testadas. Por exemplo, a demonstração da transmissão deste micro-organismo por contato direto e indireto entre animais e a influência do genótipo na eliminação de infecções subclínicas no período seco de vacas leiteiras (DINGWELL et al., 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus*

Foram utilizados isolados de *Staphylococcus aureus* pertencentes à bacterioteca "Coleção de Micro-organismos de Interesse para o Agronegócio do Leite" da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Leite e amostras de rotina do Laboratório de Zoonoses Bacterianas. As amostras, coletadas ao longo de mais de 20 anos, entre 1994 e 2016, foram selecionadas objetivando-se recuperar aproximadamente 20 isolados de cada ano, perfazendo um total de 434 amostras. A maioria eram amostras individuais, que se originaram do leite coletado de um dos quartos mamários do animal, no entanto, algumas eram isoladas de leite coletado em tanque.

A análise bacteriológica foi realizada antes do início do experimento, pela cultura de 10 µL de leite em ágar sangue de carneiro 5% desfibrinado à temperatura de 37 °C por 24 a 48 horas. As colônias isoladas no ágar sangue foram identificadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise, pelo teste de Gram, e por testes bioquímicos (Brito et al., 1999; Oliver et al., 2004). Ao isolamento de uma colônia o animal foi considerado como positivo e os isolados identificados como *S. aureus* foram congelados até o momento do uso. A partir de 2015, o material foi então repicado em BHI (Brain Heart Infusion) ágar e enviado para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde os procedimentos do atual projeto, descritos abaixo, se iniciaram.

4.2 PROCEDIMENTO APÓS O RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS

O material, recebido em BHI ágar foi então repicado em 3 ml de BHI caldo e desta cultura 1ml foi utilizado para a realização do antibiograma, 1 ml foi destinado ao armazenamento das amostras com 20% do volume em glicerol e 1ml foi utilizado para a extração de DNA.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir da cultura em BHI caldo, adaptada da metodologia descrita por Fan et al. (1995), com a substituição de tampão fosfato-salino (PBS pH 7,2) por tampão tris-EDTA (TE pH 8,0) e 1ml de cultura centrifugado a 14000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado com 200 µl de TE (pH 8,0), homogeneizado e centrifugado por 13000 g por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O pellet obtido foi ressuspensionado em 50 µl de TE (pH 8,0). A suspensão de células foi

então submetida à fervura direta, a 95°C por 15 minutos e em seguida congelada totalmente por aproximadamente 30 minutos. Finalmente, foi homogeneizada, centrifugada a 13000 g por 5 minutos e o sobrenadante contendo o DNA liberado foi estocado a -20°C. As amostras de *Staphylococcus aureus* ATCC números 25923 e 29213, cedidas pelo professor Bruno Penna do Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, foram utilizadas como padrão na obtenção do DNA dos isolados amostrados.

4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus*

A identificação de *S. aureus* realizada anteriormente por meio de isolamento em ágar sangue, coloração de Gram, cultivo ágar sal manitol e métodos bioquímicos convencionais como a catalase, coagulase, OF e VP (SIMÕES et al., 2013); foi confirmada pela identificação molecular. O alvo da reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi uma porção do gene conservado da termonuclease (*nuc*), por meio do anelamento com os *primers* au-F3 e au-nucR presentes na tabela 1. Os *primers* e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram descritos por Sasaki et al. (2010).

Tabela 1 - Primers utilizados para a identificação do gene da termonuclease *nuc* de *S. aureus*

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)
<i>nuc</i>	au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359
	au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC	

Fonte: Elaborada pela autora

Cada reação de amplificação foi realizada com 15 µl de solução contendo 7,0 µl de *GoTaq Green Master Mix*, 2X (Promega®); 5,4 µl de água ultrapura; 0,3 µl de *primer* senso e 0,3 µl de *primer* anti senso, à concentração de 10 pmol/µl e 2 µl de DNA da amostra a ser testada. O programa no termociclador (Labnet®) seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial à temperatura de 95 °C por 2 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 35 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos de extensão final de 72 °C por 2 minutos. Os amplificadores resultantes foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,5 % com adição de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Scientific®) e visualizados sob luz ultravioleta. Um controle negativo sem a adição da amostra de DNA, um controle negativo da extração (TE pH 8,0) e um controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) foram utilizados em todas as reações.

4.5 ANTIBIOGRAMA

O antibiograma de todas as amostras foi realizado por meio da técnica de difusão em disco de Kirby Bauer, de acordo com recomendações e critérios interpretativos definidos no documento M100-S25 do CLSI (2015) e nos documentos VET01-A4 e VET01-S2 do CLSI (2013). O controle da qualidade do teste foi realizado com a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Foram testados discos com os seguintes antimicrobianos (Sensifar®): enrofloxacina (ENO) 5 µg; ciprofloxacina (CIP) 5 µg; amoxicilina/ácido clavulânico (AMC). 20/10 µg; trimetoprima/sulfametoxazol (SUT) 1,25/23,75 µg; ceftiofour (CTF) 30µg; ampicilina (AMP) 10 µg; gentamicina (GEN) 10 µg; neomicina (NEO) 30 µg; tetraciclina (TET) 30 µg; penicilina g/novobiocina (PNM) 10UI/30 µg; cefoxitina (CFO) 30 µg; oxacilina (OXA) 1 µg, eritromicina (ERI) 15 µg e cefalotina (CFL) 30 µg. De acordo com as zonas de inibição, as bactérias foram classificadas em resistentes (R), intermediárias (I) ou sensíveis (S) aos antimicrobianos testados.

Os discos de cefoxitina e oxacilina são utilizados para reportar resistência à meticilina. Os manuais atuais preconizam o uso da cefoxitina para *Staphylococcus spp.* - exceto *S. pseudintermedius* - para referir resistência às penicilinas, incluindo as penicilinas anti-estafilococicas como a meticilina. Isso porque a interpretação do halo formado pelo disco de oxacilina pode ser mais difícil e requer leitura com luz transmitida para possível detecção de pequenas colônias crescendo dentro do aparente halo de inibição. Já a leitura do halo formado pelo disco de cefoxitina pode ser feita com luz refletida. Recomendações específicas para a pesquisa de resistência à meticilina incluem: incubação por 24 horas completas não excedendo a temperatura de 35 °C, em vez das recomendações gerais de incubar por 16 a 18 horas em temperatura de 37 °C. No entanto, a resistência pode ser reportada se houver crescimento depois de um mínimo de 16 horas de incubação. Para cada amostra foram utilizadas 3 placas de 100 x 15mm, com 5 antibióticos no máximo em cada. Em cada placa 100 µl do inóculo em meio BHI com turbidez de 0,5 Mcfarland (1 a 2x10⁸ UFC/ml) foi transferido com auxílio de um *swab* estéril para a placa de ágar Mueller-Hinton.

A escolha destes 14 antibióticos foi de acordo com a disponibilidade no mercado, o uso comum na clínica de ruminantes no Brasil e a recomendação do documento VET01-S2 do CLSI (2013) para mastite bovina.

4.6 PESQUISA DO GENE DE RESISTÊNCIA À METICILINA

Foi pesquisada a presença do gene de resistência à meticilina, *mecA*, pelo método descrito por Mehrotra, Wang e Johnson (2000). Na tabela 2 estão descritos os *primers* que foram utilizados para a identificação dos genes de resistência à meticilina.

Tabela -2. Primers utilizados para a identificação do gene de resistência a meticilina *mecA*

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho
<i>mecA</i>	GMECAR-1	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	163
	GMECAR-2	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	

Fonte: Elaborada pela autora

Cada reação de amplificação foi realizada com 15 µl de solução contendo 7,0 µl de *GoTaq Green Master Mix*, 2X (Promega®); 5,4 µl de água ultrapura; 0,3 µl de *primer* senso e 0,3 µl de *primer* anti senso, à concentração de 10 pmol/µl e 2 µl de DNA da amostra a ser testada. O programa no termociclador (Labnet®) seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial à temperatura de 94 °C por 5 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 53 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos de extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os amplificadores resultantes foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,5 % com adição de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Scientific®) e visualizados sob luz ultravioleta. Um controle negativo sem a adição da amostra de DNA, um controle negativo da extração (TE pH 8,0) e um controle positivo (MRSA1968 cedida pela professora Elsa Mamizuka do Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) foram utilizados em todas as reações.

4.7 *spa* Typing

4.7.1 Amplificação da região repetida da proteína A do *Staphylococcus aureus*

A região repetida da proteína A do *Staphylococcus aureus* foi amplificada com os *primers* descritos por Harmsen et al. (2003), apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados no *spa* Typing

Gene	Posição Genoma	Primer	Sequência (5'-3')
Proteína A	1092-1113	Spa1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC
	1534-1514	Spa1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT

Fonte: Elaborada pela autora

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 50 µL contendo 25 µL de *GoTaq Green Master Mix*, 2X (Promega®); 14 µL de água; 3 µL de cada primer a 10 pmol e 5 µL de DNA. Os parâmetros utilizados no ciclo de amplificação serão: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; seguidos por de 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 90 segundos; e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR serão separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % com adição de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Scientific®) e visualizados sob luz ultravioleta, para verificar a eficiência da amplificação. O tamanho esperado das bandas amplificadas é entre 200 a 600 pb.

4.7.2 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA

Na presença de banda única, obtida em gel de agarose, o produto foi purificado diretamente do amplificado, utilizando 2 µL *ExoSap-IT* (Affymetrix) e 5 µL do produto da PCR, incubando a 37 °C por 15 minutos e então 80°C por 15 minutos. Já na presença de bandas múltiplas no gel a banda desejada era cortada e purificada com o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare).

A purificação com o kit seguiu o protocolo de purificação de DNA a partir de gel de agarose de acordo com o fabricante. Iniciou-se adicionando 500 µl do buffer de captura tipo 3 à cada fatia de gel em um microtubo DNase e RNase *free*, que após homogeneização por inversão foi incubado à 60 °C por 15 a 30 minutos até a agarose dissolver completamente. A mistura deve ser amarela ou laranja claro, se tornar-se rosa ou vermelha deve ser adicionado pequeno volume de aproximadamente 10 µl de acetato de sódio 3M pH 5.0. Após este procedimento, centrifugou-se a mistura brevemente para o líquido ficar no fundo do microtubo e então transferiu-se todo o conteúdo (no máximo 700 µl) para a coluna *GFX microspin* dentro de um microtubo coletor, fornecidos pelo kit. Incubou-se então à temperatura ambiente por 1 minuto antes de centrifugar a 16000 x g por 30 segundos. Descartou-se o líquido no tubo coletor e adicionou-se 500 µl do buffer de lavagem tipo 1 à coluna. Centrifugou-se a 16000 x g por 30 segundos, descartou-se o líquido no tubo coletor e o procedimento de lavagem com o Tampão tipo 1 foi repetido para maior pureza. Descartou-se o tubo coletor com o líquido e transferiu-se

a coluna para um novo microtubo de 1,5ml, DNase e RNase free. A eluição foi realizada com adição de 32 µl do tampão de eluição tipo 6 ao centro da membrana da coluna. Incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se a 16000 x g por 1 minuto. O DNA purificado foi então armazenado a -20°C até a realização da reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento pelo método de Sanger utilizando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies®) teve volume final de 10 µL. No caso da purificação com *ExoSap-IT* (Affymetrix®) adicionou-se 1 µL de *Big Dye*, 1,5 µL de *buffer 5X* e 0,5 µL de primer à mistura e no caso da purificação com o kit adicionou-se 7 µL do DNA alvo purificado à mistura de 1 µL de *Big Dye*, 1,5 µL de *buffer 5X* e 0,5 µL de primer. O programa no termociclador seguiu temperatura inicial de desnaturação de 96°C por 1 minuto e 40 ciclos de 96°C por 10 segundos; 50°C por 5 segundo; e 60°C por 3,09 minutos. O produto gerado foi então precipitado.

Para o protocolo de precipitação etanol/EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), adicionou-se no amplificado da reação anterior, 2,5 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de Etanol 100 % e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Então, centrifugou-se a placa a 15°C por 30 minutos a 2.250 x g. Imediatamente após, desprezou-se o conteúdo na pia, inverteu-se a placa e centrifugou-se a mesma a 180 x g por 1 minuto com placa invertida e então, adicionou-se 30 µL de etanol 70 % e centrifugou-se a 1.650 x g por 15 minutos. Desprezou-se novamente o conteúdo e centrifugou-se com placa invertida a 180 x g por 1 minuto. A placa foi para o termociclador aberto para secar a 95°C por 10 minutos e adicionou-se 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems®). A placa foi, por fim, levada ao termociclador para que ocorresse a desnaturação a 95 °C por 2 minutos e 4 °C por 2 minutos. Após estas etapas de precipitação e desnaturação, a placa foi levada ao sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems®) para leitura das sequências.

4.7.3 Edição de sequências

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra foram submetidos ao aplicativo Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com score superior a 20 (1 erro a cada 100 nucleotídeos). Em seguida as sequências foram montadas com o auxílio do programa CAP3(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), sendo as mesmas submetidas ao BLASTn para confirmação do sequenciamento da proteína A (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.7.4 Análise de sequências

A análise das sequências obtidas por *spa* Typing e a correlação entre espaço, tempo e sequência tipo foi feita por meio do programa computacional *BioNumerics 7 (Applied Maths®)*. Ao importar as sequências é possível definir os parâmetros de montagem dos contigs, que foi utilizado no *default*, com o número máximo de bases não resolvidas reportado e o número máximo de inconsistências no alinhamento definido como 20. Também foram utilizadas as configurações *default* para qualidade, montagem e consenso, uma vez que esses são os parâmetros exigidos para submeter novos tipos no *SpaServer*.

Após a montagem dos contigs, é possível visualizar o relatório gerado, no qual os contigs que foram montados sem nenhum problema aparecem em verde (*OK*), os que tiveram inconsistências no alinhamento que puderam ser resolvidas quando aplicadas as configurações de consenso aparecem em laranja (*Warning*) e as que tiveram pelo menos um dos possíveis erros de montagem: o contig não atingiu os critérios de qualidade, mais de um contig foi criado, as posições de *trimming* - de início e/ou término - não foram encontradas, há bases mal resolvidas no consenso; aparecem em vermelho (*Error*). No presente estudo o mínimo possível de edição manual foi realizado, para manter a qualidade das sequências obtidas. Apenas as sequências laranjas e vermelhas no caso de bases mal resolvidas que puderam editadas manualmente após clara visualização da base no cromatograma foram editadas manualmente, adquirindo a cor verde e o status *Solved*. Foram removidas do estudo as sequências que não atingiram os critérios de qualidade, mais de um contig foi criado, ou que as posições de *trimming* não foram encontradas.

As sequências com status *OK*, *Warning* ou *Solved* tiveram então seus *spa* tipos definidos a partir de seu *Repeat Sucession* que é a sequência de repeat codes, ou seja, de repetições conhecidas. O *spa typing plugin* no *software BioNumerics* permite a determinação automática das repetições e dos tipos, de maneira sincronizada com maior banco de dados de tipagem de *S. aureus* existente, o SeqNet/Ridom Spa Server (<http://www.spaserver.ridom.de/>), imediatamente adquirindo os tipos a partir do Spa Server. Quando a sucessão de repetições está incompleta o *spa* tipo é representado por “???” e quando a sucessão não está no banco de dados é determinada como “*Unknown*”. As primeiras foram removidas do presente estudo enquanto as segundas são apresentadas como *Unknown*, mantendo a nomenclatura automaticamente determinada pelo *Bionumerics*.

A construção dos dendrogramas e *minimum spanning trees* (MST) também foi realizada com auxílio do *spa typing plugin* do *software BioNumerics*. Neste é utilizado o modelo DSI (*Duplication of tandem repeats, Substitutions and Indels*) para alinhamento com base nas

repetições, no qual eventos de duplicação, substituição, inserção e deleção de repetições são levados em conta para montar uma matriz de similaridade. No presente estudo essa matriz foi montada com as configurações *default*.

Os MST foram criados a partir de uma matriz de distância da similaridade entre as sucessões de repetição, com a menor distância entre os “galhos” possível e com o isolado com o maior número de relações no centro ou *node*. A distância entre os isolados é convertida para uma unidade chamada *distance bin size*, cujo default é 1%. Isso significa que duas sequências com similaridade de 100%-99% terão distância 0 enquanto duas sequências com similaridade de 99%-98% terão distância de 1.

Já os dendrogramas criados também a partir das sucessões de repetição utilizaram a metodologia UPGMA (Unweighted Pair Groups Method Average). Em um dos dendrogramas, que baseou-se na similaridade dos perfis de multirresistência para o agrupamento, para aumentar a discriminação entre os isolados foi utilizado a metodologia de Ward, cuja diferença para a metodologia UPGMA é o algoritmo usado para *clustering*. Nos demais foi seguido o preconizado pelo manual do *spa typing plugin*

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *S. aureus*

Das 434 amostras identificadas bioquimicamente como *Staphylococcus aureus*, 412 tiveram identificação confirmada pela PCR para amplificação do gene da termonuclease (*nuc*), ou seja, 94,93% das amostras tiveram espécie confirmada. As demais 22 amostras, cuja identificação não pode ser confirmada, foram excluídas do estudo. O gel na Figura 1 apresenta as bandas específicas compatíveis com *S. aureus*.

Figura 1- Gel com as bandas específicas compatíveis com *Staphylococcus aureus* (359pb), CP: controle positivo, CN: controle negativo, CE: controle da extração. Ladder de 50pb.

Fonte: Acervo pessoal

5.2. ANTIBIOGRAMA

Perfil de resistência ou resistência intermediária à pelo menos um dos antimicrobianos testados foi encontrada em 58,74% das estirpes (242/412), sendo mais frequente a resistência a ampicilina em 53,64% (221/412), tetraciclina em 16,02% (66/412) e eritromicina em 6,80% (28/412) das amostras. Menos frequente foi a resistência à neomicina em 2,91% (12/412), gentamicina em 1,46% (6/412), enrofloxacina em 1,21% (5/412), ciprofloxacina em 0,73% (3/412), trimetoprima/sulfametoxazol com 0,49% (2/412) e amoxicilina + ácido clavulânico, ceftiofur e penicilina g/novobiocina em 0,24% (1/412) dos isolados.

Na tabela 4 o perfil de cada antibiótico está avaliado individualmente, possibilitando calcular a frequência de bactérias resistentes e intermediárias no período total estudado e interpretar separadamente os perfis ao longo do tempo. Para interpretar os dados o denominador deve ser considerado uma vez que o número de amostras representantes de cada ano não foi igual e que em alguns anos nenhuma amostra foi recuperada (2008 e 2012). No gráfico 1, a frequência dos perfis resistente + intermediário está representada ao longo do tempo.

Gráfico 1 - Frequência de intermediários e resistentes ao longo do tempo

Fonte: Acervo pessoal

Tabela 4: Perfil de resistência aos antibióticos testados ao longo do tempo e frequência de perfis intermediários e resistentes (I+R) no período de 1994 até 2016.

Antibiótico	Perfil	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2009	2010	2011	2013	2014	2015	2016	Total	Freq (I+R)
AMP	R		5	12	13	12	5	30	25	46	12	7	4	3	2	9	13	1		8	2	12	221	0,536
	S	1	10	21	9	10	12	20	16	32	6	4	2	2	1	6	9	1	2	1	6	20	191	
TET	I						1	5	2	3	1						1						13	0,160
	R		2	1	1	4		9	6	10	7	2	2			4	2	1		1	1		53	
	S	1	13	32	21	18	16	36	33	65	10	9	4	5	3	11	19	1	2	8	7	32	346	
ERI	I				1	1	1		1	5												5	14	0,068
	R				1	2	1	1	4	1							3				1		14	
	S	1	15	33	20	19	15	49	36	72	18	11	6	5	3	15	19	2	2	9	7	27	384	
NEO	I							1		2						2	1					2	8	0,029
	R				1	2															1		4	
	S	1	15	33	21	20	17	49	41	76	18	11	6	5	3	13	21	2	2	9	7	30	400	
GEN	R							1								2				1		2	6	0,015
	S	1	15	33	22	22	17	49	41	78	18	11	6	5	3	13	22	2	2	8	8	30	406	
ENO	I					1		1	1	2													5	0,012
	S	1	15	33	22	21	17	49	40	76	18	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	407	
CIP	I									1							1						2	0,007
	R										1												1	
	S	1	15	33	22	22	17	50	41	77	17	11	6	5	3	15	21	2	2	9	8	32	409	
SUT	I				1			1															2	0,005
	S	1	15	33	21	22	17	49	41	78	18	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	410	
AMC	R									1													1	0,002
	S	1	15	33	22	22	17	50	41	77	18	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	411	
CTF	I				1																		1	0,002
	S	1	15	33	21	22	17	50	41	78	18	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	411	
PNM	I										1												1	0,002
	S	1	15	33	22	22	17	50	41	78	17	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	411	
CFL	S	1	15	33	22	22	17	50	41	78	18	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	412	0,000
OXA	S	1	15	33	22	22	17	50	41	78	18	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	412	0,000
CFO	S	1	15	33	22	22	17	50	41	78	18	11	6	5	3	15	22	2	2	9	8	32	412	0,000

Fonte: Elaborada pela autora

Resistência a múltiplos antimicrobianos foi encontrada em 15/412 isolados (3,64%) se considerado o critério adotado por Schwarz et al. 2010, para análise de amostras provenientes de animais. Se for adotada a definição apresentada por Magiorakos et al. (2011), na qual a resistência à ampicilina por ser amplamente difundida não é considerada epidemiologicamente significativa, a multirresistência seria apresentada apenas por 4/412 estirpes (0,97%). Em ambos os critérios são consideradas multirresistentes os isolados que apresentarem resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos diferentes. A comparação destes critérios com os antibióticos testados no presente estudo está apresentada na tabela 5.

Nenhuma amostra foi resistente à cefalotina, cefoxitin ou oxacilina. A ausência de resistência ao cefoxitin e à oxacilina refere ausência de resistência à meticilina e a outras penicilinas anti-estafilocócicas, ou penicilinas estáveis à penicilinases. A figura 2 apresenta uma placa resultante da técnica de difusão em disco de Kirby Bauer, com halos de inibição indicando sensibilidade aos antibióticos testados.

Figura 2: Antibiograma pelo método de disco difusão. Destaque para sensibilidade à OXA (diâmetro do halo ≥ 13 mm) e CFO (diâmetro do halo ≥ 22).

Fonte: Acervo pessoal

Tabela 5: Isolados que apresentaram perfil de multirresistência aos antibióticos testados considerando a definição de de Magiorakos et al., 2011 ou Shwarz et al., 2010.

Classe	Subclasse	Antimicrobiano	Isolados MDR														
			60	75	78	137	161	184	187	228	240	274	347	352	381	386	398
β-lactâmicos	Penicilinas lábeis a penicilinase	Ampicilina															
	Penicilinas anti-estafilocócicas	Oxacilina															
	Cefalosporinas	Ceftiofur															
		Cefalotina															
	Cefamicinas	Cefoxitin															
+ inibidor β-lactamase		Amoxicilina+ac. clav.															
Combinações		Penicilina+novobiocina															
		Ampicilina+colistina															
Tetraciclinas		Tetraciclina															
Macrolídeos		Eritromicina															
Aminoglicosídeos		Gentamicina															
		Neomicina															
Inibidores da síntese do folato		Sulfa+trimetoprim															
Quinolonas	Fluoroquinolonas	Enrofloxacina															
		Ciprofloxacina															

*Quadrado sombreado preto (Magiorakos et al., 2011) ou cinza (Shwarz et al., 2010), sendo que Magiorakos et al., 2011 não considera a classe das penicilinas para a classificação: o isolado é intermediário ou resistente, quadrado em branco: o isolado é sensível, MDR (*multidrug-resistant*): intermediário ou resistente a ≥ 1 agente em ≥ 3 classes de antimicrobianos.

Fonte: Elaborada pela autora

5.3 PESQUISA DO GENE DE RESISTÊNCIA À METICILINA

Todas as 412 amostras submetidas à PCR para identificação do gene *mecA* tiveram amplificação negativa. O gel na figura 3 ilustra os resultados negativos para amplificação de *mecA*, confirmando a ausência do fenótipo de resistência a meticilina.

Figura 3 - Gel com os resultados de ausência do gene de resistência à meticilina, *mecA*. CP: controle positivo (163pb), CN: controle negativo, CE: controle da extração. *Ladder* de 100pb.

Fonte: Acervo pessoal

5.4. *spa* Typing

5.4.1. Amplificação da região repetida da proteína A do *Staphylococcus aureus*

A amplificação da região X do gene da proteína A das 412 amostras foi realizada com sucesso para 396 destas e os tamanhos de bandas obtidos foram entre 200 e 420pb. Essa região polimórfica possui um número variável de repetições de geralmente 24 pb. Assim, como observado na figura 4, seria possível agrupá-los visualmente de acordo com o número de pares de bases aproximado obtido. Entretanto o sequenciamento é essencial para a caracterização das amostras uma vez que a diversidade da região provém não só de duplicação, deleção, inserção das unidades repetitivas, mas também de substituição das repetições e mutação pontual que gerariam diferenças muito pequenas no número de pb para serem visualizadas.

Figura 4 - Resultado da amplificação da região x do gene da proteína A. *Ladder* de 100pb

Fonte: Acervo pessoal

5.4.2 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA

A purificação e realização da reação de sequenciamento foram realizadas a partir dos produtos amplificados obtidos das 396 amostras, sendo que para cada amostra duas reações ao menos foram realizadas: uma vez com o primer senso e uma vez com o primer antisenso, para obtenção de mais de 792 sequências.

5.4.3 Edição de sequências

Antes de importar as sequências no *Bionumerics* para análise, a qualidade dos cromatogramas foi avaliada com o aplicativo Phred, as sequências foram montadas com o auxílio do programa CAP3 e os contigs gerados, submetidos ao BLASTn para confirmação do sequenciamento da proteína A. Apenas 738 destas sequências puderam

ser editadas e montadas com qualidade suficiente para análise, totalizando 369 contigs de 369 amostras.

5.4.4 Análise de sequências

Para cada uma das 369 estirpes cujas sequências puderam ser montadas, foram identificados os genótipos e 44 *spa* tipos diferentes foram determinados. Em 7 das estirpes o *Bionumerics* não foi capaz de determinar o tipo pois a sucessão de repetições presente não foi encontrada no banco de dados do *SeqNet/Ridom Spa Server*. Estas sequências foram denominadas *Unknown*. Na tabela 6 estão apresentadas as frequências com as quais os tipos estão representados ao longo dos 22 anos estudados. O genótipo t605 se destaca como tipo predominante com 57,45% de frequência, seguido com frequência significativamente menor pelo t002 (8,4%) e pelo t127 (8,13%).

Tabela 6 - Frequência dos *spa* tipos obtidos.

<i>spa</i> type	Frequência	(n <i>spa</i> type/n total)
t605	0,5745	(212/369)
t002	0,0840	(31/369)
t127	0,0813	(30/369)
t267	0,0461	(17/369)
t359	0,0379	(14/369)
Unknown	0,0190	(7/369)
t521	0,0163	(6/369)
t021	0,0108	(4/369)
t10856	0,0081	(3/369)
t105, t1130, t2279, t2601, t2678, t318, t3782, t4570, t948	0,0054	(2/369)
t008, t056, t1055, t10733, t11521, t1298, t13873, t1402, t150, t1653, t177, t189, t1965, t2207, t2524, t3471, t397, t433, t518, t5325, t543, t548, t5487, t591, t693, t865, t9392	0,0027	(1/369)
Total	1,0000	369

Fonte: Elaborada pela autora

No apêndice 1 está o dendrograma no qual é possível a visualização geral dos agrupamentos realizados para todas as estirpes. Este permite através dos agrupamentos obtidos e da observação da sucessão de repetições, fazer suposições de como os *spa* tipos se relacionam. Por exemplo, o t521 se diferencia do t267 por uma inserção da repetição r34 na nona posição ou o inverso ocorre e o t267 se diferencia do t521 por uma deleção da r34 na nona posição. É possível realizar hipóteses para a maioria dos *spa* tipos obtidos, no entanto, os seguintes isolados parecem se relacionar de maneira mais distante, não

sendo possível comparar sua sucessão de repetições com as demais identificadas: 61, 115, 137, 155, 223, 238 e 300. Respectivamente identificados como: *Unknown*, t518, t008, t9392, *Unknown* e *Unknown*. Além dos isolados 241 e 245 que também não podem ser relacionados aos outros pois possuem apenas uma repetição. O software atribuiu a estes um genótipo, mesmo o esperado sendo que *spa* tipos fossem atribuídos apenas às sucessões de 2 até 16 repetições. Para as 4 outras amostras denominadas *Unknown* é possível fazer hipóteses da sua relação com os tipos existentes.

Os gráficos 2, 3, 4, 5 e 6 apresentam a caracterização molecular de todos os isolados de *S. aureus* de acordo com uma árvore (MST), com as variáveis: genótipo, ano de isolamento, estado, município e fazenda. Não foi possível identificar um padrão de genótipo ligado às variáveis estudadas, ou seja, os genótipos estão igualmente distribuídos de acordo com cada variável, ano de isolamento (Gráfico 3), estado (Gráfico 4), município (Gráfico 5) e fazenda (Gráfico 6). Por exemplo, o genótipo mais frequente, t605, foi identificado em quase todos os anos exceto 1994, 2007 e 2013 e 2015, todos estes anos com 7 ou menos amostras representativas. Também foi identificado em todos estados estudados; Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Goiás.

Gráfico 2 - *Minimal spanning tree* (MST) de 369 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com os genótipos identificados.

Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 3 - *Minimal spanning tree* (MST) de 369 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com o ano de isolamento.

Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 4 - *Minimal spanning tree* (MST) de 369 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com o estado de origem.

Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 5 - *Minimal spanning tree* (MST) de 369 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com o município de origem.

Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 6 - *Minimal spanning tree* (MST) de 369 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com a fazenda de origem.

Fonte: Acervo pessoal

A distribuição dos isolados coletados nos estados era a seguinte: 270 isolados do estado de Minas Gerais, 61 do Rio de Janeiro, 32 de São Paulo e 6 de Goiás. Ainda que a distribuição nos estados esteja desigual, é possível observar que em relação às fazendas e municípios também não houve distribuição dos genótipos em um local de isolamento em particular, mesmo porque a divisão nessas variáveis era grande, uma vez que foram estudadas 147 fazendas no total e 90 municípios, sendo 66 destes no estado de Minas Gerais, 14 no Rio de Janeiro, 8 em São Paulo e 2 em Goiás.

Em relação à resistência dos isolados, para permitir que o agrupamento a partir dos perfis de resistência pudesse ser melhor visualizado e analisado, apenas os perfis obtidos para o genótipo t605, mais frequente no estudo, estão apresentados no dendrograma do apêndice 2. Neste é possível observar ausência de relação dos perfis obtidos com variáveis de espaço e tempo. Os 15 perfis obtidos foram classificados em grupos de G1 até G15 e coloridos para facilitar a interpretação. O perfil mais frequente foi o G4, de resistência apenas à ampicilina, seguido pelo perfil G10, sensível a todos os antibióticos testados e em terceiro lugar está o perfil G3 de resistência simultaneamente à ampicilina e tetraciclina.

Os perfis de multirresistência dentro dos isolados t605 foram identificados nos anos 2001 e 2002, no entanto, o dendrograma apenas dos perfis multirresistentes (Figura 5) mostrou que não houve nenhum padrão de distribuição ao longo do tempo. Também não houve relação da multirresistência com as variáveis de espaço. Em relação aos genótipos o t359 foi o mais frequente a apresentar resistência (n=3) seguido do t605 e do t602 (n=2). Observando a sequência de repetições desses tipos é possível fazer relações entre eles, por exemplo o t359 e o t267 que se diferenciam apenas pela inserção de um r34 na oitava repetição. Se esses dois tipos forem comparados no dendrograma geral (apêndice 1) com ponto de corte de 99% eles seriam agrupados e uma mesma linhagem.

Para que comparações em relação ao genótipo e também em relação à distribuição temporal e espacial pudessem ser realizadas as amostras das 6 fazendas com maior número de isolados (com 6 ou mais isolados), foram agrupadas. Na figura 6 encontra-se o dendrograma resultante. Observa-se que se utilizarmos ponto de corte de 99% para agrupar os genótipos obtidos, estes continuaram separados nos mesmos tipos obtidos com ponto de corte 100% a não ser pelos isolados 50, 59, 89, 91 e 93 que seriam agrupados na mesma linhagem com 99% de semelhança. Os três isolados pertencentes ao tipo t021 possuem apenas uma r16 a menos na posição 4 quando comparados com o isolado do t318 que por sua vez difere do isolado do t1130 por apenas uma possível duplicação da

r16 que se encontra neste último na quinta posição. Se for considerado ponto de corte de 98% o isolado 194 também seria agrupado junto a estes pois possui em comparação com o t021, uma inserção do r17 na terceira posição.

Também considerando um ponto de corte de 98% os isolados do genótipo t002 seriam considerados da mesma linhagem que o isolado 11 pertencente ao t5325 e o isolado 275 pertencente ao t105. Estes possivelmente diferem do t002 por substituição do r23 por r31 na segunda posição e por deleção do r12 na oitava posição, respectivamente. Ainda com similaridade de 98% os isolados 78 do t2279 e 428 do t3471 seriam agrupados na mesma linhagem uma vez que o t3471 difere de t2279 possivelmente por uma inserção de r13 na quinta posição.

Nestas fazendas foi possível ainda comparar amostras coletadas de um mesmo animal. Em 6 ocasiões duas amostras foram coletadas do mesmo animal. O mesmo tipo foi isolado em 5 das ocasiões. Nas amostras 7 e 10, coletadas do mesmo animal com 2 meses de diferença, t002 foi identificado em ambas. O mesmo genótipo foi identificado nas amostras 26 e 51 coletadas do mesmo animal, ainda que de diferentes quartos mamários, com 8 meses entre as coletas. Nas outras 3 ocasiões foi identificado o genótipo t605 nas amostras 80 e 81, 178 e 179, e 203 e 204 coletadas na mesma data que seu par. Já na única ocasião em que o mesmo tipo não foi encontrado em amostras de mesmo animal, o isolado 61 coletado em julho de 1997 foi identificado como *Unknown* enquanto o isolado 92 coletado mais de um ano depois, em outubro de 1998, foi identificado como t127. Observa-se que a sucessão de repetições de ambos é bastante distinta indicando dois eventos de infecção distintos.

Figura 5 - Dendrograma agrupando pela metodologia de Ward os perfis de multirresistência de *S. aureus* isolados de mastite bovina, com os respectivos dados de genótipo, ano de isolamento, fazenda, município e estado.

Fonte: Acervo pessoal

Figura 6 - Dendrograma agrupando pela metodologia UPGMA as sucessões de repetição das 6 fazendas com maior número de amostras coletadas, com os respectivos dados de ano de isolamento, fazenda, município e estado.

Fonte: Acervo pessoal

Ainda que seja possível observar no dendrograma a distribuição dos dados de tempo e espaço, os MST permitem melhor distinção visual. Nos gráficos 7, 8, 9 e 10 observa-se a caracterização molecular dos isolados de *S. aureus* das 6 fazendas com maior número de estirpes, de acordo com árvores (MSTs), com as variáveis: fazenda, ano de isolamento, município e genótipo. No MST com a distribuição dos isolados dessas fazendas por genótipo (Gráfico 7), é possível perceber que assim como na totalidade das amostras, os *spa* tipos mais frequentemente identificados foram o t605, t002 e t127. Com a diferença de que na totalidade das amostras o t002 é mais frequente que o t127 e analisando apenas as 6 fazendas com maior número de isolados o inverso ocorre, sendo o t127 mais frequente que o t002.

O MST no qual as amostras estão coloridas de acordo com o município de origem (Gráfico 8) é muito semelhante ao que as amostras estão coloridas de acordo com a fazenda de origem (Gráfico 9), sendo a única diferença no município de Coronel Pacheco, no qual se encontram 2 das fazendas a 1 e a 23. Assim pode-se utilizar apenas o MST da distribuição das fazendas por tipo (Gráfico 9) para ser comparado com a distribuição dos anos por tipo (Gráfico 10).

Ao fazer essa comparação nota-se que no mesmo ano existe uma grande diversidade de genótipos, por exemplo em 2016 foram identificados t127, t150, t605, t2207 e t3471. Mais inesperado é que na mesma fazenda existe grande diversidade de genótipos, por exemplo, na fazenda 25 foram identificados t127, t605, t543, t2279 e t9392. Além disso, as estirpes de mesmo tipo na mesma fazenda podem ser provenientes de muitos anos como os isolados t002 da fazenda 1, os quais foram coletados em 1995, 1996, 1997 e 1998.

Os três *spa* tipos mais frequentes tiveram diferentes distribuições por fazenda e ano. O t605 teve maior frequência em 2016 e na fazenda 25, sendo que a fazenda 25 teve amostras em 1997, 1998, 2000, 2001 e 2002; a fazenda 62 em 2001; a fazenda 92 em 2016; e a fazenda 128 em 2002. O t127 teve maior frequência também no ano de 2016, mas na fazenda 92, sendo que a fazenda 23 teve um isolado de 1998, a fazenda 25 teve isolados de 1998 e 2001; e a fazenda 92 de 2002, 2003 e 2016. O t002 teve todos os isolados exceto um, provenientes da fazenda 1, e a maioria coletada em 1997, mas também em 1995, 1996 e 1998. E uma estirpe da fazenda 23 coletado em 1997.

Em resumo a análise de todos os *spa* tipos não permitia a comparação de dados em relação às variáveis estudadas, assim foram realizados agrupamentos menores considerando o genótipo mais frequente (t605), o perfil de multirresistência (encontrado em 15 isolados) e as 6 fazendas com maior número de isolados (totalizando 83 amostras). De modo a poder fazer inferências dos tipos obtidos em relação ao tempo e espaço.

Gráfico 7 - *Minimal spanning tree* (MST) de 83 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com o genótipo identificado.

Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 8 - *Minimal spanning tree* (MST) de 83 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com o município de origem.

Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 9 - *Minimal spanning tree* (MST) de 83 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com a fazenda de origem

Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 10 - *Minimal spanning tree* (MST) de 83 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina analisadas por *spa* Typing de acordo com o ano de isolamento.

Fonte: Acervo pessoal

6. DISCUSSÃO

A mastite causada por *Staphylococcus aureus* causa riscos para a saúde bovina, é uma das maiores causas de prejuízo econômico na pecuária leiteira mundial (ACOSTA et al., 2016) e, ademais, possui difícil tratamento (BARKEMA et al., 2013). O Brasil em 2014 ocupava a quinta posição no *ranking* mundial na produção de leite, ficando atrás apenas da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (IBGE, 2014). Assim, a doença pode comprometer a economia ao prejudicar o programa nacional para melhoria da qualidade de leite, além de causar impacto na saúde.

O gene da termonuclease (*nuc*) tem sido utilizado com sucesso para identificação de espécies de *S. aureus*. De acordo com Sasaki et al. (2010) o método possui 99,8% de sensibilidade e 100% de especificidade. No presente estudo, 94,93% das amostras foram confirmadas como *S. aureus* e a pequena porcentagem que não foi confirmada pode ter sido decorrente de erros na identificação bioquímica da espécie ou da parcela inerente ao erro da técnica (PCR). Assim a baixa parcela das amostras que não pode ser confirmada deveu-se à experiência técnica e familiaridade com o protocolo de Simões et al. (2013) da profissional envolvida com a identificação.

Apesar de ser um agente de grande importância econômica para o país, existem poucos estudos de caracterização fenotípica e genotípica de *S. aureus* no Brasil. Em relação à caracterização fenotípica estudos foram realizados em relação ao perfil de resistência aos antimicrobianos. Os perfis encontrados nos isolados (Tabela 4) foram semelhantes com o descrito anteriormente para *Staphylococcus* spp. isolados de rebanhos leiteiros no país, com destaque para a resistência às penicilinas como a ampicilina (FONTANA et al., 2010; ROBLES et al., 2014; SANTIAGO-NETO et al., 2014; DA COSTA KREWER et al., 2015). No presente estudo o principal perfil obtido também foi o de resistência a ampicilina, pois das 58,74% das estirpes nas quais foi encontrada resistência ou resistência intermediária a pelo menos um dos antimicrobianos testados, 53,64% eram resistentes à ampicilina. Quanto à resistência à tetraciclina e eritromicina encontrada menos frequentemente, 16,02% e 6,08% respectivamente; apesar de não ter sido apontada como prevalente na revisão de Acosta et al., (2016), resistência à tetraciclina já foi relatada em níveis semelhantes em *S. aureus* por Fontana et al (2010) e resistência à eritromicina foi relatada em níveis superiores por Santiago-Neto et al. (2014) e Oliveira et al. (2016) mas não só *S. aureus* como outros estafilococos foram testados em ambos estudos. E assim como descrito por Kowalski et al. (2015) e Lindeman et al. (2013), não houve grande variação do perfil de resistência de *S. aureus* ao longo do tempo, como

podemos observar no gráfico 1 onde a variação da frequência de resistência não apresenta variação digna de nota nos 22 anos estudados.

Uma das possíveis limitações da caracterização pelo perfil de resistência em relação ao presente estudo é o tempo de armazenamento das amostras e repiques necessários para mantê-las. É possível que apenas resistência aos antibióticos com genes cromossomais e constitutivos tenha sido detectada nas amostras mais antigas, sendo os dados de resistência plasmidial e induzida perdidos. Em relação à penicilina o gene *blaZ* cromossomal é mais frequente em bovinos (OLSEN, CHRISTENSEN e AARESTRUP 2006). Também é de origem cromossomal o gene responsável pela resistência a eritromicina *ermA*, mais frequente nessa espécie (KHAN et al. 2000), no entanto *ermC* e *ermT* de origem plasmidial também foram descritos. Em relação aos genes que conferem resistência a tetraciclina, tanto *tetL* e *tetK*, descritos anteriormente em plasmídeos, quanto *tetM* frequentemente cromossomal, foram descritos em bovinos, sendo comumente encontrados simultaneamente em um mesmo isolado (KADLEC et al. 2012). No entanto, sem a pesquisa dos genes não é possível afirmar que o fenótipo observado seja decorrente apenas dos genes *blaZ*, *ermA* e *tetM*, pois genes plasmidiais podem ter expressado a resistência encontrada já que teve níveis similares aos já descritos.

Além do mais a localização dos genes deve ser frequentemente monitorada, pois um número grande de tipos pode causar mastite bovina, mas existe uma tendência de que poucos clones bem-sucedidos dominem uma grande área geográfica (VINTOV et al., 2003). Logo, pode haver uma mudança no clone mais frequente a qualquer momento. Se este clone mais frequente, tomando o gene *blaZ* como exemplo, tiver maior frequência do gene em plasmídeos então haverá também uma mudança de tendência da localização do gene nos bovinos como ocorreu com as estipes comumente isoladas de seres humanos, que possuem *blaZ* cromossomal (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006).

A ausência de resistência à oxacilina e cefoxitina, antibióticos utilizados para reportar resistência à meticilina, é o dado mais relevante fornecido pelo resultado do antibiograma (Figura 2) e também esteve dentro do esperado uma vez que no Brasil há apenas dois relatos da identificação de MRSA em gado leiteiro (SILVA et al, 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Houve a confirmação deste dado fenotípico pela ausência do principal gene de resistência à meticilina, o *mecA* (Figura 3). Apesar de MRSA ter distribuição mundial (VOSS; DOEBBELING, 1995) e ter sido identificado na espécie bovina há mais de 40 anos (DEVRIESE et al., 1975), a prevalência deste patógeno em bovinos não é alta (JUHÁSZ-KASZANYVITSKY et al., 2007; LEE, 2003), não sendo uma preocupação atual como patógeno de mastite. A principal estirpe relacionada a LA-MRSA e estudada no que diz respeito ao seu potencial zoonótico é a ST398

(WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010). Enquanto o ST398 está relacionado ao gene *mecA*, segundo Bal et al. (2016) os MRSA pertencentes ao CC130 e ST425 são resistentes devido à presença do gene *mecC*, não testado para as amostras estudadas uma vez que nunca foi descrito no Brasil.

Acreditava-se que ST398, associada com o *spa* tipo t011 (SILVA et al, 2014), tenha sido inicialmente disseminada de suínos para outras espécies (VOSS et al., 2005; GOMEZ-SANZ et al., 2010). No entanto essa estirpe é a causa principal de infecções por MRSA associadas ou adquiridas na comunidade em alguns países Europeus, e já foi reportada em humanos na América do Norte (GOLDING et al., 2010), além da presença descrita em animais de produção, especialmente em suínos e criadores de suínos. Sua rápida disseminação tem sido favorecida por pressão seletiva do uso de antibióticos em animais como as tetraciclinas e cefalosporinas, especialmente o uso sem prescrição. Esse LA-MRSA é um risco ocupacional para fazendeiros e veterinários e em países, como a Noruega e Dinamarca, com alta densidade populacional de animais de produção e baixa prevalência de MRSA na população humana existe maior risco de disseminação para a população em geral. Enquanto na maioria dos países, relativo ao total de infecções por MRSA a infecção por ST398 não é risco grande à saúde pública (GUARDABASSI et al., 2013).

Segundo Guardabassi, Stegger e Skov (2007) não estava bem esclarecido se a origem de ST398 era humana ou animal. Em um estudo posterior deste grupo, a caracterização fenotípica e genotípica de amostras históricas e contemporâneas de *S.aureus* proveniente de suínos, levaram à teoria atual de que a estirpe não se originou nessa espécie, uma vez que foi associada na sua maioria ao biovar ovino que não esteve presente nas amostras históricas (ESPINOSA-GONGORA et al., 2014). Essa teoria já tinha sido proposta por Price et al. (2012) que estudaram a filogenia do CC398 de modo a concluir que o LA-MRSA desse complexo clonal se originou de MSSA proveniente de humanos e que após o salto de humanos para animais de produção, adquiriu resistência a tetraciclina e meticilina, provavelmente por seleção antimicrobiana. Outro fato que apoia a teoria de origem humana do ST398 é o de que o biovar humano foi exclusivo das amostras mais antigas e tem uma característica fenotípica de crescimento no cristal violeta semelhante ao biovar ovino (ESPINOSA-GONGORA et al., 2014)

Duas hipóteses para a baixa prevalência de genótipos associados a esse complexo clonal no presente estudo são: a competição com outras estirpes de MSSA circulantes e bem-sucedidas (GOLDING et al. 2010) e, a possibilidade do estabelecimento tardio de ST398 nas Américas (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010). Outra hipótese proposta é da disseminação de MRSA

por outras estirpes, relacionadas aos seres humanos, aos bovinos. Nesse caso a prevalência de MRSA seria mais frequente em rebanhos menos tecnificados, diferente do que ocorre no sudeste brasileiro de onde vieram a maioria das amostras do presente estudo e de onde há apenas um relato que provavelmente foi uma ocorrência isolada em um rebanho. E à semelhança do que ocorre na Europa e nos rebanhos do nordeste brasileiro, onde a prevalência desse patógeno foi alta. Ainda que os resultados de Oliveira et al (2016) não comprovem essa teoria, os autores não a descartam pois isso pode ter ocorrido por limitações na amostragem de *S. aureus* proveniente de humanos no estudo. Portanto, a situação epidemiológica de MRSA em espécies potencialmente disseminadoras deve ser monitorada constantemente, como é o caso dos bovinos do Brasil, especialmente a partir da descrição em 2014 e mais recentemente em 2016.

Os genótipos que podem estar relacionadas à terceira hipótese pertencem ao CC97, já descrito em animais de produção, mas amplamente disseminado em humanos e, portanto, também conhecido como CA-MRSA (BAL et al. 2016). Enquanto CC398 após o salto de humanos para animais de produção adquiriu resistência a meticilina; o oposto ocorreu com CC97, que se originou de MSSA bovino e adquiriu *SCCmec* após o salto de bovinos para humanos e adaptação ao novo hospedeiro (SPOOR et al., 2013). Estirpes de *S. aureus* pertencentes ao CC97 são uma das principais causas de mastite na Europa, Ásia e Américas (SMITH et al., 2005; SMYTH et al., 2009) e pode apresentar-se sensível ou resistente à meticilina (FELTRIN et al., 2016). Esse complexo clonal depois de se adaptar ao ser humano disseminou-se rapidamente de maneira epidêmica e até mesmo pandêmica (ESPINOSA-GONGORA et al., 2014). Diferente do que ocorre com o ST398 que apresenta infecção transiente e não é prontamente transmitido entre humanos, provavelmente devido a perdas de expressão de proteínas de parede associadas a colonização e transmissão no ser humano, ao adaptar-se ao novo nicho (UHLEMANN et al., 2012).

O gene *mecA* foi encontrado em outras espécies de estafilococos, os MRNAS, (*methicillin-resistant non-aureus staphylococci*), causadores de mastite bovina no Brasil (DOS SANTOS et al., 2016) e no mundo (HOLMES; ZADOKS, 2011). Esse fato não pode ser ignorado uma vez que a rara transferência horizontal de *SCCmec* de outras espécies de estafilococos para *S. aureus* pode ocorrer e levar à emergência de novos tipos de *SCCmec* na espécie, como acredita-se que tenha ocorrido para o surgimento dos CA-MRSA (HIRAMATSU et al., 2013). Estudos no Japão mostram que os *SCCmec* dos tipos IV e V, associados com CA-MRSA, estão amplamente distribuídos em *S. epidermidis* resistente a meticilina em crianças saudáveis (HISATA et al., 2005; JAMALUDDIN et al., 2008). E um estudo recente em outros países revelou que o tipo IV está amplamente distribuído em *S. epidermidis* na comunidade e

ainda o tipo V em *S. haemolyticus* (RUPPÉ et al., 2009), o que indica que os MRNAS podem ser reservatórios para transferência horizontal de novos tipos de SCCmec.

Para que características como a resistência bacteriana e transmissão entre as espécies possam ser monitoradas, a caracterização genotípica é essencial. A identificação dos clones presentes na população permite melhorar o controle de clones emergentes. Além de ser muito utilizado em surtos para diferenciar linhagens com relação próxima. No sistema de vigilância de MRSA da Dinamarca, por exemplo, desde 2006 é obrigatória a notificação e todos os isolados e desde 2007 estes são genotipados por *spa* Typing (SPOOR et al., 2013). Isso permite a identificação de tendências nos genótipos obtidos como a observação da frequência de uma estirpe no país ao longo do tempo e a adaptação desta aos hospedeiros.

O desenvolvimento de sistemas de genotipagem tem contribuído para a compreensão da disseminação de diversos agentes infecciosos e é fundamental para a vigilância epidemiológica de diversas espécies bacterianas (COOPER, FEIL, 2004). Os sistemas baseados em DNA buscaram solucionar problemas das técnicas fenotípicas no que diz respeito aos três principais critérios utilizados para avaliar sistemas tipagem: a habilidade de tipagem, reprodutibilidade e poder discriminatório (MULLIGAN; MASLOW; ARBEIT, 1993). Entre os sistemas de genotipagem existentes, como o PFGE que é padrão ouro para surtos de MRSA (STROMMINGER et al, 2006), e o MLST que é o padrão ouro para estudos populacionais (MAIDEN et al., 1998), no presente estudo foi elegido o *spa* Typing. Esse sistema, específico para *S. aureus*, além da sua simplicidade, rapidez e menor custo, pode ser utilizado tanto para investigações locais de curto prazo quanto para investigações globais de longo prazo (Koreen et al., 2004).

Estudos de tipagem molecular em bovinos no Brasil foram realizados por *spa* Typing (LANGE et al. 1999; AIRES-DE-SOUZA et al. 2007. SILVA et al., 2013 e (ACOSTA et al., 2013), por MLST (RABELLO et al.,2007; SILVA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016) e por PFGE (RABELLO et al.,2007; SILVA et al., 2013). No primeiro estudo de LANGE et al. (1999), realizado no Sul do país, a técnica foi utilizada sem análise das sequências, apenas comparando o tamanho das bandas obtidas após amplificação da proteína A. Assim, quando comparada com as demais técnicas avaliadas no estudo: macrorestrição, amplificação do gene *coa* e comparação das bandas obtidas após amplificação e tipagem por rRNA spacer, teve o menor poder discriminatório. No estudo de Aires-de-Souza et al. (2007), no sudeste brasileiro, amostras de diversas espécies produtoras de leite foram genotipadas por *spa* typing. Em 2013, Silva et al. avaliaram a distribuição genotípica de MSSA isolados de bovinos no sudeste brasileiro, por *spa* Typing e por MLST. O PFGE foi também realizado em uma amostra

representante de cada *spa* tipo obtido. Na região nordeste, Acosta et al. (2013) comparou o tamanho das bandas obtidas por *spa* typing *coa* typing e *rRNA spacer* typing, à semelhança do Lange tinha feito em 1999, sem realização de análise das sequências.

O *spa* Typing foi utilizado em animais que não os bovinos apenas por Aires-de-Souza et al. (2007) no Brasil. Enquanto nos seres humanos o método também é pouco empregado no país. Foi utilizado em um estudo da diversidade molecular de *S. aureus* proveniente de carregadores nasais de saudáveis com mais de um ano de idade, na população da região de Botucatu (PIRES et al., 2014); de carregadores nasais no ambiente hospitalar, com isolados provenientes de pacientes neonatos e pediátricos internados em Goiânia (VIEIRA et al. 2014) e de crianças de uma creche na mesma cidade (LAMARO-CARDOSO et al., 2009); de pacientes antes e depois de serem submetidos a transplante de fígado em São Paulo (DE OLIVEIRA et al., 2015); e de pacientes em hospitais do Recife, dos quais foram obtidos MRSA sensível à oxacilina (ANDRADE-FIGUEIREDO; LEAL-BALBINO, 2016). Em todos os casos os estudos envolviam MRSA e buscavam entender a distribuição genotípica de isolados com essa característica.

No presente estudo os tipos obtidos foram semelhantes aos encontrados em MSSA por Silva et al. (2013) em bovinos, no estado de São Paulo. Para estes autores dentre os 56 MSSA estudados, os genótipos mais frequentes em rebanhos bovinos também eram t605 e t127. Contudo as frequências eram semelhantes com t127 mais frequente, seguido de t605, enquanto no presente estudo t605 destaca-se como mais frequente. O terceiro genótipo mais frequente no presente estudo, t002, também foi identificado por Silva et al (2013) em uma amostra. A frequência dos genótipos difere da encontrada por Aires-de-Souza (2007) no Rio de Janeiro, no entanto, havia um número limitado de amostras neste estudo. Para os autores os tipos mais encontrados foram t359 e t267 que estão relacionados ao CC do MLST ligado a LA-MRSA foram o quarto e quinto genótipos mais encontrados no presente estudo, respectivamente. Os resultados obtidos por Lange et al., (1999) e Acosta et al., (2014) não foram comparáveis pois não foi realizada a análise de sequências nestes estudos, permitindo apenas a comparação das estirpes dos próprios estudos.

Extrapolando para a comparação com resultados obtidos no MLST de isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina no sudeste brasileiro, por Rabello et al (2007), a maioria dos isolados pertenceu ao t605/CC126, também mais frequente dentro das amostras do presente estudo, seguido pelo CC97, que corresponde ao t267 e t369, com 4,61% e 3,79% de frequência, respectivamente, sendo o quarto e quinto genótipos mais encontrados no presente estudo. Isolados dos t002/CC5 e t127/CC1, que ocupam a segunda e terceira posições no presente

estudo, foram encontrados também no estudo de Rabello et al. (2007), com menor frequência. Já no estudo de Oliveira et al (2016), que identificaram MRSA em rebanhos bovinos no nordeste, a frequência dos tipos obtidos não foi fornecida, mas estavam presentes ST126, ST97, ST1 e ST5. Já em relação aos estudos que utilizaram o PFGE, também não foi possível discutir os dados obtidos uma vez que a subjetividade na interpretação e variação da técnica mesmo quando há padronização impedem a comparação entre laboratórios.

A correspondência dos tipos obtidos por MLST e *spa* Typing é possível ainda que geralmente muitos *spa* tipos são atribuídos a cada ST e a correspondência destes não está totalmente descrita ou embasada o suficiente para que esteja disponível no mapa de correspondência do *Ridom Server* (<http://spaserver2.ridom.de/mlst.shtml>). O inverso também pode ocorrer e um mesmo *spa* ter mais de um ST atribuído a ele em diferentes estudos. A correspondência, portanto, deve ser feita com cautela pois problemas de classificação podem ocorrer para algumas linhagens. Estirpes de MLST/CCs distantes já foram agrupadas em um *spa* tipo (STROMMINGER et al., 2008), o que pode ocorrer por substituições grandes no cromossomo englobando o gene *spa*, como descrito para os ST239 e ST34 (ROBINSON; ENRIGHT, 2004).

Em relação aos *spa* tipos mais prevalentes no estudo a correspondência com o MLST é a seguinte: t605/ST126/CC126 (SILVA et al. 2013) ou ST694 (SMYTH 2009); t127/ST1/CC1 (<http://spa.ridom.de/mlst.shtml>); t002/ST5/CC5 (<http://spa.ridom.de/mlst.shtml>, SILVA et al. 2013) também descrita como ST-231/CC5 (<http://spa.ridom.de/mlst.shtml>). Segundo Weinert et al (2012) o ST1 e o ST5 derivam de um ancestral de origem humana enquanto o ST126/694 deriva de um ancestral de origem bovina. No tocante aos isolados MDR mais frequentes, o t359 e o t267 relacionado a ele, já foram descritos como ST352/CC97. Assim como o ST126/264, os membros do CC97 se originaram de ancestrais extremamente hospedeiro-específicos, identificados então, apenas em bovinos e não identificados em cabras e ovinos (WEINERT et al., 2012). Já o t002 também encontrado com frequência nos isolados MDR com dito anteriormente está relacionado com o ST5. Por último, a semelhança de 98-100% nas 6 fazendas condiz com a tipagem por MLST. Os genótipos t021, t318 e t1130 foram descritos todos no CC30 (<http://spa.ridom.de/mlst.shtml>, BOSWIHI; UDO; AL-SWEIH, 2016), entre outros ST; os genótipos t002, t5325 e t105 todos descritos no CC5 (Ridom, HAFER et al., 2012); e os genótipos t2279 e t3471 ao CC1 (KINNEVEY et al., 2014; YAN et al., 2016).

Segundo Fitzgerald et al. (2012), estudos de genética populacional mostram que a maioria das estirpes de *S. aureus* são específicas para um hospedeiro e há baixa transmissão entre hospedeiros de espécies diferentes. Algumas exceções relatadas são o ST398, ST97 e o

ST5, esse último fez um salto de hospedeiro humano para animal e, assim como o ST398, e tem alto tropismo e adaptação nas aves (LOWDER et al., 2009). A alta prevalência de t605 sugere que essa seja uma estirpe bem adaptada ao hospedeiro na região estudada. A ausência de MRSA nessa estirpe pode corroborar a teoria de Golding et al. (2010) de que estirpes de MSSA circulantes e bem-sucedidas podem impedir que MRSA se disseminem na população. A ausência de relatos de MRSA no sudeste brasileiro após da única identificação de ST398 em um rebanho no estado de São Paulo por Silva et al. (2014) é mais uma evidência disso. Também pode ser uma explicação porque nenhum dos *spa* tipos relacionados ao LA-MRSA ST398: t011, t034, t108, t567, t571, t889, t1254, t1255, t1730, t1793, t2876, t2922 e t4838 (ESPINOSA-GONGORA et al., 2014) foi encontrado no presente estudo.

Enquanto em relação aos *spa* tipos relacionados ao CC97, também considerados LA-MRSA, do ST97: t4795, t1730, t1236, t2112, t267, t345, t3992, t5487 e t426; do ST71: t524 e do ST352: t359 e t267; alguns estiveram presentes dentre as amostras estudadas. Foram os *spa* tipos t26 e t359 identificado tanto como MRSA e MSSA em suínos, bovinos e humanos (FELTRIN et al., 2016). O interessante é que isolados dos tipos t359 e t267, que se comparados com ponto de corte 99% seriam da mesma linhagem, estiveram entre os identificados como MDR no presente estudo. Já o isolado do tipo t5487 está entre isolados que parecem se relacionar de maneira mais distante, não sendo possível comparar sua sucessão de repetições com as demais identificadas e apenas com ponto de corte $\leq 96\%$ seria considerado da mesma linhagem que outras amostras. A dinâmica de mudança de hospedeiros ocorreu múltiplas vezes desde a domesticação (WEINERT et al., 2012) e existe a possibilidade de que esses clones relacionados ao salto de hospedeiro bovino para humano e adaptação neste, poderiam ser transmitidos de volta para bovinos. Resta saber se essa transmissão geraria uma infecção transiente e ineficiente transmissão de bovino para bovino, assim como a transmissão do C398 de volta para humanos gerou nesse hospedeiro.

O ideal para que tendências como essa fossem monitoradas seria ter um padrão para agrupar *spa* tipos relacionados em linhagens ou complexos clonais, com distância entre si medida de acordo com a frequência das variações como adições, deleções, substituições e duplicações de repetições. Assim o banco de dados existente para o *spa* Typing, que já supera o do MLST, poderia ser uma ferramenta melhor empregada para estudos de macrovariação, assim como é empregado para estudos de microvariação para os quais maior discriminação é necessária. Dessa forma seria possível melhorar a vigilância epidemiológica dos micro-organismos com características de implicância na saúde animal e pública como o perfil de resistência, o potencial zoonótico e de mudança e adaptação a novos hospedeiros, e assim como

relatado por Spoor et al., (2013), a capacidade de disseminação pandêmica das amostras. A identificação de clones relacionados a essas características é essencial para melhorar o tratamento, a prevenção e o controle da transmissão de *S. aureus* causador de mastite bovina, além de outras infecções causadas por esse patógeno.

7. CONCLUSÕES

Por meio da caracterização fenotípica das amostras foi possível identificar uma baixa prevalência de multirresistência nos 412 isolados estudados durante os 22 anos;

O *spa* tipo mais frequente foi o t605 com grande disparidade em relação ao t002, o segundo genótipo mais frequente, seguido pelo t127, este terceiro com frequência próxima;

O quarto e quinto genótipos mais encontrados, t267 e t369 correspondem ao CC97 frequentemente encontrado em animais de produção e associado à CA-MRSA. Nenhum dos *spa* tipos obtidos corresponde ao CC398, principal associado à LA-MRSA;

Além dos 44 *spa* tipos obtidos, 7 sucessões de repetições não estavam presentes no banco de dados e possivelmente são tipos nunca antes descritos;

Não houve associação entre a distribuição dos *spa* tipos e as variáveis analisadas de ano, estado, município e fazenda, e perfil de resistência aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G. da; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-ng=pt&nrm=iso&tlng=en>.
- ACOSTA, A.; GUELFER, E.; RUIZ, A.; MOTA, R. a.; UFFO, O.; GOMES-FILHO, M. a.; BARBOSA, S. B. P. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Pernambuco State, Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 4, p. 1037–1041, 2013. Disponível em: <doi: 10.1007/s00580-013-1739-z>.
- ADCOCK, P. M.; PASTOR, P.; MEDLEY, F.; PATTERSON, J. E.; MURPHY, T. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 2, p. 577–580, 1998. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=20031820476&partnerID=40&md5=fa19446aa265c428337ef0b871735a6f>>.
- 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**, v. 16, n. 1, p. 115, 2016. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0733-4>>.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C.; RODICIO, M. R. Molecular basis of antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from young healthy carriers in Spain. **Microbial Pathogenesis**, v. 74, n. 1, p. 8–14, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.06.005>>.
- ATKINS, K. L.; BURMAN, J. D.; CHAMBERLAIN, E. S.; COOPER, J. E.; POUTREL, B.; BAGBY, S.; JENKINS, A. T. A.; FEIL, E. J.; VAN DEN ELSEN, J. M. H. S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1600–1611, 2008.
- BAL, A. M.; COOMBS, G. W.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, J. A.; NIMMO, G. R.; TATTEVIN, P.; SKOV, R. L. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, p. 95–101, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.004>>.
- BARHEMA, H. W.; DE VliegHER, S.; PIEPERS, S.; ZADOKS, R. N. Herd level approach to high bulk milk somatic cell count problems in dairy cattle. **The Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 2, p. 82–93, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706026>>.
- BARHEMA, 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. 1877–95, 2006. Disponível em: <<http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030206722561/fulltext>>.
- BASANISI, M. G.; LA BELLA, G.; NOBILI, G.; FRANCONIERI, I.; LA SALANDRA, G.

Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. **Food Microbiology**, v. 62, p. 141–146, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002016301034>>.

BEN SAID, M.; M.S, A.; BIANCHINI, V.; SGHAIER, S.; CREMONESI, P.; ROMANÒ, A.; GUALDI, V.; A, H.; LUINI, M. Genetic characterization and antimicrobial-resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tunisia. **Letters in Applied Microbiology**, p. 473–481, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/lam.12672>>.

BEURON, D. C.; CORTINHAS, C. S.; BOTARO, B. G.; MACEDO, S. N.; GONÇALVES, J. L.; BRITO, M. A. V. P.; SANTOS, M. V. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 947–952, 2014.

BLOWEY, R W; EDMONDSON, Peter. **Mastitis control in dairy herds**. Cabi, 2010.
George, L. W., Divers, T. J., Ducharme, N., & Welcome, F. L. (2007). **Diseases of the teats and udder**. In: *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2, 327-394.

BOSWIHI, S. S.; UDO, E. E.; AL-SWEIH, N. Shifts in the clonal distribution of methicillin-resistant staphylococcus aureus in Kuwait hospitals: 1992-2010. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1992–2010, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 62 de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de dezembro de 2011. Seção 1, p.6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRENNAN, G. I.; ABBOTT, Y.; BURNS, A.; LEONARD, F.; MCMANUS, B. A.; O'CONNELL, B.; COLEMAN, D. C.; SHORE, A. C. The emergence and spread of multiple livestock-associated clonal complex 398 methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococcus aureus strains among animals and humans in the Republic of Ireland, 2010-2014. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–11, 2016.

BRITO, M. A. V. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 51, n. 2, p. 129-35, 1999.

CASTELANI, L.; SANTOS, A. F. S.; DOS SANTOS MIRANDA, M.; ZAFALON, L. F.; POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P. Molecular Typing of Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* Isolated from Heifers and Cows. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 2, p. 4326–33, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3588101&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Centers for Disease Control and Prevention. (2004) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control* **32**, 470–485.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 781–791, 1997.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 1080–6040, p. 178–182, 2001.

Clinical Laboratory Standards Institute. (2013a). *Performance Standards for Antimicrobial disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2*. Wayne, PA: CLSI

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. CLSI, Wayne, PA. Jan 2015.

CODY, A. J.; BENNETT, J. S.; MAIDEN, M. C. J. **Chapter 10 – multi-locus sequence typing and the gene-by-gene approach to bacterial classification and analysis of population variation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014. v. 41

COLLIGNON, P., COURVALIN, P., & AIDARA-KANE, A. (2008). 'Clinical importance of antimicrobial drugs in human health'. **Guide to antimicrobial use in animals**, 44-58.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. The phylogeny of *Staphylococcus aureus* - Which genes make the best intra-species markers? **Microbiology**, v. 152, n. 5, p. 1297–1305, 2006.

COSGROVE, S.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E.; SCHWABER, M.; KARCHMER, A.; CARMELI, Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 53–59, 2003. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/345476>>.

DA COSTA KREWER, C.; SANTOS AMANSO, E.; VENERONI GOUVEIA, G.; DE LIMA SOUZA, R.; DA COSTA, M. M.; APARECIDO MOTA, R. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 3, p. 511–518, 2015.

DE OLIVEIRA, L. M.; VAN DER HEIJDEN, I. M.; GOLDING, G. R.; ABDALA, E.; FREIRE, M. P.; ROSSI, F.; D' ALBURQUERQUE, L. C.; LEVIN, A. S.; COSTA, S. F. *Staphylococcus aureus* isolates colonizing and infecting cirrhotic and liver-transplantation patients: comparison of molecular typing and virulence factors. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 264, 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/264>>.

DE VliegHER, S.; FOX, L. K.; PIEPERS, S.; MCDougALL, S.; BARKEMA, H. W. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **J Dairy Sci**, v. 95, n. 3, p. 1025–1040, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365187>>.

DEVRIESE, L. A., AND HOMMEZ, J. (1975). Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. **Res. Vet. Sci.** 19, 23–27.

DEVRIESE, L. A. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 2, p. 215-220, 1984.

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; SABOUR, P.; LEPP, D.; PACAN, J. Influence of the genotype of *Staphylococcus aureus*, determined by pulsed-field gel electrophoresis, on dry-period elimination of subclinical mastitis in Canadian dairy herds. **The Canadian journal of veterinary research**, n. 519, p. 115–120, 2006.

DOS SANTOS, D. C.; LANGE, C. C.; AVELLAR-COSTA, P.; DOS SANTOS, K. R. N.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M. *Staphylococcus chromogenes*, a coagulase-negative staphylococcus species that can clot plasma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1372–1375, 2016.

DUFOUR, S.; DOHOO, I. R.; BARKEMA, H. W.; DESCÔTEAUX, L.; DEVRIES, T. J.; REYHER, K. K.; ROY, J.-P.; SCHOLL, D. T. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1283–300, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365211>>.

ESPINOSA-GONGORA, C.; MOODLEY, A.; LIPINSKA, U.; BROENS, E. M.; HERMANS, K.; BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F.; GUARDABASSI, L. Phenotypes and genotypes of old and contemporary porcine strains indicate a temporal change in the *S. aureus* population structure in pigs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–5, 2014.

ESTEVEZ EG, CARVALHO EC, COELHO FS. Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite. Resultados analíticos. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, Florianópolis, 2010.

FEIL, E. J.; COOPER, J. E.; GRUNDMANN, H.; ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C.; BERENDT, T.; PEACOCK, S. J.; SMITH, J. M.; MURPHY, M.; SPRATT, B. G.; MOORE, C. E.; DAY, N. P. J. How clonal is *Staphylococcus aureus*? **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 11, p. 3307–16, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=155367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FEIL, E. J.; ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: A comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 465–469, 2000. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033865030&partnerID=40&md5=bb8f74e0c7674f78d0bf632bc4b33f44>>.

FELTRIN, F.; ALBA, P.; KRAUSHAAR, B.; IANZANO, A.; ARGUDÍN, A.; MATTEO, D. *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 97 Lineage Spreading in Dairy Cattle and Pigs in Italy. v. 82, n. 3, p. 816–821, 2016.

FERGUSON, J. D.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 12, p. 5798–813, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024774>>. FITZGERALD, J. R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 4, p. 192–198, 2012.

FONTANA, V. L. D. S., GIANNINI, M. J. S. M., LEITE, C. Q. F., MIRANDA, E., ALMEIDA, A. M. F., FONTANA, C. A. P., ... & STELLA, A. E. (2010). Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da β lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia, Botucatu**, v. 17, n. 4, p. 552-559, 2010.

FRENAY, H. M.; BUNSCHOTEN, A. E.; SCHOOLS, L. M.; VAN LEEUWEN, W. J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; VERHOEF, J.; MOOI, F. R. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 60–64, 1996.

G.N. SOUZA, J.R.F. BRITO, E.C. MOREIRA, M.A.V.P. BRITO, M. V. G. B. S. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite [n. 1991, p. 1015–1020, 2009.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; GIRVAN, E. K.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HILL, R. L. R.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J.; HOLMES, M. A. Methicillin-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, 2011b.

GARCIA ALVAREZ, L.; WEBB, C. R.; HOLMES, M. a.; ÁLVAREZ, L. G.; WEBB, C. R.; HOLMES, M. A novel field-based approach to validate the use of network models for disease spread between dairy herds. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 12, p. 1863–74, 2011a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320373>>.

GHANBARI, F.; GHAJAVAND, H.; HAVAEI, R.; JAMI, M.-S.; KHADEMI, F.; HEYDARI, L.; SHAHIN, M.; HAVAEI, S. Distribution of *erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, n. 1, p. 62, 2016. Disponível em: <<http://www.advbiores.net/text.asp?2016/5/1/62/179184>>.

GOLDING, G. R.; BRYDEN, L.; LEVETT, P. N.; MCDONALD, R. R.; WONG, A.; WYLIE, J.; GRAHAM, M. R.; TYLER, S.; VAN DOMSELAAR, G.; SIMOR, A. E.; GRAVEL, D.; MULVEY, M. R. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 587–594, 2010.

GUARDABASSI, L.; LARSEN, J.; WEESE, J. S.; BUTAYE, P.; BATTISTI, A.; KLUYTMANS, J.; LLOYD, D. H.; SKOV, R. L. Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 2, p. 55–62, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.011>>.

GURJAR, A.; GIOIA, G.; SCHUKKEN, Y.; WELCOME, F.; ZADOKS, R.; MORONI, P. Molecular Diagnostics Applied to Mastitis Problems on Dairy Farms. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 3, p. 565–576, 2012.

HALLIN, M.; DEPLANO, A.; DENIS, O.; DE MENDONÇA, R.; DE RYCK, R.;

STRUELENS, M. J. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 127–133, 2007.

HALLIN, M.; FRIEDRICH, A. W.; STRUELENS, M. J. spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. **Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols**, p. 189-202, 2009.

HARAN, K. P.; GODDEN, S. M.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J. B.; SREEVATSAN, S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 688–695, 2012.

HEROLD, B. C.; IMMERGLUCK, L. C.; MARANAN, M. C.; LAUDERDALE, D. S.; GASKIN, R. E.; BOYLE-VAVRA, S.; LEITCH, C. D.; DAUM, R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 279, n. 8, p. 593–598, 1998.

HIRAMATSU, K.; ITO, T.; TSUBAKISHITA, S.; SASAKI, T.; TAKEUCHI, F.; MORIMOTO, Y.; KATAYAMA, Y.; MATSUO, M.; KUWAHARA-ARAI, K.; HISHINUMA, T.; BABA, T. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infect.Chemother.**, v. 45, n. 2093–2340 (Print), p. 117–136, 2013.

HISATA, K.; KUWAHARA-ARAI, K.; YAMANO, M.; ITO, T.; NAKATOMI, Y.; CUI, L.; BABA, T.; TERASAWA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; HISATA, K.; KUWAHARA-ARAI, K.; YAMANO, M.; ITO, T.; NAKATOMI, Y.; CUI, L.; BABA, T.; TERASAWA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; YAMASHIRO, Y.; HIRAMATSU, K. Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococci* among Healthy Japanese Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3364–3372, 2005.

HOLMES, M. A.; ZADOKS, R. N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 373–382, 2011.

HUBER, H.; KOLLER, S.; GIEZENDANNER, N.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 16, p. 7–10, 2010.

HUNTER P. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **J Clin Microbiol** 1990; 28: 1903-5

HWANG, S. Y.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; PARK, Y. H. spa typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 125–131, 2010.

IBGE 2014. Produção da Pecuária Municipal. Vol.42. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, p.1-39. Disponível em <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>

JAMALUDDIN, T. Z. M. T.; KUWAHARA-ARAI, K.; HISATA, K.; TERASAWA, M.; CUI, L.; BABA, T.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3778–3783, 2008.

JOHLER, S.; LAYER, F.; STEPHAN, R. Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained from bovine mastitis milk and pig carcasses. **Journal of food protection**, v. 74, n. 11, p. 1852–9, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054185>>.

JOO, Y. S.; FOX, L. K.; DAVIS, W. C.; BOHACH, G. a.; PARK, Y. H. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 131–138, maio 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113500003813>>.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, É., JÁNOSI, S., SOMOGYI, P., DÁN, Á., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L., VAN DUIJKEREN, E., & WAGENAAR, J. A. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 630–632, 2007.

KADLEC, K.; FESSLE, A. T.; HAUSCHILD, T.; SCHWARZ, S. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. Table 1, p. 745–755, 2012.

KAHL, B. C.; MELLMANN, A.; DEIWICK, S.; PETERS, G.; HARMSSEN, D. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 502–5, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=540147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KHAN, S. A., NAWAZ, M. S., KHAN, A. A., STEELE, R. S., & CERNIGLIA, C. E. Characterization of erythromycin-resistant methylase genes from multiple antibiotic resistant *Staphylococcus* spp isolated from milk samples of lactating cows. **American journal of veterinary research**, v. 61, n. 9, p. 1128–1132, 2000.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A New Class of Genetic Element , *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec , Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* A New Class of Genetic Element , *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec , Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus au*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549–1555, 2000.

KINNEVEY, P. M.; SHORE, A. C.; BRENNAN, G. I.; SULLIVAN, D. J.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; COLEMAN, D. C. Extensive genetic diversity identified among sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered in Irish hospitals between 2000 and 2012. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 1907–1917, 2014.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE, J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S.; HARRISON, L. H.; LYNNFIELD, R.; CRAIG, A. S.; ZELL, E. R.; FOSHEIM, G. E.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; FRIDKIN, S. K. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. v. 298, n. 15, p. 1763–1771, 2007.

KONEMAN, E. *et al.* *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.

KOREEN, L., RAMASWAMY, S. V., GRAVISS, E. A., NAIDICH, S., MUSSER, J. M., & KREISWIRTH, B. N. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro-and macrovariation. **Journal of Clinical Microbiology**, v 42(2), pp. 792-799.

KOWALSKI, A. P.; MABONI, G.; ESPINDOLA, J. P.; FOLETTO, A.; JUNIOR, G. B.; PÖTTER, L.; BOTTON, S. A.; DE VARGAS, A. C. Temporal profile of antimicrobial resistance exhibited by strains of *Staphylococcus* spp. isolated from cases of bovine mastitis for 20 years 1992-2011 | Perfil temporal da resistência antimicrobiana exibido por cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de caso. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 6, p. 1035–1041, 2015.

KWON, N. H.; PARK, K. T.; MOON, J. S.; JUNG, W. K.; KIM, S. H.; KIM, J. M.; HONG, S. K.; KOO, H. C.; JOO, Y. S.; PARK, Y. H. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 624–32, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16126781>>.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, V.; H, A. L.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino 1. v. 31, n. 12, p. 1059–1065, 2011.

LARSEN, J.; PETERSEN, A.; SØRUM, M.; STEGGER, M.; VAN ALPHEN, L.; VALENTINER-BRANTH, P.; KNUDSEN, L.; LARSEN, L.; FEINGOLD, B.; PRICE, L.; ANDERSEN, P.; LARSEN, A.; SKOV, R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in HHS Public Access. **Euro Surveill**, v. 20, n. 37, 2015.

LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin) - Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6489–6494, 2003.

LEKKERKERK, W. S. N.; VAN WAMEL, W. J. B.; SNIJDERS, S. V.; WILLEMS, R. J.; VAN DUIJKEREN, E.; BROENS, E. M.; WAGENAAR, J. A.; LINDSAY, J. A.; VOS, M. C. What is the origin of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 isolates from humans without livestock contact? An epidemiological and genetic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1836–1841, 2015.

LINDEMAN, C. J.; PORTIS, E.; JOHANSEN, L.; MULLINS, L. M.; STOLTMAN, G. A. Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002-2010. **J Vet Diagn Invest**, v. 25, n. 5, p. 581–591, 2013.

LOWDER, B. V; GUINANE, C. M.; BEN ZAKOUR, N. L.; WEINERT, L. A.; CONWAY-MORRIS, A.; CARTWRIGHT, R. A.; SIMPSON, A. J.; RAMBAUT, A.; NÜBEL, U.; FITZGERALD, J. R. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of

Staphylococcus aureus. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 106, n. 1091–6490 (Electronic), p. 19545–19550, 2009. Disponível em: <c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CStaphylokokken-PDFs%5CStaph-2009%5CLOWder et al.-Recent human-to-poultry host jump adaptation and pandemic spread of *S.aureus*.pdf>.

LOWY, F. D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**, 520–532.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140–5, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19708&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MATHEMA, BARUN, JOSE MEDIAVILLA, AND BARRY N. KREISWIRTH. Sequence analysis of the variable number tandem repeat in *Staphylococcus aureus* protein A gene. In: **Bacterial Pathogenesis: Methods and Protocols** (2008): 285-305.

MEHMETI, I.; BEHLULI, B.; MESTANI, M.; ADEMI, A.; NES, I. F.; DIEP, D. B. Antimicrobial resistance levels amongst staphylococci isolated from clinical cases of bovine mastitis in Kosovo. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 10, p. 1081–1087, 2016.

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. v. 38, n. 3, p. 1032–1035, 2000.

MLST website sited at the University of Oxford (Jolley & Maiden 2010, BMC Bioinformatics, 11:595). The development of this site has been funded by the Wellcome Trust. Disponível em <<http://pubmlst.org/saureus/>>. Acesso em: 09 jan 2017

Spa-MLST mapping Disponível em <<http://spaserver2.ridom.de/mlst.shtml>>. Acesso em: 09 jan 2017

MOON, J.-S.; LEE, a-R.; KANG, H.-M.; LEE, E.-S.; KIM, M.-N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y.-S.; KOO, H. C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 3, p. 1176–85, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17297092>>.

MULLIGAN, M. E.; MASLOW, J. N.; ARBEIT, R. D. Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 153–162, 1993.

MUNITA, J. M.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Evolving Resistance among Gram-positive Pathogens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 2, p. S48–S57, 2015.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, a; QUAGLIA, N. C.; PARISI, a; GRECO, G.; BELLACICCO, a L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G. V.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International journal of food microbiology**, v. 117, n. 2, p. 219–22, 30 jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17533002>>.

NURJADI, D.; OLALEKAN, A. O.; LAYER, F.; SHITTU, A. O.; ALABI, A.; GHEBREMEDHIN, B.; SCHAUMBURG, F.; HOFMANN-EIFLER, J.; VAN GENDEREN, P. J. J.; CAUMES, E.; FLECK, R.; MOCKENHAUPT, F. P.; HERRMANN, M.; KERN, W. V.; ABDULLA, S.; GROBUSCH, M. P.; KREMSNER, P. G.; WOLZ, C.; ZANGER, P. Emergence of trimethoprim resistance gene *dhfrG* in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 9, p. 2361–2368, 2014.

OLIVEIRA, C. J. B.; TIAO, N.; DE SOUSA, F. G. C.; DE MOURA, J. F. P.; SANTOS FILHO, L.; GEBREYES, W. A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and Identification of Novel Sequence Types. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 2, p. 97–105, 2016.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; JULIANO, S.; ANDRADE, T.; DIOMEDES, J.; C, A. O. C. M.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará 1. v. 31, n. 2, p. 104–110, 2011.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E.; JAYARAO, B. M. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 3, p. 337–355, 2011.

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.

PANTOSTI, A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. April, p. 127, jan. 2012. Disponível :<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321498&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. a. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42–7, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3989053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PATERSON, G. K.; LARSEN, A. R.; ROBB, A.; EDWARDS, G. E.; PENNYCOTT, T. W.; FOSTER, G.; MOT, D.; HERMANS, K.; BAERT, K.; PEACOCK, S. J.; PARKHILL, J.; ZADOKS, R. N.; HOLMES, M. A. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2809–2813, 2012.

PIRES, F. V.; DA CUNHA, M. D. L. R. D. 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**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

RABELLO, R. F.; MOREIRA, B. M.; LOPES, R. M. M.; TEIXEIRA, L. M.; RILEY, L. W.; CASTRO, A. C. D. 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.; SOUZA, C. R. V. M.; DUARTE, R. S.; LOPES, R. M. M.; TEIXEIRA, L. M.; CASTRO, A. C. D. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 9, p. 3211–9, set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107411>>.

RAMEL, C. Mini- and microsatellites. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. SUPPL. 4, p. 781–789, 1997.

Ridom SpaServer conceptualized and implemented by Ridom GmbH sequence data curated by SeqNet.org. Disponível em <<http://www.spaserver.ridom.de/>>. Acesso em: 09 jan 2017

ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C. Evolution of. **Society**, v. 186, n. 4, p. 1060–1064, 2004.

ROBLES, B. F.; NÓBREGA, D. B.; GUIMARÃES, F. F.; WANDERLEY, G. G.; LANGONI, H. Beta-lactamase detection in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 325–328, 2014.

RUPPÉ, E.; BARBIER, F.; MESLI, Y.; MAIGA, A.; COJOCARU, R.; BENKHALFAT, M.; BENCHOUK, S.; HASSAINE, H.; MAIGA, I.; DIALLO, A.; KOUMARÉ, A. K.; OUATTARA, K.; SOUMARÉ, S.; DUFOUR CQ, J. B.; NARETH, C.; SARTHOU, J. L.; ANDREMONT, A.; RUIMY, R. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 442–449, 2009.

SAID, K. B.; ISMAIL, J.; CAMPBELL, J.; MULVEY, M. R.; BOURGAULT, A. M.; MESSIER, S.; ZHAO, X. Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and spa typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 375–386, 2010.

SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467.

SANTIAGO-NETO, W.; MACHADO, G.; PAIM, D. S.; CAMPOS, T. De; BRITO, M. A. V. P.; CARDOSO, M. R. I. Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul 1. v. 34, n. 7, p. 613–620, 2014.

SCHERPENZEEL, C. G. M.; TIJS, S. H. W.; DEN UIJL, I. E. M.; SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; VELTHUIS, A. G. J.; LAM, T. J. G. M. Farmers' attitude toward the introduction of selective dry cow therapy. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 10, p. 8259–66, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216304623%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27448856>>.

SIMÕES, T. V. M. D., DE OLIVEIRA, A. A., TEIXEIRA, K. M., JÚNIOR, A. D. S. R., & FREITAS, I. M. (2013). Identificação laboratorial de *Staphylococcus aureus* em leite bovino. *Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju*.

SHOPSIN, B.; GOMEZ, M.; MONTGOMERY, S. O.; SMITH, D. H.; WADDINGTON, M.; DODGE, D. E.; BOST, D. A.; RIEHMAN, M.; NAIDICH, S.; KREISWIRTH, B. N.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HE, G. A.; HILL, B.; HOLLIS, R.; JARVIS, W. R.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MASLOW, J.; MCDOUGAL, L. K.; MILLER, J. M.; MULLIGAN, M. Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. v. 37, n. 11, p. 3556–3563, 1999.

SIEVERT, D. M.; RICKS, P.; KALLEN, A. J.; EDWARDS, J. R.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKIN, S. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2013. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S0899823X16001744>.

SILVA, N. C. C.; GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; JÚNIOR, a F.; GÓMEZ-SANZ, E.; GÓMEZ, P.; LANGONI, H.; RALL, V. L. M.; TORRES, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Letters in applied microbiology**, v. 59, n. 6, p. 665–9, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25236329>>.

SLATKIN, Montgomery. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 477–485, 2008.

SMITH, E. M.; GREEN, L. E.; MEDLEY, G. F.; BIRD, H. E.; FOX, L. K.; SCHUKKEN, Y. H.; KRUIZE, J. V.; BRADLEY, a J.; ZADOKS, R. N.; DOWSON, C. G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4737–4743, 2005. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-24744467373&partnerID=tZOtx3y1%5Cnhttp://jcm.asm.org/content/43/9/4737.short>>.

SMYTH, D. S.; FEIL, E. J.; MEANEY, W. J.; HARTIGAN, P. J.; TOLLERSRUD, T.; FITZGERALD, J. R.; ENRIGHT, M. C.; SMYTH, C. J. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 1343–1353, 2009.

SPOOR, L.; MCADAM, P.; WEINERT, L. A.; RAMBAUT, A.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M.; KEARNS, A. M.; LARSEN, A. F.; SKOV, R. L.; FITZGERALD, R. Livestock origin for a human pandemic clone of community- associated MRSA. **Mbio**, v. 13, n. 4, p. e00356-13, 2013.

STROMMENDER, B.; BRAULKE, C.; HEUCK, D.; SCHMIDT, C.; PASEMANN, B.; NÜBEL, U.; WITTE, W. spa typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 574–581, 2008.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WENIGER, T.; HARMSSEN, D.; FRIEDRICH, A. W.; WITTE, W. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2533–2540, 2006.

SULEIMAN, A. B.; UMOH, V. J.; KWAGA, J. K. P.; SHAIBU, S. J. Prevalence and antibiotic resistance profiles of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from bovine mastitic milk in Plateau State , Nigeria. v. 2, n. August, p. 264–270, 2012.

TAYLOR, J. Antimicrobial use in animals and its consequences for human health. **European Society of Clinical Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 119–124, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.1999.tb00523.x>>.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V; The Molecular Typing Working Group Of The Society For Healthcare Epidemiology Of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426–439, 1997.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. *Microbiologia. Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 20, p. 175-82.

UHLEMANN, A.-C.; PORCELLA, S. F.; TRIVEDI, S.; SULLIVAN, S. B.; HAFER, C.; KENNEDY, A. D.; BARBIAN, K. D.; MCCARTHY, A. J.; STREET, C.; HIRSCHBERG, D. L.; LIPKIN, W. I.; LINDSAY, J. a; DELEO, F. R.; LOWY, F. D. Identification of a Highly Transmissible Animal-Independent. **mBio**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2012.

VAN BELKUM, a; SCHERER, S.; VAN ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 2, p. 275–293, 1998.

VERAS, J. F.; DO CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; DOS SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 410–5, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206412>>.

VIEIRA V. PESSOA-JUNIOR, J. LAMARO-CARDOSO, Y. M. TERNES, M. C. P., R. M.; RE A. KIPNIS, S. S.; L., A.; RADE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in neonates and children attending a pediatric outpatient clinics in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 42–47, 2014. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1413867013002225/1-s2.0-S1413867013002225-main.pdf?%7B_%7Dtid=e0226a98-659e-11e5-b96b-00000aab0f6c%7B_%7Dacdnat=1443417054%7B_%7Dde805fe3a88e5610473227c380673210a>.

VOSS, A.; LOEFFEN, F.; BAKKER, J.; KLAASSEN, C.; WULF, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1965–1966, 2005.

VOSS, A.; DOEBBELING, B. N. Antimicrobial The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 5, p. 101–106, 1995.

WANG, D.; WANG, Z.; YAN, Z.; WU, J.; ALI, T.; LI, J.; LV, Y.; HAN, B. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p. 9–16, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.039>>.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 418–429, 2010.

WEIGEL, L. M. Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1569–1571, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1090956>>.

WEINERT, L. a.; WELCH, J. J.; SUCHARD, M. a.; LEMEY, P.; RAMBAUT, a.; FITZGERALD, J. R. 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.

YAN, X.; SCHOULS, L. M.; PLUISTER, G. N.; TAO, X.; YU, X.; YIN, J.; SONG, Y.; HU, S.; LUO, F.; HU, W.; HE, L.; MENG, F.; DONKER, T.; TSOMPANIDOU, E.; VAN DIJL, J. M.; ZHANG, J.; GRUNDMANN, H. The population structure of *Staphylococcus aureus* in China and Europe assessed by multiple-locus variable number tandem repeat analysis; clues to geographical origins of emergence and dissemination. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 60.e1-60.e8, 2016.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: Custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 577–585, 2007.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology letters**, v. 150, n. 1–2, p. 12–22, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376548>>

APÊNDICE A

Dendrograma agrupando pela metodologia upgma as sucessões de repetição, com os respectivos dados de ano de isolamento, fazenda, município e estado.

Dendrograma agrupando pela metodologia UPGMA as sucessões de repetição do genótipo t605, mais frequente, com os perfis de resistência, e dados de ano de