

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE REP-PCR NA ANÁLISE DE
ISOLADOS DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE MASTITE
BOVINA.**

BIANCA DA SILVA SOARES

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE REP-PCR NA ANÁLISE DE
ISOLADOS DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE MASTITE
BOVINA.**

BIANCA DA SILVA SOARES

Sob a orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza
e Co-orientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

636.2

S676a

T

Soares, Bianca da Silva, 1989-
Aplicação de técnicas de REP-PCR
na análise de isolados de
Staphylococcus aureus em amostras
de mastite bovina / Bianca da Silva
Soares - 2013.

46 f. : il.

Orientador: Miliane Moreira
Soares de Souza.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 32-41.

1. Bovino - Doenças - Teses. 2.
Mastite - Teses. 3. Stafilococos
áureos - Teses. 4. Bactérias -
Teses. I. Souza, Miliane Moreira
Soares de, 1970-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

Bibliotecário: _____

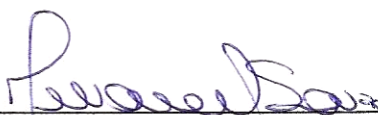
Data: ___/___/_____

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

BIANCA DA SILVA SOARES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

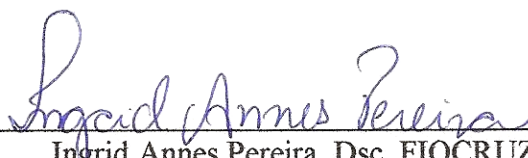
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2013



Miliane Moreira Soares de Souza. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)



Irene da Silva Coelho. Dsc. UFRRJ



Ingrid Annes Pereira. Dsc. FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a memória da minha
avó Luiza Fernandez, que está a me
proteger e torcer por mim junto com os
anjos no céu.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar-me pelo melhor caminho. Dando-me força, sabedoria, paciência e proteção durante essa etapa da minha vida.

Aos meus pais por todo o incentivo e por estarem presentes em todas as etapas da minha vida.

A professora Miliane Moreira Soares de Souza pela oportunidade e confiança dada e por toda a paciência em me ajudar na redação desta dissertação.

A professora Irene Coelho por toda a paciência e pela grande ajuda nas técnicas moleculares utilizada neste trabalho.

A professora Shana Mattos Coelho por ser minha “fada-madrinha” na vida científica. Por ter me proporcionado a chance de fazer estágio neste laboratório. E pelo apoio e conselhos durante toda essa jornada.

As amigas do LABAC-VET, Dayanne Melo e Tatiani Abreu pelos sábios conselhos, pelo ombro amigo, e por estarem sempre presentes tanto nos momentos de distração quanto nos de trabalho.

A todos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ pela amizade e incentivo em todos os momentos. Especialmente a Cássia Couto pela preocupação e por sempre estar disposta em ajudar.

As minhas amigas do curso de pós – graduação Letícia Vidal e Maristela Peckle por estarem presentes em todos os momentos.

Ao Curso de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ, e aos funcionários, pelas condições que recebemos para trabalhar e estudar. Em especial ao professor e coordenador José Luis Fernando Luque Alejos sempre disposto a nos ouvir e auxiliar no que precisamos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que direta e indiretamente contribuíram para conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Bianca da Silva Soares, filha de Djalma Soares da Cunha e Joana D'arc da Silva Soares, nascida em 10 de abril de 1989, na cidade de Barra do Piraí, estado do Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Municipal Castelo Branco e o ensino médio no Centro Educacional Miretta Baronto.

No ano de 2007 ingressou no Curso de Ciências Biológicas- Bacharelado, na Universidade Severino Sombra em Vassouras- RJ, diplomando-se em janeiro de 2011.

Foi aluna de iniciação científica do Laboratório de Insetos Vetores da Universidade Severino Sombra durante o período de fevereiro de 2008 a dezembro de 2010, sob orientação da Prof^a. PhD Marise Maleck de Oliveira Cabral. Período em que foi bolsista do programa interno PIBIC/USS.

Foi aprovada no Processo Seletivo de Seleção para o Curso de Ciências Veterinárias do Instituto de Veterinária da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2011, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2011 a fevereiro de 2013.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob orientação da Prof^a. Dr^a. Miliane Moreira Soares de Souza, em 2012, com início previsto para março de 2013.

RESUMO

SOARES, Bianca da Silva. **Aplicação de Técnicas de REP-PCR na Análise de Isolados de *Staphylococcus aureus* em amostras de Mastite Bovina.** 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Palavras-chave: mastite, *Staphylococcus aureus*, tipagem molecular

O *Staphylococcus aureus* é um importante agente causador de mastite bovina. Esta espécie bacteriana possui heterogeneidade genética e uma população caracterizada por estirpes geneticamente diversas. A análise da variação genética é uma importante ferramenta para fins de estudos epidemiológicos. No presente estudo, foi avaliada a diversidade genética de 56 *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino mastítico em sete propriedades da região Sul- Fluminense do Rio de Janeiro através das técnicas de ERIC e (GTG)₅-PCR. Foram testados 12 protocolos de ERIC-PCR, sendo selecionados três com maior poder discriminatório. Com o protocolo 01, obteve-se 6 agrupamentos com um poder discriminatório de 0,863. Observou-se a dispersão de isolados com similaridade genética em diferentes propriedades e presença de cepas clonais circulantes dentro da mesma propriedade e em propriedades de municípios diferentes. O protocolo 02 foi gerado afim de melhorar a performance da técnica e propiciou a obtenção de 15 agrupamentos com um poder discriminatório de 0,961, onde foi observada grande diversidade gênica e variabilidade entre os isolados. No entanto, o protocolo 02 não apresentou reprodutibilidade. Desse modo, foi testado um terceiro protocolo, obtendo-se 16 agrupamentos com um poder discriminatório de 0,96. A partir deste, também observou-se a dispersão de isolados com similaridade genética em diferentes propriedades e presença de cepas clonais circulantes em propriedades de municípios diferentes. Para a execução da técnica de (GTG)₅- PCR foram testados oito protocolos, elegendo-se apenas um de maior poder discriminatório. Este protocolo gerou 15 agrupamentos com um poder discriminatório de 0,957. Observou-se a dispersão de isolados com similaridade genética em diferentes propriedades e presença de cepas clonais circulantes em propriedades de municípios diferentes. Porém as tentativas subsequentes de execução da técnica não foram bem sucedidas o que indica a necessidade de ajustes em sua padronização em nosso laboratório de maneira a garantir que, uma vez otimizada, possa gerar resultados confiáveis e reprodutíveis. Os resultados obtidos foram comparados com uma tipagem molecular prévia através do PFGE que gerou 6 perfis genéticos distintos em 19 isolados testados. Apesar de produzirem um número elevado de perfis genéticos e um bom poder discriminatório, estas técnicas apresentaram pouca reprodutibilidade, especialmente quando comparadas com a técnica de PFGE.

ABSTRACT

SOARES, Bianca da Silva. **Use of REP-PCR for genetic diversity analyses of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis bovine.** 46 p. Dissertation (Master's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Key words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, typing molecular

Staphylococcus aureus is the most important etiologic agent of bovine mastitis. This bacterial species presents genetic heterogeneity and has a characterized population by genetically diverse strains. The analysis of genetic variation is an important tool for epidemiological studies. In this study, we assessed the genetic diversity of 56 *S.aureus* isolated from bovine mastitic milk in seven properties in south region the state of Rio de Janeiro by ERICPCR and(GTG)₅-PCR techniques. 12 protocols were tested by ERIC-PCR, selected three with higher discriminatory power. With protocol 01, was obtained 6 cluster with discriminatory power of 0,863. Observed the dispersion of isolates in different properties with genetic similarity and the presence of clonal strains circulating within the same state and properties indifferent cities. The protocol 02 was generated in order to improve the performance of the technique and provided to obtain 15 cluster with a discriminatory power of 0,961, where it was observed genetic diversity and variability between isolates. However, the protocol 02 showed no reproducibility. Thus, we tested a third protocol, obtained 16 cluster with a discriminatory power of 0,96. From this, also observe the dispersion of isolates in different properties with genetic similarity and the presence of clonal strains circulating in properties indifferent cities. To implement the technique (GTG)₅-PCR were tested eight protocols, electing only one of higher discriminatory power. This protocol generated 15 clusters with a discriminatory power of 0.957.Observed the dispersion of isolates in different properties with genetic similarity and the presence of clonal strains circulating in properties indifferent cities. But subsequent attempts to apply the technique were not successful which indicates the need for adjustments in their standard in our laboratory in order to ensure that, once optimized, can generate reliable and reproducible results. The results were compared to prior a molecular typing by PFGE that generated six distinct genetic profiles in 19 isolates tested. Despite producing a high number of genetic profiles and good discriminatory power, these techniques showed low reproducibility, especially when compared with the PFGE technique.

LISTA DE ABREVIACOES

BHI = Infuso Cerebro Corao
CMT = *California Mastitis Test*
DNA = cido desoxiribonuclico
dNTP= Desorribonucleotdeo trifosfatado
ERIC= *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*
G+C= Guanina+ Citosina
H₂O = gua
mg= Miligrama
min= Minuto
mL = Mililitros
MLST= *Multilocus Sequence Typing*
mM = Milimolar
MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente  meticilina
NaCl = Cloreto de sdio
ng= Nanogramas
pb= Pares de base
PCR = *Polymerase Chain Reaction*
PFGE = *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
RAPD= *Randomly Amplified Polimorphic DNA*
REP= *Repetitive Element Palindromic*

RFLP= *Restriction Fragment Length Polymorfism*
SCC_{mec}= Cassete *mec*
seg= Segundo
UPGMA= *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
V= Voltagem
µg = Micrograma
µL= Microlitro
°C = Graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do produto de amplificação do <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação do ERIC-PCR de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de diferentes fazendas utilizando o protocolo 01	14
Figura3	Dendograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando o protocolo 1 para técnica ERIC-PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.	15
Figura4	Eletroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação do ERIC-PCR de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de diferentes fazendas utilizando o protocolo 02	17
Figura 5	Dendograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando o protocolo 02 para técnica ERIC-PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.	17
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação do ERIC-PCR de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de diferentes fazendas utilizando o protocolo 03.	20
Figura 7	Dendograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando o protocolo 03 para técnica ERIC-PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.	21
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação do (GTG) ₅ -PCR de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de diferentes fazendas utilizando o protocolo relatado.	23
Figura 9	Dendograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando a técnica (GTG) ₅ -PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.	24
Figura 10	Padrão eletroforético do DNA cromossômico de <i>S.aureus</i> clivado com <i>Sma</i> I em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado.	26

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 <i>Primers</i> e ciclos empregados nos ensaios de amplificação	11

ÍNDICE DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Protocolos selecionados para técnica ERIC-PCR	14
Tabela 2	Origens e agrupamentos dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> gerados pelo perfil mostrado na Figura 02	16
Tabela 3	Origens e agrupamentos dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> gerados pelo perfil mostrado na Figura 04	18
Tabela 4	Origens e agrupamentos dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> gerados pelo perfil mostrado na Figura 06	22
Tabela 5	Origens e agrupamentos dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> através da técnica de (GTG) ₅ -PCR.	25
Tabela 6	Origens e perfis dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> gerados pelo perfil mostrado na Figura 10	27

SUMÁRIO

	Pág.	
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Caracterização da produção leiteira da Região Sul-Fluminense	3
2.2	Mastite bovina	3
2.3	Gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	3
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.3.1.1	Diversidade genética de <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.4	Técnicas para a análise da diversidade genética	5
2.4.1	REP- PCR (<i>Repetitive Element Palindromic</i>)	6
2.4.2	ERIC- PCR (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>)	6
2.4.3	(GTG) ₅ -PCR	7
2.4.4	PFGE (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)	8
3	OBJETIVOS	9
4	MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1	Amostragem- Seleção dos municípios e propriedades	10
4.2	Caracterização fenotípica dos <i>Staphylococcus aureus</i>	11
4.3	Extração de DNA dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
4.4	Caracterização genotípica de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
4.5	REP-PCR	11
4.5.1	ERIC-PCR (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>)	11
4.5.2	(GTG) ₅ -PCR	11
4.6	PFGE (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)	12
4.7	Análise da diversidade genética e do poder discriminatório	12
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1	Identificação genotípica dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	13
5.2	ERIC-PCR (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>)	13

5.3	(GTG) ₅ - PCR	23
5.4	PFGE (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)	26
5.5	Avaliação das técnicas	27
5.6	Análise da diversidade e dispersão do isolados de <i>S.aureus</i>	29
6	CONCLUSÃO	31
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8	ANEXOS	
I	Origem dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizados no presente estudo.	42
II	Protocolos com diferentes concentrações e condições para a padronização da técnica de ERIC- PCR para <i>Staphylococcus aureus</i> .	44
III	Protocolos com diferentes concentrações e condições para a padronização da técnica de (GTG) ₅ - PCR para <i>Staphylococcus aureus</i> .	46

1. INTRODUÇÃO

A região Sul-Fluminense vem se destacando como a maior e mais importante bacia leiteira do Estado do Rio de Janeiro. As pequenas propriedades produtoras de leite da região Sul-Fluminense possuem grandes deficiências que predisõem a ocorrência de agravos sanitários que comprometem a sanidade animal e a qualidade do produto, como por exemplo, a mastite bovina (SOUSA et al., 2011).

A mastite bovina é caracterizada por inflamação da glândula mamária, acarretando a diminuição de sua produção (TOZZETTI et al., 2008), gerando assim grandes prejuízos econômicos. Esse processo pode ser ocasionado por vários fatores, entre estes, as infecções bacterianas. Na mastite contagiosa, o agente é encontrado no úbere e é transmitido durante a ordenha (COSTA et al., 2000).

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes da mastite bovina contagiosa, com uma prevalência estimada entre 3 a 5%, espalhando-se em uma fazenda de vaca para vaca, durante o processo de ordenha por máquinas contaminadas, equipamentos, ou mãos dos ordenhadores (MORET-STALDER et al., 2009; ROESCH et al., 2007). Tal modelo de disseminação levanta a questão da transmissibilidade potencial de clones resistentes específicos ou determinantes de resistência antimicrobiana, bem como as possíveis vias de transmissão do animal para o homem ou vice-versa (CASSONE & GIORDANO, 2009; HAENNI et al., 2011; HATA et al., 2010).

O *S. aureus* está distribuído em populações constituídas de estirpes geneticamente diversas relacionadas à um ancestral comum (FEIL et al., 2003). Durante a última década, vários estudos moleculares têm descrito a estrutura da população e a diversidade desta espécie isolada da mastite bovina (HASMANN et al., 2010; IKAWATY et al., 2009; SMYTH et al., 2009). Alguns autores propõem que um número relativamente pequeno de *S. aureus*, amplamente distribuídos, sejam os responsáveis pela maioria dos casos de mastite bovina (HATA et al., 2010; SMITH et al., 2005). A análise da variação genética entre *S. aureus* isolados a partir de leite de bovino subsidia a investigação da relação destes com isolados de origem ambiental, como também, entre isolados de diferentes fazendas leiteiras, o que pode contribuir para a identificação das fontes de contágio e para o estabelecimento de medidas de prevenção (HATA et al., 2010).

A tipagem de microrganismos é importante para fins de estudos epidemiológicos, através da determinação de fontes de infecção, das vias de transmissão e do reconhecimento de estirpes que apresentam diferentes fatores de virulência. Especificamente no caso de *S. aureus*, a sua heterogeneidade genética considerável, em populações naturais, permite uma apurada investigação da disseminação de estirpes de origens humana e animal (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995).

Os métodos de tipagem molecular devem cumprir todos os critérios exigidos para serem considerados ótimos, incluindo desempenho (reprodutibilidade, capacidade de tipificação, estabilidade e poder discriminatório) e conveniência (rapidez, fácil acessibilidade e facilidade de interpretação) (GANDRA, E. A. et al., 2008; OLIVE & BEAN, 1999).

A técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) demonstra um elevado poder discriminatório, sendo considerada "padrão ouro" para a tipificação de isolados de *S. aureus* (BANNERMAN et al., 1999). Esta técnica é laboriosa e demorada, porém de boa reprodutibilidade, o que permitiu seu uso no desenvolvimento de estudos multicêntricos de *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) gerando redes de vigilância (MCDUGAL et al., 2003; MURCHAN et al., 2003; VAN BELKUM et al., 1998). O método tem sido aplicado para estudar o comportamento do *S. aureus* na mastite (ZADOKS et al., 2002; MIDDLETON

et al., 2002), para avaliar o efeito, a longo prazo, de sua persistência em rebanhos leiteiros (ANDERSON & LYMAN, 2006), e para estudar o relacionamento genético entre as estirpes mais virulentas (JØRGENSEN et al., 2005).

O conjunto de técnicas baseadas na amplificação das sequências de elementos repetitivos (REP-PCR) representa um método de fácil execução que utiliza *primers* voltados para as sequências repetitivas intercaladas dos genomas bacterianos (VERSALOVIC et al., 1994). Estas técnicas baseadas em PCR são mais fáceis, mais rápidas e de menor custo, em comparação com PFGE, porém também apresentam limitações.

A técnica de ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) utiliza *primers* que geram perfis específicos (*fingerprinting*) que podem ser utilizados para tipagem e identificação de espécies bacterianas (GILLINGS & HOLLEY, 1997; FARBER et al., 2001). Existem evidências de que estes elementos também existam no genoma de bactérias Gram-positivas. A posição dos elementos ERIC nos genomas varia nas diferentes espécies e tem sido utilizado como um marcador genético para caracterizar isolados dentro de uma espécie bacteriana (VERSALOVIC et al., 1991, SON et al., 2002).

O (GTG)₅-PCR é uma técnica de REP-PCR, que foi aplicada com sucesso para a classificação e identificação de vários grupos de bactérias, incluindo *Staphylococcus* spp. (DE VUYST et al., 2008; PAPALEXANDRATOU et al., 2009). Esta técnica permite a diferenciação em espécie, subespécie, e às vezes até nível de estirpe (PAPALEXANDRATOU et al., 2009; GEVERS et al., 2001). Em comparação com outras espécies microbianas, o *Staphylococcus* spp. geralmente possui um número menor de elementos de (GTG)₅ no seu genoma, refletindo em uma quantidade inferior de bandas em comparação com bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético. Embora isto possa parecer uma desvantagem para a classificação e identificação de *Staphylococcus* spp. através dessa técnica, isto resulta em uma amplificação típica com padrões de bandas com alta sensibilidade a pequenas variações genômicas.

O presente trabalho avaliou a diversidade genética de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina através das técnicas de ERIC e (GTG)₅-PCR em comparação com o PFGE, considerada a técnica padrão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização da produção leiteira da região sul-fluminense

A região Sul- Fluminense vem se destacando como a maior e mais importante bacia leiteira do Estado do Rio de Janeiro. De 2006 a 2010, a produção estadual de leite subiu de 420 milhões para 570 milhões de litros/ano. Estima-se que em 2011 a produção alcance 600 milhões de litros. Com uma produção anual de 166 milhões de litros e cerca de 4.200 produtores, a Região Sul-Fluminense ocupa o primeiro lugar, respondendo por 34% da produção estadual (DIARIO DO VALE, 2011).

Este setor representa uma grande fatia na economia da região, salientando-se que a maior parte do leite produzido nesta região é oriunda de pequenos produtores. Sousa e colaboradores (2011) em estudos que caracterizava pequenas propriedades produtoras de leite no Estado do Rio de Janeiro identificaram grandes deficiências relacionadas à infra-estrutura, às informações técnicas, controle da sanidade dos animais, ordenha higiênica e capacitação técnica dos ordenhadores. Tais deficiências predisõem a ocorrência de agravos sanitários que comprometem a sanidade animal e a qualidade do produto, como por exemplo, a mastite bovina.

2.2. Mastite Bovina

Dentre as enfermidades que acometem os bovinos leiteiros, a mastite é a mais frequente e acarreta maiores prejuízos à cadeia produtiva (RIBEIRO et al., 2003). Essa inflamação dos quartos mamários ocasiona lesões, inflamação e infecções por bactérias e outros microrganismos, gerando a diminuição da produção e secreção da glândula como um todo (TOZZETTI et al., 2008). Além da diminuição da quantidade do leite, a mastite provoca alterações na sua composição, principalmente no teor de lactose, gordura e proteína causando grande prejuízo econômico para o produtor (AIRES, 2010). Além disso, a transmissão de patógenos aos seres humanos e o desencadeamento de reações alérgicas, bem como efeitos tóxicos oriundos das alterações causadas pelo uso de antibióticos no controle da infecção, constituem um risco potencial à saúde dos consumidores (CASSOL et al., 2010). A epidemiologia desta enfermidade está vinculada à tríade: animal (hospedeiro), agente etiológico e meio ambiente, fazendo desta uma enfermidade multifatorial (PRESTES et al., 2002). Os fatores de risco relacionados a esta infecção podem ser individuais ou ambientais. Nos fatores individuais, estão incluídos os mecanismos de defesa do animal e a anatomia do teto e do úbere. Os ambientais estão relacionados com o tipo de clima da região, limpeza das instalações, alimentação e virulência dos microorganismos (WHIST et al., 2006).

Epidemiologicamente, os agentes etiológicos da mastite podem ser classificados em dois grupos: contagiosos e ambientais, de acordo com a fonte de infecção. Na mastite contagiosa, o agente é encontrado no úbere e é transmitido durante a ordenha. Na mastite ambiental, a vaca se infecta por microrganismos encontrados no meio ambiente (COSTA et al., 2000). Entre os agentes etiológicos, isolados com maior frequência nos casos de mastite contagiosa, destacam-se os estreptococos e os estafilococos, principalmente o *Staphylococcus aureus* (SILVA, 2003).

2.3. Gênero *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* spp. é composto por 40 espécies e 24 subespécies e são membros da família Staphylococcaceae (EUZEBY, 2007). Eles são cocos Gram-positivos, com 0,5 – 1,5 µm de diâmetro e baixo conteúdo G+C no genoma. Podem ocorrer sozinhos,

em pares, tétrades, pequenas cadeias (três a quatro células) ou irregulares, como cachos de uva. Eles são imóveis, catalase-positivos (com exceção de *S. aureus* subsp. *anaerobius*), resistentes à bacitracina, não esporulados e anaeróbios facultativos. As colônias normalmente são opacas e podem ser brancas ou cremes e algumas vezes amarelas. Geralmente, crescem em meios contendo NaCl a 10% e a temperatura ótima de crescimento se encontra entre 30°C e 37°C (BANNERMAN, 2003).

O gênero *Staphylococcus* spp. é subdividido em dois grupos, *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, com base na capacidade de produção da coagulase. A coagulase estafilocócica reage com uma substância presente no plasma, denominada de “fator de reação com a coagulase” (CRF), para formar um complexo que, por sua vez, reage com o fibrinogênio, formando fibrina e promovendo uma rápida aglutinação das células bacterianas (KONEMAN et al., 2008). Dentre os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos, o *S. aureus* destaca-se por ser considerado como a espécie mais virulenta e o mais importante agente causador de infecções intra mamárias (ZAFALLON et al., 2008).

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é o principal agente da mastite bovina contagiosa, com uma prevalência estimada entre 3 a 5%, espalhando-se em uma fazenda, de vaca para vaca, durante o processo de ordenha por máquinas contaminadas, equipamentos, ou mãos dos ordenhadores (MORET-STALDER et al., 2009; ROESCH et al., 2007). Tal modelo de disseminação levanta a questão da transmissibilidade potencial de clones resistentes específicos ou determinante resistência antimicrobiana, bem como as possíveis vias de transmissão do homem para o animal ou vice-versa (CASSONE & GIORDANO, 2009; HAENNI et al., 2011; HATA et al., 2010). O *S. aureus* é um patógeno oportunista colonizador de seres humanos e de numerosas espécies animais. Em bovinos, é responsável por cerca de um terço dos casos de mastite clínica e subclínica (BOTREL et al., 2010 ; BRADLEY et al., 2007).

Os *S. aureus* são capazes de causar infecções de longa duração com tendência de se tornarem crônicas, além de ocasionar grande perda na produção do leite (BENEDETTE et al., 2008). Altamente contagioso, o *S. aureus* é capaz de causar infecções por mais de 30 dias habitando feridas de tetos, mãos de ordenhadores e na glândula mamária de vacas infectadas, acarretando enormes prejuízos à pecuária leiteira, desde o comprometimento direto com a qualidade do leite até a perda severa da produção de leite (ZAFALON et al., 2007). Embora o *S. aureus* seja isolado a partir do corpo do animal e no ambiente de exploração leiteira, a glândula mamaria lactante é o principal reservatório desta bactéria (SMITH et al., 2005).

2.3.1.1. Diversidade genética de *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é uma espécie bacteriana bastante heterogênea (polimórfica) (FITZGERALD et al., 2001). Essa espécie pode adquirir o aumento da virulência e resistência antimicrobiana através da transferência horizontal de DNA e esses elementos móveis genéticos são mantidos em um plano genômico predominantemente clonal (FEIL et al., 2003). Acredita-se que a diversidade genética de *S. aureus* ocorra através de mutações genéticas, ao invés de recombinação extensivas no genoma.

As estirpes de *S. aureus* isoladas de leite mastítico e de diferentes locais do corpo em vacas leiteiras são geneticamente diversas. Estudos realizados em várias áreas do mundo demonstram que um pequeno subconjunto de estirpes é considerado responsável pelo desenvolvimento da maioria dos casos de mastite (JOO et al., 2001; MIDDLETON et al., 2002; ZADOKS et al., 2002; ZSCHÖCK et al., 2004; SMITH et al., 2005). A maioria dos

estudos demonstram que um dado rebanho normalmente alberga um número limitado de estirpes de *S. aureus*, muitas vezes com uma ou algumas estirpes predominantes (SOMMERHÄUSER et al., 2003; MØRK et al., 2005; RABELLO et al., 2007). A maioria das cepas detectadas em outros locais, como o úbere, tetos e pele diferem geneticamente das linhagens do leite mastítico, o que sugere que as cepas têm evoluído especializando-se em infectar o tecido intra-mamário (ZADOKS et al., 2002). *S. aureus* idênticos têm sido ocasionalmente isolados de vacas leiteiras e das mãos dos funcionários da linha de ordenha (JØRGENSEN et al., 2005), mas estirpes provenientes de mastite bovina geralmente representam um grupo geneticamente diferente das estirpes humanas, sugerindo especificidade dos hospedeiros (VAN LEEUWEN et al., 2005). Parte desta especificidade ou adaptação ao hospedeiro pode ser devido à aquisição ou perda de elementos móveis genéticos, que estão presentes nas diferentes estirpes (FITZGERALD & MUSSER, 2001). No entanto, Morket al. (2005) observaram genótipos comuns causadores de mastite em vacas, cabras e ovelhas, sugerindo especificidade de local anatômico em vez de especificidade de hospedeiros. E, além disso, outros estudos relatam a existência da transmissão direta de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) entre vacas e seres humanos (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007).

Durante a última década, vários estudos moleculares têm descrito a estrutura da população e a diversidade de *S. aureus* isolado de mastite bovina (HASMAN et al. 2010; IKAWATY et al. 2009; SMYTH, et al. 2009). Na maioria dos estudos de comparação das estirpes de origem humana e animal, pouca sobreposição foi encontrada entre as populações de *S. aureus*. Inicialmente foi proposto que um número relativamente pequeno de *S. aureus*, amplamente distribuídos, eram responsáveis pela maioria dos casos de mastite bovina (HATA et al., 2010; SMITH et al., 2005). No entanto, com o número cada vez maior de estudos em diversas localizações do mundo tem sido relatado agrupamentos de estirpes com prevalência local (JØRGENSEN et al., 2005; RABELLO et al., 2007).

A grande diversidade genética em populações de *S. aureus* é um dos maiores obstáculos para o tratamento de mastite. No Brasil dados que caracterizam o perfil molecular de isolados de *S. aureus* são muito limitados, especialmente considerando a importância do país mercado mundial de leite (KLEIN et al., 2012). A análise da variação genética entre *S. aureus* isolados a partir de leite de bovino é essencial nos estudos de mastite, pois a investigação da relação com os isolados de origem ambiental e de outras fazendas leiteiras leva à identificação das fontes de contágio bem como as formas de prevenir sua ocorrência (HATA et al., 2010).

2.4. Técnicas para a análise da diversidade genética

A tipagem de microrganismos é importante para fins de estudos epidemiológicos, na determinação de fontes de infecção, vias de transmissão de surtos das doenças e a presença de estirpes de diferentes fatores de virulência. Especificamente no caso de *S. aureus*, a sua considerável heterogeneidade genética, em populações naturais, permite uma apurada investigação da disseminação de estirpes de origens humana e animal (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995).

Diferentes métodos de tipagem são desenvolvidos para estudos epidemiológicos ou para a análise de características e relações genéticas e cada um possui vantagens e desvantagens. Portanto, é muito importante que a seleção de um método de tipagem seja ideal e sensível para cada finalidade (HATA et al., 2010). Os métodos de tipagem molecular devem cumprir todos os critérios exigidos para serem considerados ótimos, incluindo desempenho (reprodutibilidade, capacidade de tipificação, estabilidade e poder discriminatório) e conveniência (rapidez, fácil acessibilidade e facilidade de interpretação) (OLIVE & BEAN 1999).

A técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) demonstra um elevado poder discriminatório e é considerada "padrão ouro" para a tipificação de isolados de *S. aureus* (BANNERMAN et al., 1995). Esta técnica é laboriosa e demorada, porém a reprodutibilidade dos protocolos entre laboratórios foi alcançada, o que permitiu o desenvolvimento de estudos multicêntricos de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) gerando redes de vigilância (VAN BELKUM et al., 1998; MCDOUGAL et al., 2003; MURCHAN et al., 2003).

Técnicas tradicionais baseadas em PCR, em comparação com PFGE, são mais fáceis e mais rápidas, e cada vez menos caras de realizar-se. Porém também apresentam algumas limitações. Nos casos das técnicas de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) e da técnica de amplificação de sequências de elementos repetitivos (REP-PCR), a principal desvantagem é a padronização e a pouca reprodutibilidade entre laboratórios (DEPLANO et al., 2000; VAN BELKUM et al., 1998). O PCR baseado na análise do polimorfismo do tamanho de fragmento de restrição, previamente amplificados por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), possui poder discriminatório limitado como demonstrado através da análise do gene da coagulase (CHIOU, et al., 2000). Para superar essa desvantagem, métodos mais reprodutíveis nos quais se realiza o seqüenciamento dos fragmentos dos genes amplificados, tais como, a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) que caracteriza isolados bacterianos com base no polimorfismo de seqüência dentro dos fragmentos internos de sete genes constitutivos de *Staphylococcus* spp. (ENRIGHT & SPRATT, 1999) e a técnica de amplificação e seqüenciamento da região X da proteína A (gene *spa A*), que tornou-se um dos métodos principais para tipagem regional e programas nacionais de vigilância de MRSA (AIRES-DE-SOUSA, 2006; KOREEN et al., 2004).

2.4.1. REP- PCR (*Repetitive Element Palindromic*)

O conjunto de técnicas baseadas na amplificação das sequências de elementos repetitivos (REP-PCR) representa um método de fácil execução que utiliza *primers* voltados para as sequências repetitivas intercaladas dos genomas bacterianos (VERSALOVIC et al., 1994). Uma ampla variedade de sequências repetitivas têm sido encontrada entre diversas espécies de bactérias (VERSALOVIC & LUPSKI, 1999; ISHII & SADOWSKY, 2009). Alguns estudos foi demonstrado que o método REP-PCR não amplifica apenas regiões específicas repetitivas no DNA, mas provavelmente amplificam também as sequências semelhantes e arbitrárias, devido à baixa temperatura de anelamento utilizada nos protocolos de REP-PCR (DEPLANO, et al., 2000, WILSON e SHARP, 2006). Estes resultados vão contra o princípio deste método (VERSALOVIC et al., 1994) o que acarreta grande impacto sobre a aplicabilidade destes métodos para caracterização de cepas bacterianas. Os *primers* complementares BOX, ERIC, REP e (GTG)₅ são mais usados em REP-PCR aplicado nos estudos taxonômicos de bactérias. Estes métodos têm sido usados como ferramentas valiosas para a tipagem e identificação de bactérias, por exemplo: *Lactobacillus* spp. (GEVERS et al., 2001), *Enterococcus* spp. (SVEC et al., 2005), *Geobacillus* spp. (MEINTANIS et al., 2008), estreptomicetos (LANOOT et al., 2004) ou bactérias produtoras de ácido acético (DE VUYST et al., 2008). Porém apenas alguns estudos usando o método de REP-PCR para identificação de *Staphylococcus* spp. (KORENOVÁ et al., 2009; WIESER & BUSSE, 2000).

2.4.2. ERIC- PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

Como já relatado acima as técnicas moleculares baseadas em sequências de elementos repetitivos (REP-PCR) podem identificar diferenças nos isolados bacterianos (VAN DER ZEE et al., 1999; SPIGAGLIA & MASTRANTONIO, 2003). Este é um método simples e

rápido para distinguir estirpes estreitamente relacionadas e explicar as relações filogenéticas entre elas (DE BRUIJN et al., 1996). O aprimoramento destas metodologias possibilitou a identificação e a tipificação de microrganismos em nível de gênero, espécie, subespécie a partir de diferentes regiões do genoma (MARLONY et al., 2003). Estes elementos são conhecidas sequências genômicas, conservadas, repetitivas, como a técnica de ERIC-PCR (FARBER et al., 2001). Os *primers* de ERIC-PCR são utilizados para amplificar regiões entre estes elementos repetitivos por meio de PCR, gerando perfis específicos (*fingerprinting*) que podem ser utilizados para tipagem e identificação de espécies bacterianas (GILLINGS & HOLLEY, 1997). A técnica de ERIC-PCR tem apresentado resultados promissores na identificação de estirpes de bactérias Gram-negativas, tais como *Citrobacter diversus* (agora *Citrobacter koseri*) e *Rhizobium meliloti* (DE BRUIJN 1992; WOODS et al., 1992). Existem evidências de que estas sequências de elementos repetitivos também existam no genoma de bactérias Gram-positivas. Estudos anteriores, com apenas um *primer* correspondente à sequência de ERIC foi utilizado para a diferenciação de estirpes de *S. aureus* (VAN BELKUM et al., 1992). As sequências, de ERIC também são conhecidas como unidades de repetição intergênicas (IRUs) e estão presentes em muitas cópias nos genomas de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, e outras enterobactérias (HULTON et al., 1991). Estes elementos possuem 126 pb de comprimento, são altamente conservadas a nível de nucleotídeos, e incluem uma repetição invertida no núcleo central. A posição dos elementos ERIC nos genomas varia entre as diferentes espécies e tem sido utilizado como um marcador genético para caracterizar isolados dentro de uma espécie bacteriana (VERSALOVIC et al., 1991; SON et al., 2002). Na técnica de ERIC-PCR um padrão de bandas é obtido por amplificação do DNA genômico localizado entre os elementos ou entre outras sequências repetitivas do DNA. Gillings e Holley (1997) avaliaram a especificidade de perfis gerados com ERIC-PCR para várias espécies bacterianas, para bacteriófagos, fungos, invertebrados, plantas e vertebrados e verificaram perfis muito complexos para estes organismos. Os mesmos autores sugerem que a amplificação de fragmentos ERIC-PCR é extremamente influenciada pelas condições de reação, principalmente pela temperatura de anelamento dos *primers*, podendo muitas vezes levar a amplificação de sequências inespecíficas, não sendo necessariamente sequências ERIC.

2.4.3.(GTG)₅-PCR

(GTG)₅-PCR, é uma técnica de REP-PCR, que foi aplicada com sucesso para a classificação e identificação de vários grupos de bactérias tais como as bactérias do ácido láctico (GEVERS et al., 2001) e bactérias do ácido acético, e também *Staphylococcus* spp. (DE VUYST et al., 2008; PAPALEXANDRATOU et al., 2009). Esta técnica permite a diferenciação em espécie, subespécie, e às vezes até em nível de estirpe (GEVERS et al., 2001; PAPALEXANDRATOU et al., 2009). Em comparação com estas espécies microbianas, o *Staphylococcus* spp. geralmente possui um número menor de elementos de (GTG)₅, no seu genoma do que as espécies bacterianas acima mencionadas, refletindo em uma quantidade inferior de bandas geradas em comparação com bactérias de ácido láctico e bactérias do ácido acético. Apesar de este fato parecer uma desvantagem para a classificação e identificação de *Staphylococcus* spp. através da técnica de (GTG)₅-PCR isto resulta em uma típica amplificação com padrões de bandas com uma alta sensibilidade a pequenas variações genômicas. A perda ou a adição de elementos no genoma pode mudar o padrão de bandas de amplificação de tal forma que se pode diferenciar as espécies estreitamente relacionadas em grupos separados (BRAEM et al., 2010). Além disso, a semelhança do baixo rendimento de (GTG)₅-PCR a partir da tipagem de espécies de *Staphylococcus* spp. estão estreitamente

relacionadas a identificação de cepas, como foi demonstrado para as bactérias produtoras de ácido láctico (GEVERS et al., 2001), e, portanto, permite identificar diversidade das espécies.

2.4.4. PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

A técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), conhecida como Eletroforese de Campo Pulsado ou, também, de Campo Pulsátil, foi desenvolvida em 1984 por Scharwartz & Canter. Esta técnica é uma variação da eletroforese no gel de agarose, mas que apresenta alto poder de tipagem para inúmeros microrganismos, pois a alternância entre os sentidos do campo elétrico, ou pulsos, permite separar fragmentos que, convencionalmente, não seriam diferenciados em gel de agarose convencional que utilizam corrente elétrica constante (MASLOW & MULLIGAN, 1996). A técnica possui alta reprodutibilidade e é recomendada como método altamente discriminatório por detectar variações genéticas menores entre estirpes epidêmicas, também conhecidas como pulsotipos. No entanto, é um método laborioso e de alto custo devido, principalmente, à dificuldade de interpretação e ao preço do aparelho, pois necessita de programas especializados para analisar os resultados.

A técnica de PFGE tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para análise epidemiológica da maioria das bactérias patogênicas (AARESTRUPET, 2006; RODRÍGUEZ-LÁZARO, 2007). Esta técnica possui alto poder discriminatório, sendo considerada como "padrão ouro" para a caracterização de isolados de *S. aureus* (BANNERMAN et al., 1995). O PFGE é o método de escolha para a comparação dos isolados epidemiologicamente relacionadas. Por sua robustez tem sido usada em inquéritos microepidemiológicos (local ou de curto prazo) e para macroepidemiológicos (nacional, continental, ou de longo prazo) (HALLIN et al., 2007; MONTESINOS et al., 2002). O método tem sido aplicado especificamente para estudar o comportamento do *S. aureus* na mastite (ZADOKS et al, 2000; MIDDLETON et al, 2002), para determinar as estirpes que dão origem a mastite (ZADOKS et al, 2002), para avaliar o efeito a longo prazo da persistência de *S. aureus* em rebanhos leiteiros (ANDERSON & LYMAN, 2006), e para estudar o relacionamento genético das cepas de fatores de virulência aumentada (JØRGENSEN et al., 2005).

3.OBJETIVOS

- Determinar os clones circulantes *S. aureus* causadores de mastite bovina dentro das fazendas estudadas.

-Comparar a eficácia das técnicas moleculares ERIC-PCR e (GTG)₅-PCR para detectar os clones de *S. aureus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem- Seleção dos Municípios e Propriedades

Para o presente estudo foram utilizados 56 *Staphylococcus aureus* oriundos de amostras de leite mastítico coletadas em municípios da região sul fluminense do estado do Rio de Janeiro, onde está localizada a maior bacia leiteira do estado no que se refere à produtividade leiteira (MARAFON, 2004) (Anexo 01). As fazendas foram selecionadas quanto ao seu tipo de manejo, quantidade de vacas e produção leiteira. Em cada propriedade foram realizados testes para identificação de mastite clínica (exame físico da glândula mamária e caneca telada) e subclínica (CMT – *California Mastitis Test*) em todos os quartos mamários de todas as vacas em lactação. As amostras de leite foram obtidas por meio de ordenha manual e individual, antecedida por lavagem das mãos do ordenhador e do úbere do animal com água e sabão e álcool a 70%, com secagem dos mesmos com papel toalha. Os jatos de leite foram acondicionados diretamente em frascos estéreis e colocados em caixas isotérmicas com gelo.

4.2. Caracterização fenotípica dos *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus aureus* utilizados foram previamente isolados e identificados fenotipicamente por Mendonça (2012) e Marques (2012), através da metodologia descrita por KONEMAN (2008), e estocados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de 45% de glicerol para posterior caracterização genotípica. Como controle positivo em todas as reações de PCR foi utilizado a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 43300.

4.3. Extração de DNA dos isolados de *Staphylococcus aureus*

Para extração do DNA total, cada isolado foi cultivado em 5mL de Caldo BHI a temperatura ambiente por 12-16 hrs a 150 rpm. Em seguida 1,5mL da cultura foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado por 5 min a 12396g e o sobrenadante foi descartado, esta etapa repetiu-se três vezes. As células foram ressuspensas em 600 µL de solução de extração (TrisHCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em Vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min em seguida. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e foi adicionado 600 µL de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico [1-1(24:1)], seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e adicionado 2 volumes de etanol 100% gelado, seguido de incubação a 20°C por 2 ou 12hrs para a precipitação do DNA. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 14549g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70% (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a temperatura ambiente, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultra pura e armazenados a -20°C.

Para quantificação do DNA total extraído, as amostras são aplicadas com 1µL de SYBR Green (INVITROGEN) diluído de 10.000X para 100.000X o gel de agarose 0,8 % e submetidas à eletroforese. Após a corrida, o gel foi visualizado sob transiluminador ultravioleta e documentado pela câmera fotográfica (SONY – Modelo DSC-HX1). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade de banda do marcador Lambda (λ) (Promega®), nas concentrações de 25 e 50ng e a qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

4.4. Caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus*

Para confirmação da identificação fenotípica dos *Staphylococcus aureus* realizada por MENDONÇA (2012) e MARQUES (2012), os isolados foram submetidos às reações de PCR utilizando *primers* específicos para o gênero *Staphylococcus* (ZHANG et al., 2004), para *Staphylococcus* coagulase positivos (KARAHAN & CETINKAYA, 2006) e para espécie *S.aureus* (STRAUB et al., 1999) (Quadro 1). Para um volume de reação de 20 µL as concentrações dos reagentes utilizados foram 1X Tampão (Dream Taq Buffer-Fermentas®), 0,2µM de dNTP (Fermentas®), 0,3 µM de *primer* (Bionner®), 1U de Dream Taq Polimerase (Fermentas®) e 10ng de DNA. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo corante SYBR Green (INVITROGEN®) diluído, possibilitando a visualização dos fragmentos no transiluminador ultra-violeta e documentação pela câmera fotográfica (SONY – Modelo DSC-HX1), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®).

Quadro 1. *Primers* e ciclos empregados nos ensaios de amplificação

Gene (Fragmento)	<i>Primer</i>	Ciclo*
16S DNAr(756pb)	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA	1
<i>Staphylococcus</i> spp	CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	
23S DNAr(930pb)	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC	1
<i>S.aureus</i>	AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	
<i>coa</i> (variável)	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G	2
	GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	

* 1. 94°C 5min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10min; 2. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min.

4.5. Técnicas de REP-PCR

Para a execução das técnicas de ERIC-PCR e (GTG)₅-PCR foram realizados ajustes exclusivos, tanto na composição dos reagentes quanto nas temperaturas dos ciclos de amplificação, uma vez que os *primers* descritos na literatura para ambas as técnicas são direcionados para o estudo de enterobactérias. Os ensaios estão dispostos nas tabelas em anexo (ANEXO 2 e 3).

4.5.1. ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

Para realização desta técnica, foi utilizado o *primer* (5'ATGTAAGCTCCTGGG GATTCAC3') e (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3') conforme descrito por de Versalovic e colaboradores (1992). Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2 %, contendo corante SYBR Green (Invitrogen®) diluído, possibilitando a visualização dos fragmentos no transiluminador ultra-violeta e documentação pela câmera fotográfica (SONY – Modelo DSC-HX1), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®).

4.5.2.(GTG)₅-PCR

Para a realização desta técnica foi utilizado o *primer* (5'-GTG GTG GTGGTG GTG-3') descrito por Lieckfeldt et al. (1993). Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo corante SYBR Green (Invitrogen®) diluído, possibilitando a visualização dos fragmentos no transiluminador ultra-violeta e documentação pela câmera

fotográfica (SONY – Modelo DSC-HX1), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®).

4.6. PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

A técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) para obtenção dos perfis cromossômicos de *S. aureus* foi realizada mediante modificações em metodologias descritas na literatura. Colônias puras foram ressuspensas em tampão de suspensão (100mM Tris, 100mM EDTA, pH 7,6) até alcançar a turbidez referente ao tubo 2 da escala de McFarland. Após, foi adicionado 20 µL de lisostafina a 225 µL da suspensão bacteriana e incubado a 37° C por 30 min. Em seguida, foi agregado 5µL de proteinase K (20mg/mL) e 250 µL de agarose de baixo ponto de fusão 1,5% a 50°C, para confecção dos blocos, que foram solidificados a 4°C por 20 min. Os blocos foram incubados em 1,5 mL de tampão de digestão (0,5 M EDTA pH9, 1% n-lauril-sarcosina e 75 µL de proteinase K (20 mg/mL) durante 90 min em banho a 55°C. Após digestão, foram efetuadas lavagens, inicialmente com água destilada estéril a 50°C em banho-maria por 15 min., e depois três ciclos seguidos com tampão de lavagem (10mM Tris e 1mM EDTA, pH 7,6) por igual intervalo de tempo e temperatura. A digestão enzimática foi feita com a adição do bloco a microtubo contendo tampão de restrição (2µL de albumina, 20 µL de Buffer J, 73 µL de água livre de nucleases e 5 µL da enzima de restrição *Sma*I). Após montagem do gel, a corrida eletroforética foi efetuada em equipamento CHEFDR III considerando pulso inicial de 5 s.; pulso final de 25 s.; ângulo de 1200; 6 V por 17 hrs. A coloração do gel foi feita com brometo de etídio a 0,1% em tampão de corrida para posterior visualização.

4.7. Análise da Diversidade Genética e do Poder Discriminatório

Os géis foram analisados visualmente gerando a matriz de ausência e presença. A partir dessa matriz, foi calculada a dissimilaridade entre os isolados utilizando-se o complemento do índice de Jaccard e posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA (CRUZ, 2008) através do programa GENES-UFV. A avaliação do poder discriminatório dos métodos de tipagem utilizados foram calculados usando o EpiCompare versão 1,0 (RidomGmbH, Wurzburg, Alemanha) (IKAWATY et al., 2008).

5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação genotípica dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Dos 56 isolados, todos amplificaram um fragmento único de 756 pb, confirmando que estes pertenciam ao gênero *Staphylococcus* spp, geraram fragmentos de tamanho variáveis compatíveis com o esperado para confirmar que pertenciam ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivos e geraram fragmentos de 930 pb, confirmando a sua identificação com *Staphylococcus aureus* (Figura 1).

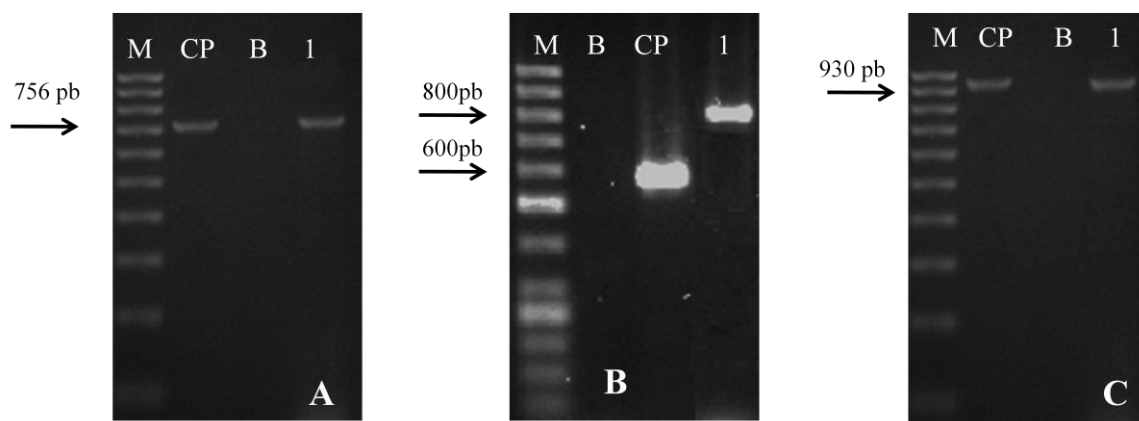


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% com o produto de amplificação da identificação do *Staphylococcus aureus*. (A) Genes *Staph.* (756 pb) M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, B: Reação negativa e 1: Isolado positivo para os gene *Staph.*; (B) *coa* (variável pb) M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo (600pb), B: Reação negativa e 1: Isolado positivo (800pb); (C) DNAr de *S. aureus* (930 pb) M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, CN: controle negativo e 1: Isolado positivo.

5.2. ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

Para otimização da técnica de ERIC-PCR, inicialmente foram selecionados seis isolados que foram submetidos a 12 protocolos com diferentes parâmetros para amplificação (Anexo I). Os três protocolos que apresentaram maior poder discriminatório foram selecionados (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolos selecionados para técnica ERIC-PCR

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
MgCl ₂	3mM	3mM	3mM
DNTP	1,25 mM	0,4 mM	0,4 mM
<i>Primer</i>	2 µM	2µM	2µM
Taq DNA polimerase	1U	4U	4U
DNA	10ng	10ng	10ng
Volume Total	25µL	50 µL	50 µL
Ciclo	95°C por 7 min., 30x(94°C por 1 min., 40°C por 1 min., e 65°C por 8 min.), 65°C por 8min.	95°C por 7 min., 30x(94°C por 1 min., 40°C por 1 min., e 65°C por 8 min.), 65°C por 16min	95°C por 7 min., 30x(94°C por 1 min., 44°C por 1 min., e 65°C por 8 min.), 65°C por 16min.
Isolados avaliados em cada teste (N)	27	32	35

A partir do protocolo 1 foi gerado um perfil de amplificação mostrado na Figura 2, onde foi observado que os tamanhos dos fragmentos variaram de 200 a 1000pb, sendo este considerado o melhor protocolo dentre os testados. Dos 27 isolados submetidos à amplificação, um total de 66,66 % foram tipáveis.

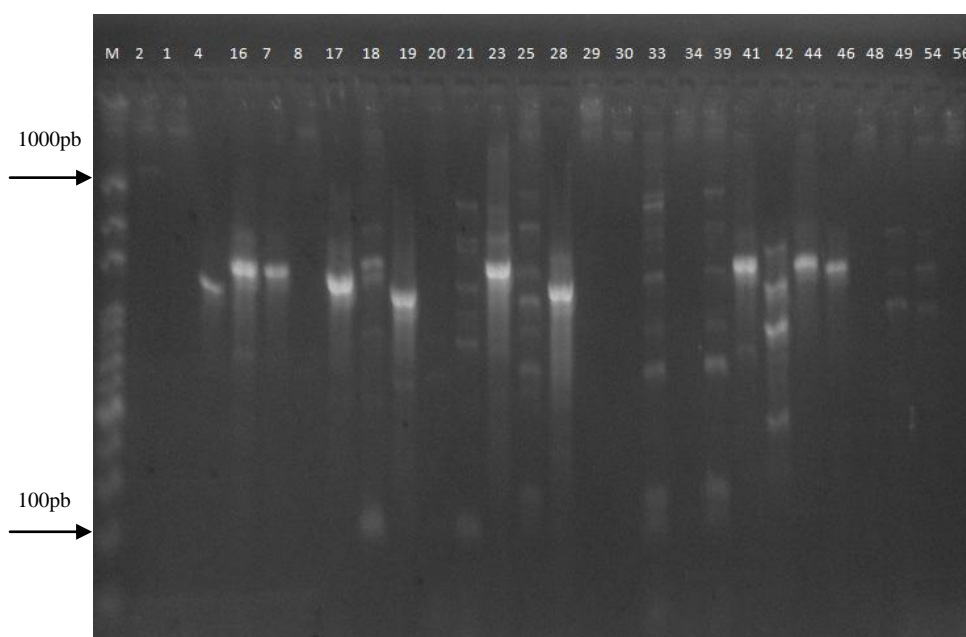


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação do ERIC-PCR de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de diferentes fazendas utilizando o protocolo 1. M: Marcador molecular de 100pb. Isolados positivos 4,7,16,17,18,19,21,23, 25,28,33,39,41,42,44,46,49 e 54. Isolados negativos 1,2,8,20,29,30,34,48 e 56.

Baseado no resultado observado na figura 2 foi gerado um dendograma de dissimilaridade (Figura 3), onde pode-se observar a formação de 6 agrupamentos (Tabela 2).

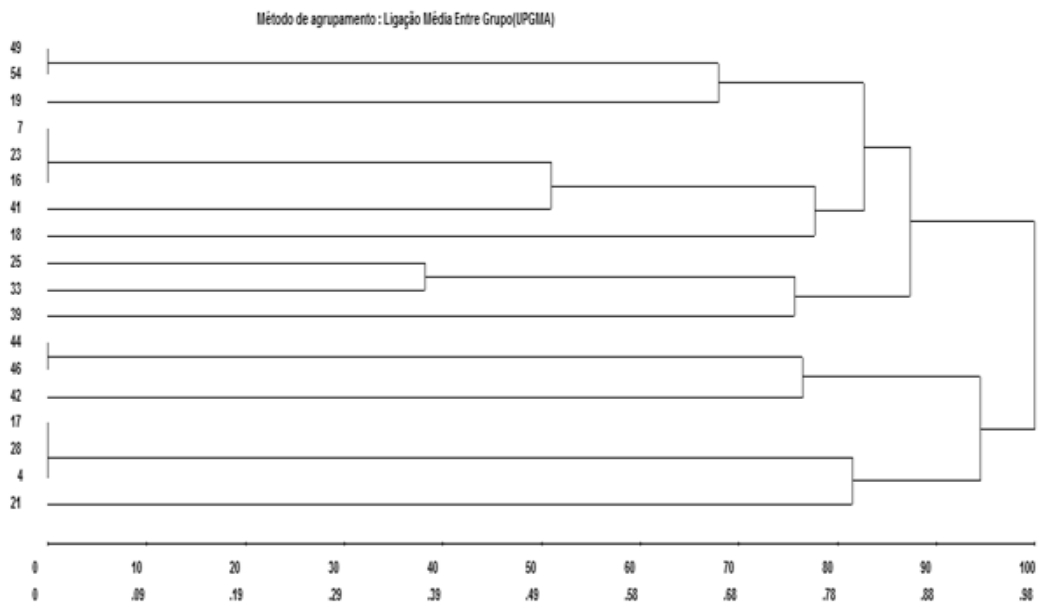


Figura 3: Dendrograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus* utilizando o protocolo 1 para técnica ERIC-PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.

Tabela 2: Origens e agrupamentos dos isolados de *Staphylococcus aureus* gerados a partir da utilização do protocolo 1 na realização do ERIC-PCR.

Amostra	Fazenda/ Município	Agrupamento (grupo)
49	H/Paracambi	1
54	H/Paracambi	
19	D/Seropédica	
7	C/Rio Claro	2
23	E/Rio Claro	
16	A/Piraí	
41	G/Paracambi	
18	D/Seropédica	3
25	E/Rio Claro	4
33	F/Rio Claro	
39	F/Rio Claro	
44	G/Paracambi	5
46	G/Paracambi	
42	G/Paracambi	
17	D/Seropédica	6
28	E/Rio Claro	
4	A/Piraí	
21	D/Seropédica	

Com base no dendograma, foi possível observar a existência de cepas clonais (100% de similaridade) oriundas da mesma Fazenda, como por exemplo, na fazenda H de Paracambi, as cepas 49 e 54, e, na fazenda G de Paracambi, as cepas 44 e 46. Foram observadas também cepas clonais oriundas de diferentes fazendas de diferentes municípios como as cepas 7, 23 e 16, das fazendas C e H de Rio Claro e A de Piraí, respectivamente, e 17, 28 e 4, da fazenda D de Seropédica, E de Rio Claro e da Fazenda A de Piraí.

As cepas clonais 49 e 54 provenientes da fazenda H de Paracambi apresentaram 72% de similaridade com o isolado 19 da fazenda D de Seropédica. Os clones 7, 23 e 16 das fazendas C e E de Rio Claro e A de Piraí, respectivamente, apresentaram 59% de similaridade com o isolado 41 da fazenda G de Paracambi. O isolado 18 da fazenda D demonstrou-se ser diferente dos outros agrupamentos apresentando 23% de similaridade com os isolados do grupo 2. O isolado 25 da fazenda E de Rio Claro apresentou 24% de similaridade com os isolados 33 e 39 da fazenda F de Rio Claro, que apresentaram 62% de similaridade entre si. Na fazenda G de Paracambi, o isolado 42 apresentou 22% de similaridade com os clones 44 e 46. Neste grupo observa-se que isolados da mesma fazenda diversificam genicamente. O isolado 21 da fazenda D de Seropédica apresenta 18% de similaridade com os clones 4, 17 e 28 das fazendas A, D e E dos municípios Piraí, Seropédica e Rio Claro respectivamente. Neste grupo nota-se a dispersão de cepas clonais entre as fazendas e nota-se diversidade gênica entre os isolados da fazenda D de Seropédica (17 e 21).

A realização da técnica de ERIC-PCR seguindo o protocolo 1 permitiu um poder discriminatório de 0,863. Com a análise do dendograma nota-se a dispersão de isolados com similaridade genética em diferentes propriedades e presença de cepas clonais circulantes dentro da mesma propriedade e em propriedades de municípios diferentes.

A fim de melhorar o desempenho da técnica foram realizadas algumas mudanças na concentração da Taq Polimerase, dNTPs e no volume da reação (Protocolo 2, Tabela 1). Após

a eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação oriundos deste protocolo, observou-se a geração de um maior número de fragmentos com tamanhos variando de 100 a 1000pb (Figura 04). Dos 32 isolados submetidos à amplificação, um total de 90,62% foram tipáveis. De acordo com TYLER et al.(1997), a melhor performance da técnica ocorreria como aumento da concentração de *primer* e TaqPolimerase.

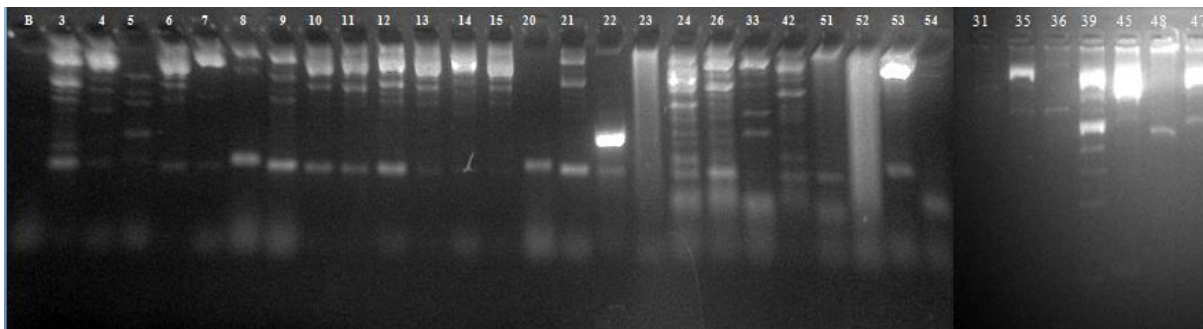


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação do ERIC-PCR de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de diferentes fazendas utilizando o protocolo 2. B: reação negativa. Isolados Positivos: 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,20,21,22, 24,26,31,33,35,36,42,45,47,48,51,53 e 54. Isolados negativos: 23, 52 e 54.

Baseado nestes resultados foi gerado um dendograma de dissimilaridade em que foi observada a formação de 15 agrupamentos (Figura 5, Tabela 3).

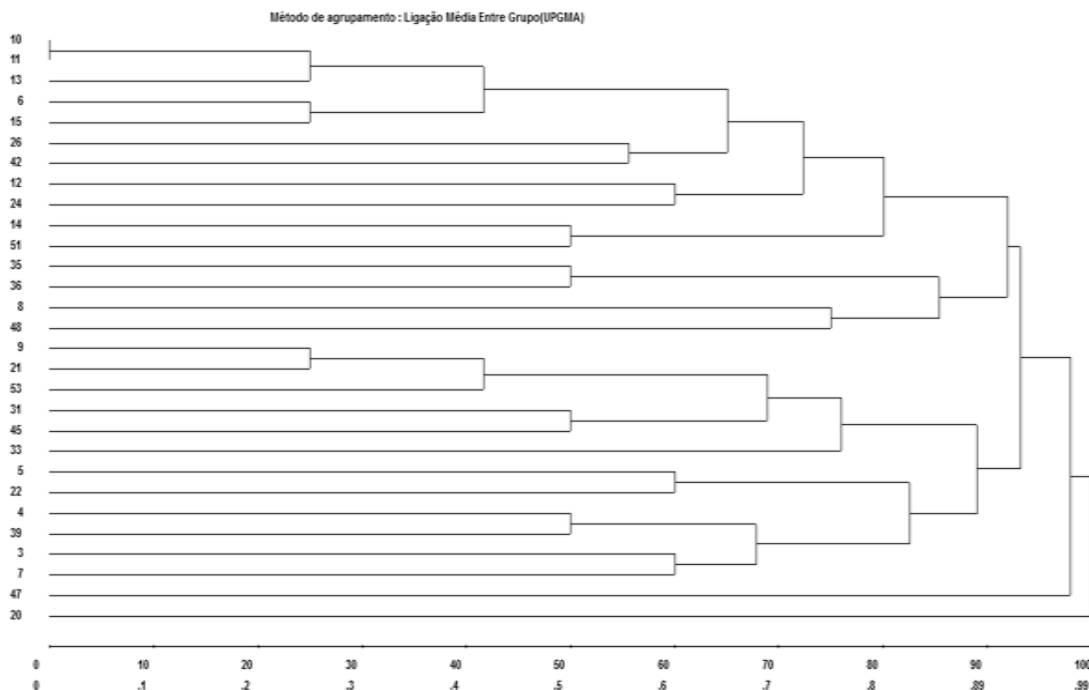


Figura 5: Dendograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus* utilizando o protocolo 2 para técnica ERIC-PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.

Com base no dendograma, de modo geral, este protocolo demonstrou um perfil mais diversificado dos isolados, produzindo 15 agrupamentos distintos.

Tabela 3: Origens e agrupamentos dos isolados de *Staphylococcus aureus* a partir do protocolo 2 na realização da técnica de ERIC-PCR

Isolado	Fazenda/ Município	Agrupamento (<i>grupo</i>)
10	A/Piraí	1
11	A/Piraí	
13	A/Piraí	
6	A/Piraí	2
15	A/Piraí	
26	E/Rio Claro	3
42	G/Paracambi	
12	A/Piraí	4
24	E/Rio Claro	
14	A/Piraí	5
51	H/Paracambi	
35	F/Rio Claro	6
36	F/Rio Claro	
8	C/Rio Claro	7
48	G/Paracambi	
9	C/Rio Claro	8
21	D/Seropédica	
53	H/Paracambi	
31	E/Rio Claro	9
45	G/Paracambi	
33	F/Rio Claro	10
5	A/Piraí	11
22	E/Rio Claro	
4	A/Piraí	12
39	F/Rio Claro	
3	C/Rio Claro	13
7	C/Rio Claro	
47	G/Paracambi	14
20	D/Seropédica	15

Foi detectado que apenas dois isolados, 10 e 11, oriundos da fazenda A de Piraí, teriam 100% de similaridade, representando uma cepa clonal. Estes clones apresentaram 73% de similaridade com o isolado 13 da mesma fazenda. Nesta mesma fazenda, os isolados 6 e 15 apresentaram 73% de similaridade entre si, representando outro grupo. Os isolados da fazenda E de Rio Claro (26) e da fazenda G de Paracambi (42) possuem 42% de similaridade. Os isolados da fazenda C de Rio Claro (3 e 7) apresentam 40% de similaridade entre si. Os

isolados da fazenda A de Piraí (12) e da fazenda E de Rio Claro (24) apresentaram 38% de similaridade. E os isolados da fazenda C de Rio Claro (8) e da fazenda G de Paracambi (48) apresentaram apenas 24% de similaridade. Observa-se baixa similaridade entre os isolados pertencentes aos grupos 3,4,5,6 e 7. Os isolados do grupo 5 das fazendas A de Piraí e H de Paracambi (14 e 51) e o isolado do grupo 6 (35 e 36) da fazenda F de Rio Claro apresentaram 50% de similaridade entre si. Já os isolados da fazenda C de Rio Claro (9) e o da fazenda D de Seropédica (21) apresentaram 75% de similaridade entre si e estes apresentaram 59% de similaridade com o isolado da fazenda H de Paracambi (53). Os isolados das fazenda E de Rio Claro (31) e da G de Paracambi (45) apresentaram 48% de similaridade entre si. E estes apresentam 23% de similaridade com o isolado da fazenda F de Rio Claro (33). Os isolados das fazendas A de Piraí (5) e o da E de Rio Claro (22) apresentaram 40% de similaridade entre si. Os isolados 4 e 39 da fazenda A de Piraí e F de Rio Claro apresentam 50% de similaridade entre si. Os isolados da fazenda G de Paracambi (47) e da fazenda D de Seropédica (20) não apresentam similaridade com nenhum dos outros isolados usados neste estudo.

A realização da técnica de ERIC-PCR seguindo o protocolo 2 permitiu um poder discriminatório de 0,961. Com a análise do dendograma, observa-se grande diversidade gênica e variabilidade entre os isolados oriundos de uma mesma fazenda e entre fazendas localizadas em municípios diferentes.

A principal desvantagem do protocolo 2 foi a ausência de reprodutibilidade, a partir de testes realizados em triplicata para três dos isolados avaliados (dados não mostrados). Uma possível explicação é a baixa temperatura de anelamento utilizada. As técnicas de REP-PCR foram inicialmente propostas para a tipificação de enterobactérias onde a temperatura de anelamento utilizada é de 52°C. Porém com esta temperatura não ocorreu a amplificação dos isolados do presente estudo. O que corrobora com o estudo realizado por Tyler e colaboradores (1997), no qual foram testados os principais fatores que interferem a eficácia desta técnica. Em relação à temperatura de anelamento, o estudo demonstrou que temperaturas superiores a 40°C não permitiram a amplificação por técnicas de REP-PCR para bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. Porém, para contornar esta desvantagem foi realizado um teste com várias temperaturas de anelamento onde a temperatura de 44°C possibilitou a reprodução do perfil de amplificação dos isolados testados, com pouco comprometimento do número de fragmentos gerados. Com isso foi gerado um terceiro protocolo, onde a temperatura de anelamento foi alterada para 44°C (Tabela 1).

Dos 38 isolados submetidos à amplificação por ERIC-PCR utilizando protocolo 3, 84,21 % dos isolados foram tipáveis. Foram observados nove fragmentos, um número maior do que aquele oriundo do protocolo 01, porém menor do que o observado quando o protocolo 2 foi utilizado (Figura 6). Os tamanhos dos fragmentos gerados com este protocolo variou de 500 a <1000pb e, baseados nestes resultados foi gerado um dendograma de dissimilaridade em que foi observada a formação de 16 agrupamentos (Figura 6, Tabela 4).

Com base no dendograma, foi possível observar a existência de cepas clonais (100% de similaridade) em duas propriedades, as cepas 39 e 52, oriundos das fazendas F de Rio Claro e H de Paracambi, e as cepas 37 e 53 da Fazenda F de Rio Claro e H de Paracambi, demonstrando a dispersão destes dois clones entre essas duas fazendas pertencentes a municípios diferentes.

Os clones 39 e 52 da fazenda F de Rio Claro e da fazenda H de Paracambi, respectivamente, apresentaram 33 % de similaridade com o isolado 9 da fazenda C de Rio Claro. Os isolados da fazenda A de Piraí (10 e 13) apresentaram apenas 23% de similaridade entre si. O isolado da fazenda F de Rio Claro (35) apresentou 95% de similaridade com os isolados do grupo 2. Os isolados da fazenda G de Paracambi (42 e 47) apresentam similaridade de 32%. Os isolados das fazendas C de Rio Claro (5) e da fazenda E de Rio

Claro (32) também apresentam 32% de similaridade. Os isolados da fazenda F de Rio Claro (36) e da fazenda H de Paracambi (51) apresentam 50% de similaridade. Estes isolados apresentam 38% de similaridade com o isolado da fazenda E de Rio Claro (31). O isolado 24 da fazenda E de Rio Claro apresenta similaridade de apenas 13% com os isolados do grupo6. Os isolados da fazenda C de Rio Claro (8) e da fazenda A de Piraí (12) apresentam 50% de similaridade entre si. Os clones 37 e 53 das fazendas F e Rio Claro e H de Paracambi respectivamente, apresentam 32% de similaridade com o isolado 41 da fazenda G de Paracambi. Na fazenda A os isolados 14 e 15 apresentam pouca similaridade (21%), estes isolados apresentam 11% de similaridade com o isolado 7 da fazenda C de Rio Claro. Também na fazenda A de Piraí os isolados 4 e 11 apresentam apenas 28% de similaridade entre si e o isolado 28 da fazenda E de Rio Claro apresenta 18% de similaridade com os isolados do grupo13. Os isolados da fazenda G (40) e da fazenda H (50) ambas de Paracambi apresentam apenas 7 e 2 % de similaridade respectivamente com os outros isolados analisados neste estudo. O isolado 54 da fazenda H de Paracambi não apresenta similaridade com nenhum dos outros isolados usados neste estudo.

A realização da técnica de ERIC-PCR seguindo o protocolo 3 permitiu um poder discriminatório de 0,96. Com a análise do dendograma nota-se a dispersão de isolados com similaridade genética provenientes de diferentes propriedades de distintas localidades e presença de cepas clonais circulantes em propriedades de municípios diferentes. Assim como no protocolo 02 podemos observar que isolados provenientes de uma mesma fazenda ficaram distribuídos em diferentes grupamentos.

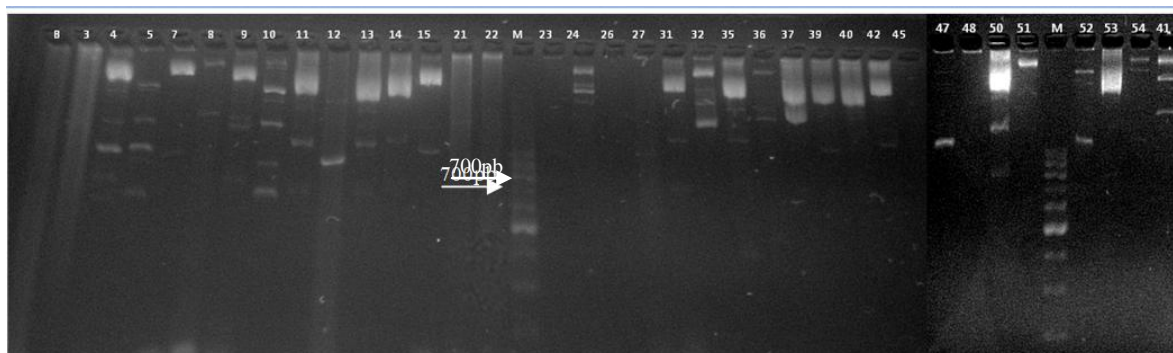


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação do ERIC-PCR de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de diferentes fazendas utilizando o protocolo 03. M: Marcador molecular de 100pb. B: reação negativa; Isolados positivos: 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 24, 31, 32, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 47, 50, 51, 52, 53 e 54; Isolados negativos: 3, 21, 22, 23, 26, 27, 45, e 48.

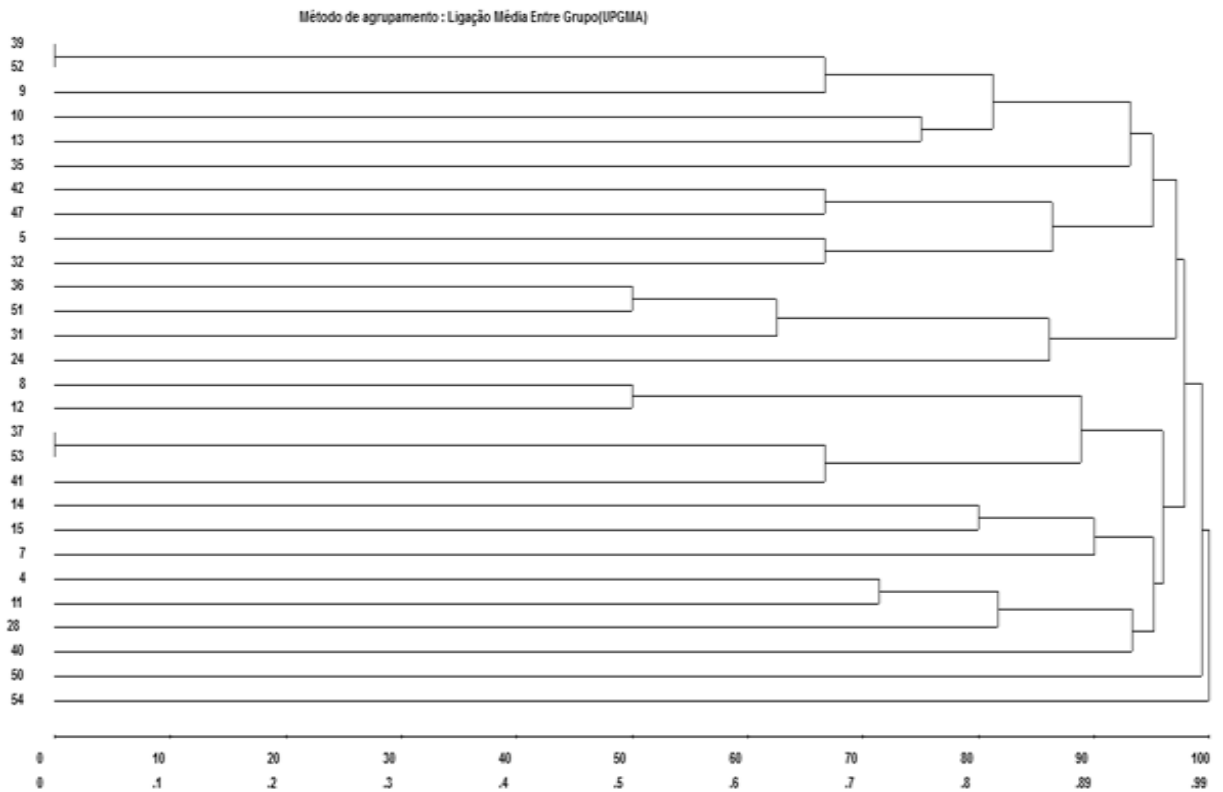


Figura 7: Dendrograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus* utilizando o protocolo 03 para técnica ERIC-PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.

Tabela 4: Origens e agrupamentos dos isolados de *Staphylococcus aureus* gerados pelo perfil mostrado na Figura 05

Isolado	Fazenda/ Município	Agrupamento (<i>grupo</i>)
39	F/Rio Claro	1
52	H/Paracambi	
9	C/Rio Claro	
10	A/Piraí	2
13	A/Piraí	
35	F/Rio Claro	3
42	G/Paracambi	4
47	G/Paracambi	
5	C/Rio Claro	5
32	E/Rio Claro	
36	F/Rio Claro	6
51	H/Paracambi	
31	E/Rio Claro	
24	E/Rio Claro	7
8	C/Rio Claro	8
12	A/Piraí	
37	F/Rio Claro	9
53	H/Paracambi	
41	G/Paracambi	
14	A/Piraí	10
15	A/Piraí	
7	A/Piraí	11
4	A/Piraí	12
11	A/Piraí	
28	A/Piraí	13
40	G/Paracambi	14
50	H/Paracambi	15
54	H/Paracambi	16

Após a realização dos três protocolos, foi possível determinar que todos apresentaram um poder discriminatório satisfatório para a espécie bacteriana *S. aureus* e que quando comparados entre si, o protocolo 2 apresentou o melhor desempenho (0,961), porém não apresentou uma boa reprodutibilidade.

Através dos três protocolos de ERIC- PCR foi possível observar a dispersão de cepas clonais (100% de similaridade) na mesma propriedade, como por exemplo, os isolados 49 e

54 da fazenda H de Paracambi e os isolados 44 e 46 da fazenda G de Paracambi através do protocolo 1. Além disso, os isolados 10 e 11 da fazenda A de Piraí também apresentaram esta característica, através do protocolo 2.

Também observou-se a dispersão clonal em diferentes propriedades e municípios, como por exemplo, os isolados 7, 16 e 23 das fazendas C (Rio Claro), A (Piraí) e E (Rio Claro) respectivamente testados através do protocolo 1. O mesmo ocorreu com os isolados 39 e 52, provenientes das fazendas F (Rio Claro) e H (Paracambi) utilizando o protocolo 3.

Também foi possível detectar a distribuição dos isolados com similaridade genética de 62% entre os isolados 33 e 39 da fazenda F de Rio Claro com o protocolo 1 e com 75% entre os isolados 9 e 21 das fazendas C (Rio Claro) e D (Seropédica) com o protocolo 2. O protocolo 3 também possibilitou 50% de similaridade entre os isolados 31 e 51 provenientes das fazendas E (Rio Claro) e H (Paracambi).

Após a realização dos distintos protocolos do ERIC-PCR para a tipificação de isolados de *S. aureus*, pode-se concluir que esta é uma técnica muito sensível às variações na sua execução o que dificulta a sua reprodução inter e intra laboratorial, diminuindo assim a sua eficácia.

5.3. (GTG)₅- PCR

Para implementação da técnica de (GTG)₅- PCR na tipificação de *S. aureus*, foram testados oito protocolos com diferentes parâmetros de amplificação (Anexo 03). Ao final, decidiu-se por um protocolo de maior poder discriminatório (dados não mostrados). Para reação, foi utilizado um volume total de 25 µl. As concentrações dos reagentes utilizados foram 1X Tampão (Dream Taq Buffer- Fermentas®), 3,0mM de MgCl₂ (Fermentas®), 200µM de dNTP(Fermentas®), 1µM de *primer* (Bionner®), 0,1% de Triton X-100 (Sigma®), 2U de Dream Taq Polimerase (Fermentas®) e 10ng de DNA. As condições de amplificação foram 95°C por 7 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 40°C por 1 min e 65°C por 8 min, seguidos por ciclo final de 65°C por 8min.

Dos 25 isolados submetidos à amplificação por (GTG)₅-PCR, 96 % dos isolados forma tipáveis. E os fragmentos variaram de 400 a 1000pb (Figura 8).

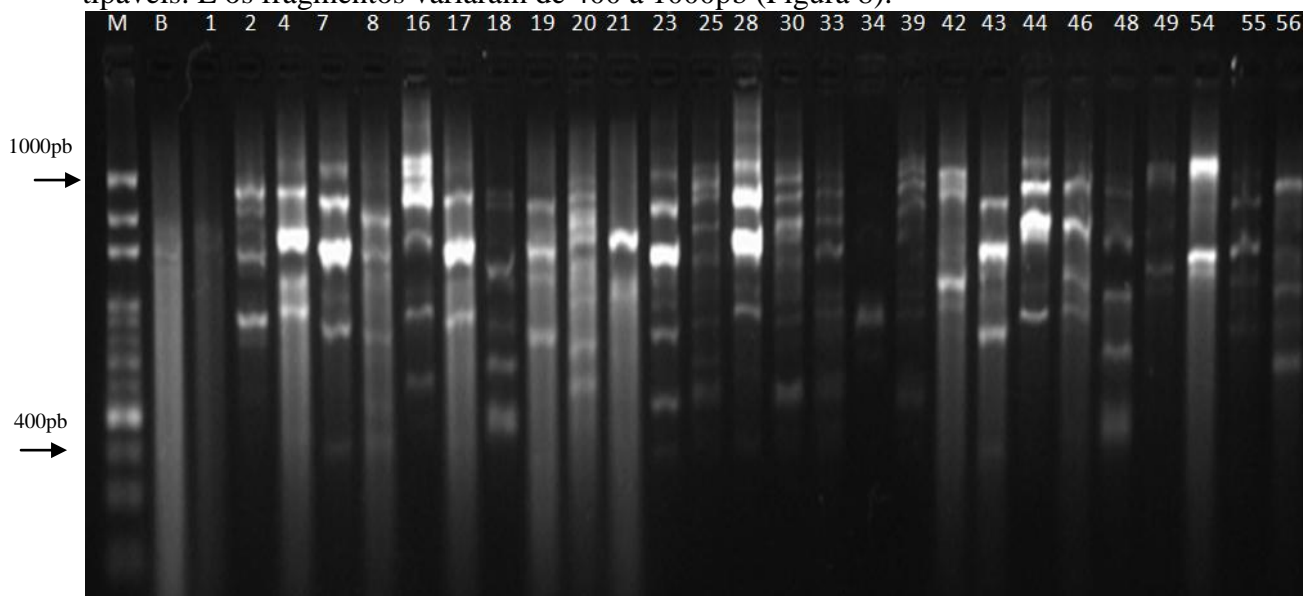


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação do (GTG)₅-PCR de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de diferentes fazendas. M: Marcador molecular de 100pb. B: reação negativa; Isolados Tipáveis: 2,4,7,8,16,17,18,19,20,21,23,25, 28,30,33,34,39,42,43, 44, 46, 48,49,54,55 e 56. Isolado Não Tipáveis: 1

Com base nestes resultados foi construído um dendograma de dissimilaridade, onde notamos a formação de 15 agrupamentos (*grupos*) (Figura 9, Tabela 5).

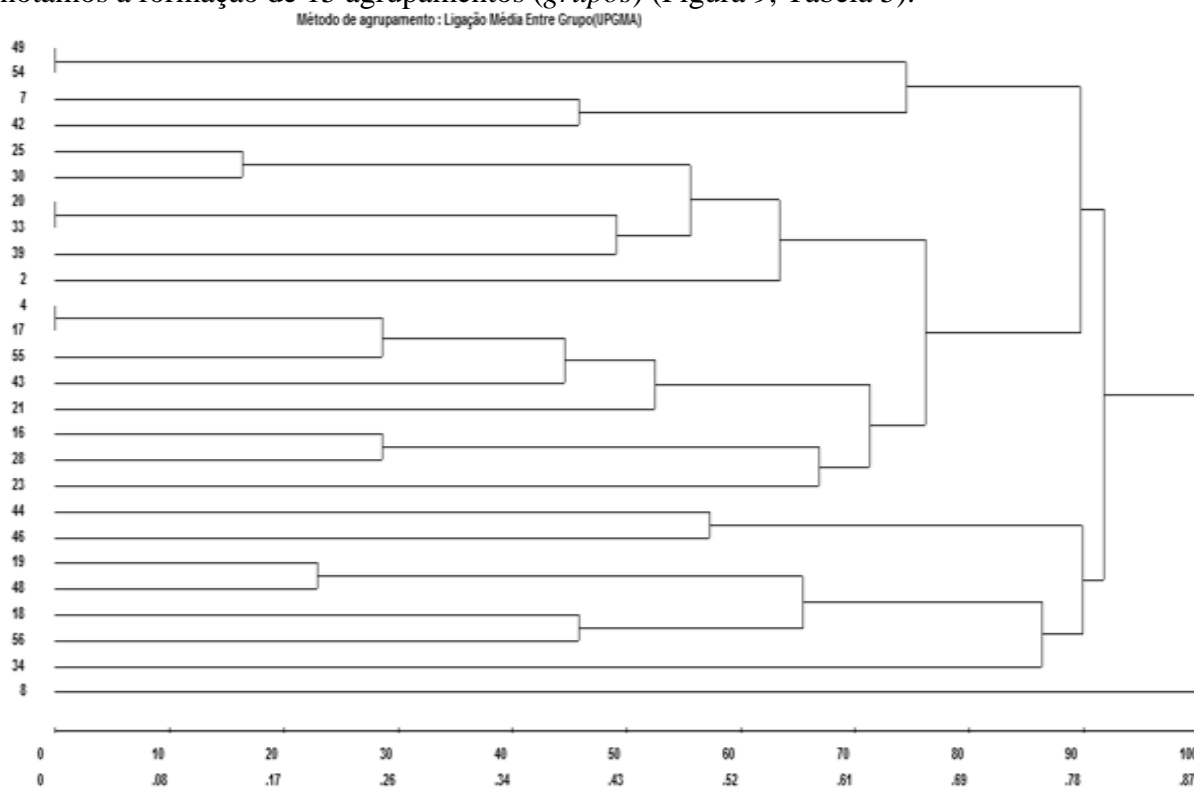


Figura 9: Dendrograma de dissimilaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica (GTG)₅-PCR através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.

A realização da técnica de (GTG)₅-PCR permitiu um poder discriminatório de 0,957. Com base no dendrograma, foi possível observar a existência de cepas clonais (100% de similaridade) provenientes da mesma fazenda, como no caso dos clones 49 e 54 oriundos da Fazenda H, e provenientes de fazendas de municípios diferentes como os clones 4 e 17, provenientes da fazenda A de Pirai e D de Seropédica, respectivamente e os clones 20 e 33, provenientes da fazenda D de Seropédica e F de Rio Claro. Os isolados da fazenda C de Rio Claro (7) e da fazenda G de Paracambi (42) apresentam 54% de similaridade entre si. Os isolados da fazenda E de Rio Claro (25 e 30) apresentam 83% de similaridade entre si. Os clones das fazendas D de Seropédica (20) e F de Rio Claro (33) apresentam 52% de similaridade com o isolado da fazenda F (39). O isolado 2 da fazenda B de Rio Claro apresenta apenas 37% de similaridade com o grupo 4. Os clones das fazendas A de Pirai (4) e D de Seropédica (17) apresentam 72% de similaridade com o isolado 55 na fazenda H de Paracambi. O isolado 43 da fazenda G de Paracambi apresenta 64% de similaridade com os isolados do grupo 6. O isolado 21 da fazenda D de Seropédica apresenta 47% de similaridade com grupo 7. Os isolados da fazenda A de Pirai (16) e da fazenda E de Rio Claro (28) apresentam 73% de similaridade entre si. O isolado da fazenda E de Rio Claro (23) apresenta 33% de similaridade com os isolados do grupo 9. Os isolados da fazenda G de Paracambi (44 e 46) apresentam 42% de similaridade entre si. O isolado da fazenda D de Seropédica (19) e da fazenda G de Paracambi (48) apresentam 78% de similaridade entre si. Os isolados da fazenda D de Seropédica (18) e da fazenda H de Paracambi (56) apresentam 52% de similaridade entre si. Já o isolado 34 da fazenda D de Seropédica apresenta apenas 13% de similaridade com o grupo 13 e o isolado 8 da fazenda C de Rio Claro não apresenta similaridade com nenhum isolado utilizado nesse estudo (Figura 08).

Tabela 5: Origens e agrupamentos dos isolados de *Staphylococcus aureus* através da técnica de (GTG)₅-PCR

Isolado	Fazenda/ Município	Agrupamento (<i>grupo</i>)
49	H/Paracambi	1
54	H/Paracambi	
7	C/Rio Claro	2
42	G/Paracambi	
25	E/Rio Claro	3
30	E/Rio Claro	
20	D/Seropédica	4
33	F/Rio Claro	
39	F/Rio Claro	
2	B/Rio Claro	5
4	A/Piraí	6
17	D/Seropédica	
55	H/Paracambi	
43	G/ Paracambi	7
21	D/Seropédica	8
16	A/Piraí	9
28	E/Rio Claro	
23	G/Paracambi	10
44	G/Paracambi	11
46	D/Seropédica	
19	G/Paracambi	12
48	D/Seropédica	
18	H/Paracambi	13
56	F/Rio Claro	
34	F/Rio Claro	14
8	C/Rio Claro	15

Apesar dos resultados gerados pela técnica do (GTG)₅-PCR terem sido satisfatórios e da técnica possuir um bom poder discriminatório (0,957) para a tipagem de *S. aureus*, as tentativas subsequentes de execução da técnica não foram bem sucedidas o que indica a necessidade de ajustes em sua padronização em nosso laboratório de maneira a garantir que, uma vez otimizada, possa gerar resultados confiáveis e reprodutíveis que possam ser utilizadas para análise de dispersão dos isolados de *S. aureus*.

5.4. PFGE- PCR

Como parte dos estudos de Pós-Doutoramento da Professora Miliane Moreira Soares de Souza, coordenadora do projeto de pesquisa e orientadora da presente dissertação, foi realizada a tipagem molecular através da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) utilizando 33% (19/57) dos isolados de *S. aureus* deste estudo (Figura 10). Estes dados foram incorporados a esta dissertação para auxiliar na compreensão dos perfis genotípicos obtidos. Depois da digestão do DNA dos isolados com a enzima de restrição *SmaI*, foi possível a detecção de 6 perfis genéticos distintos (Tabela 07). Os perfis A e B foram formados por 2 isolados cada um, os perfis C, D e E por 3 isolados cada um e o perfil F formado por um único isolado. Cinco isolados não foram possíveis de tipar por esta técnica, destes, quatro isolados não foram cortados pela enzima *SmaI* e um isolado quando submetido ao campo pulsado originou um rastro ao longo do gel. Cada perfil considerado no estudo foi obtido após, pelo menos, três repetições.

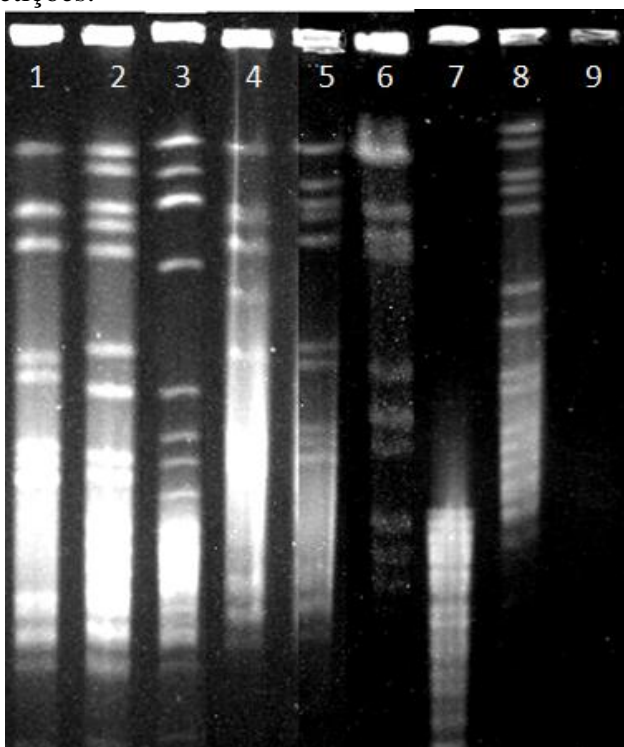


Figura 9: Padrão eletroforético do DNA cromossômico de *S.aureus* clivado com *SmaI* em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado. Isolados classificados em distintos perfis: 1 (C); 2 (D); 3 (E); 4 (B); 5 (F); 6 (A); 7 (perfil tipo rastro); 8 (D); 9: isolado não cortado pela enzima *SmaI*.

Tabela 6: Origens e perfis dos isolados de *Staphylococcus aureus* gerados pelo perfil mostrado na Figura 09

Isolado	Fazenda/ Município	Perfil
4	A/ Piraí	A
8	C/ Rio Claro	
33	F/ Rio Claro	B
41	G/ Paracambi	
39	F/ Rio Claro	C
45	G/ Paracambi	
25	E/Rio Claro	
20	D/ Seropédica	D
54	H/ Paracambi	
55	H/ Paracambi	
46	G/ Paracambi	E
47	G/ Paracambi	
48	G/ Paracambi	
42	G/ Paracambi	F

Atualmente, surgiu um MRSA colonizador frequente de populações animais, possivelmente favorecido pela ampla utilização de antibióticos, sendo denominado “livestock-associated MRSA” (LA-MRSA). Este tipo surgiu primeiramente em porcos, mas também têm sido descrito em outros animais como: cães, cavalos, aves, gado, inclusive humanos (CUNY et al., 2008; HASMAN et al., 2010; HUBER et al., 2010; LOEFFLER & LLOYD, 2010). LA-MRSA são resistentes a clivagem por *SmaI*, a enzima de restrição mais frequentemente utilizada para tipagem de *S. aureus* por PFGE (CHUNG et al., 2000), pela presença de uma metilação nos sítios de atuação da enzima de restrição (BENS et al., 2006). Este tipo de MRSA, no entanto, é tipificado por *spa*, baseado na sequência da região polimórfica X do gene da proteína A (*spa A*) de *S. aureus*. (VANDERHAEGHEN et al., 2010). Dentre os LA-MRSA, o clone ST398, historicamente bastante raro em humanos, não deriva das linhagens mais comuns de MRSA e carrega *SCCmec* do tipo IV ou V, sendo este o mais frequente (MONECKE et al., 2011). Tal fato sugere a transferência de elementos genéticos entre CA-MRSA e LA-MRSA. Diferentemente do CA-MRSA, LA-MRSA ST398 geralmente não possuem os genes codificadores da toxina PVL. Exceções envolvem estirpes de infecções em seres humanos, que possivelmente adquiriram este gene de outro MRSA humano. Esta diversidade de cepas pode ser resultante da adaptação dos *S. aureus* a diferentes hospedeiros animais por mecanismos genéticos que permanecem desconhecidos (PANTOSTI, A., 2012).

Considerando a robustez e confiabilidade da técnica de PFGE, foi possível observar uma acentuada diversidade de clones de *S. aureus* nas propriedades leiteiras avaliadas na região Sul-Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, não tendo sido detectado um perfil predominante nos isolados estudados.

5.5. Análise da diversidade e dispersão dos isolados de *S. aureus*

As técnicas testadas apresentaram resultados semelhantes quanto à diversidade e a dispersão de *S. aureus* entre fazendas e municípios.

Através da técnica de ERIC- PCR, considerando o protocolo 3 como o mais eficaz dos três testados, foi possível observar a dispersão clonal entre fazendas de municípios diferentes como entre Rio Claro e Paracambi que possuem uma distância geográfica de 72,9 km. Uma justificativa para a presença dessas cepas clonais seria a presença de rodovias que interligam as propriedades facilitando a comercialização de animais entre estes municípios, e assim a dispersão de cepas clonais.

Os isolados de uma mesma fazenda apresentaram alto grau de diversidade entre si. Porém, Chapaval e colobadores (2006) ao tipificarem isolados de *S. aureus* oriundos da sala de ordenha encontraram grande similaridade genética entre os isolados.

Os isolados de fazendas de municípios diferentes apresentaram um maior grau de similaridade genética. A dispersão de isolados similares geneticamente pode ser explicada pela pouca mão de obra disponível nesta região, o que ocasionaria de um mesmo ordenhador trabalhar em fazendas diferentes carregando assim patógenos de um município a outro.

A técnica de (GTG)₅- PCR, além de identificar cepas clonais de municípios diferentes como na técnica de ERIC- PCR, também revelou cepas clonais na mesma propriedade o que sugere a presença de uma cepa que acometeria todo o rebanho com as mesmas características genéticas de virulência e resistência (AKINEDEN, et al, 2001). Estes achados seriam explicados devido a algumas linhagens de *S. aureus* possuem uma combinação de genes que conferem a capacidade infecciosa e de dispersão (CABRAL, et al, 2004).

Através da técnica de (GTG)₅-PCR, diferentemente dos resultados apresentados pela técnica de ERIC-PCR, os isolados de uma mesma fazenda apresentaram uma similaridade genética um pouco maior. Porém, assim como na técnica de ERIC-PCR, os isolados com maior grau de similaridade eram de fazendas em municípios diferentes.

A grande diversidade genética entre os isolados de *S. aureus* também foi identificada pela técnica de PFGE nas fazendas avaliadas. Esta análise é corroborada por estudos de RABELLO e colaboradores (2005) que detectaram 16 perfis ao analisar 106 cepas de *S. aureus* isoladas de 9 fazendas distintas do estado do Rio de Janeiro. No entanto, diferente do presente estudo, estes pesquisadores observaram a predominância de um perfil em 54,2% dos isolados e presente em seis das nove propriedades avaliadas.

A grande diversidade genética foi encontrada em outros estudos feitos no Brasil. SOUZA e colaboradores (2012) utilizaram a técnica de PFGE na tipagem de *S. aureus* oriundos do leite mastítico, utilizando 103 isolados coletados em 12 fazendas do estado de Minas Gerais, onde foi observada a formação de 32 pulsotipos. Com a detecção de um grande número de pulsotipos, pode-se notar a grande heterogeneidade genética entre os *S. aureus*. O estudo realizado por Ferreira (2008) apresentou resultados semelhantes, onde em sua pesquisa em Nova Odessa, em São Paulo, obteve 39 pulsotipos de 245 *S. aureus* isoladas de leite em casos de mastite e de ordenhadeiras mecânicas.

As técnicas testadas não identificaram nenhum perfil predominante nas fazendas. Este resultado discorda dos relatos na literatura sobre a existência de uma cepa clonal predominante numa dada região. Castelani e colaboradores (2013) tipificaram *S. aureus* isolados de novilhas com mastite através da técnica de PFGE em 83 isolados, e detectaram o domínio de uma linhagem correspondente a 89,1% dos isolados coletados em duas fazendas do estado de São Paulo, corroborando com Smith e colaboradores (2005) que afirmaram que um único grupo clonal é responsável pela maioria das infecções intramamárias em bovinos e que este grupo apresenta uma ampla distribuição geográfica.

5.6. Avaliação das Técnicas

Apesar das técnicas de ERIC-PCR e (GTG)₅-PCR terem produzido um número elevado de perfis genéticos e um bom poder discriminatório para a tipagem de *S.aureus* ambas apresentaram pouca reprodutibilidade, especialmente quando comparadas com a técnica de PFGE. O que corrobora com Deplano et al.(2000) e Babouee et al.(2011) que ao compararem o método de tipificação REP-PCR com o PFGE, observaram que a eletroforese em campo pulsado apresentou maior poder discriminatório do que as técnicas englobadas no método REP-PCR, confirmando a classificação desta técnica como padrão ouro.

Estudos anteriormente realizados por nosso Grupo de Pesquisa com o intuito de tipificar cepas de *S.aureus* oriundas de leite mastítico utilizando a técnica de amplificação aleatória (RAPD), observou que nenhum dos quatro primers testados apresentaram poder discriminatório e reprodutibilidade, concluindo que esta técnica seria de pouca consistência, o que dificultaria a correlação dos resultados entre laboratórios (Coelho,2008). Esta conclusão também se aplicou no caso das técnicas ERIC e (GTG)₅- PCR testadas nesta dissertação para tipificar isolados de *S. aureus*. A reprodutibilidade da técnica de ERIC-PCR foi questionada por Meacham et al. 2003, que encontraram diferenças quantitativas em relação a presença e a intensidade das bandas quando o mesmo isolado foi tipificado diversas vezes. Da mesma forma, a baixa reprodutibilidade intra e inter laboratorial do conjunto de técnicas de REP-PCR foi mostrado por Deplano et al.,2000 em um estudo multicêntrico afim de tipificar a espécie bacteriana *S. aureus*. Além disto, no presente estudo, os resultados produzidos pelas técnicas ERIC e (GTG)₅- PCR não apresentaram correlação entre si, o que vai contra o principio do método de tipificação de REP- PCR. Que preconiza a correlação entre as técnicas. Desse modo, as técnicas ERIC e (GTG)₅- PCR não são eficazes para realizar a tipificação e a detecção de clones de *S. aureus*.

A busca por métodos eficientes de análise da distribuição clonal de isolados de *S. aureus* vem sendo alvo de estudos dentro de nosso Grupo de Pesquisa. Inicialmente, foram realizados os ensaios da técnica RAPD, como citado acima, que não se mostrou eficiente. O presente estudo considerou técnicas de REP-PCR, que são descritas na literatura como adequadas a tipificação de *S. aureus*, mas também não observamos boa correlação, em especial quando comparadas ao padrão ouro que é a técnica do PFGE. Esta proporcionou resultados bastante interessantes e confiáveis, no entanto, por tratar-se de técnica extremamente laboriosa e não dispormos do equipamento próprio, de custo elevado, sua execução rotineira não poderia ser implantada de modo a fornecer os resultados que necessitamos. Desse modo, as etapas de desenvolvimento futuro desse trabalho envolverão a implantação de técnicas que utilizam primers voltados para regiões conservadas do genoma de *S.aureus*, como a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene *coa*, que é um importante fator de virulência dos *Staphylococcus* spp. Esta técnica tem sido considerada um método simples e preciso para a tipagem de *S. aureus* isolados a partir de fontes diferentes (HOOKEY et al.,1998; FERREIRA, et al., 2006). Outra técnica que irá ser implantada é a de tipificação usando a amplificação da região X da proteína A (gene *spa*) em *S. aureus* que tornou-se um dos métodos principais para tipagem regional e para programas nacionais de vigilância de MRSA. Além disso, este método tem sido considerado de excelente reprodutibilidade inter laboratorial, alto rendimento e consideravelmente elevado poder discriminatório (AIRES-DE-SOUSA, 2006; KOREEN et al., 2004). Também será implantada a técnica *Multilocus Sequence Typing* (MLST) que caracteriza os isolados bacterianos com base no polimorfismo dos fragmentos internos de sete genes constitutivos de *Staphylococcus* spp. Esta técnica tem contribuído grandemente para a compreensão da estrutura da população e evolução de *S. aureus* (COOPER & FEIL, 2006; FEIL et al., 2003; ROBINSON & ENRIGHT, 2004).

6. CONCLUSÕES

-Foi detectada grande diversidade genética na região estudada entre os isolados de *S.aureus* de uma mesma fazenda e de fazendas diferentes.

-Houve ausência de um perfil genético com as técnicas de REP-PCR predominante na região estudada.

-Notou- se a dispersão de cepas clonais e de isolados com similaridade genética em municípios diferente.

- As técnicas testadas, ERIC e (GTG)₅- PCR, apesar de produzirem um número elevado de perfis genéticos e um bom poder discriminatório, apresentaram pouca reprodutibilidade, especialmente quando comparadas com a técnica de PFGE.

- Técnicas baseadas na amplificação de elementos repetitivos, até o momento, não são adequadas para a tipagem de *S.aureus*.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP F. M. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. ASM Press, Washington, D.C., 2006.

AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A.A.; LAMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M. **Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis**. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8: 959–964, 2001.

AIRES T.A.C.P. **Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho**. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

AIRES-DE-SOUSA, M. **High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study**. J. Clin. Microbiol. v.44, pp.619-21, 2006.

ANDERSON, K. L. & LYMAN, R. L. **Long-term persistence of specific genetic types of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* on three dairies**. J. Dairy Sci., v.89, pp.4551-4556, 2006.

BABOUEE, B.; FREI, R.; SCHULTHEISS, E.; WIDMER, A. F.; GOLDENBERGER, D. **Comparison of the DiversiLab repetitive element PCR system with spa typing and pulsed-field gel electrophoresis for clonal characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol. v.49, pp.1549–1555, 2011.

BANNERMAN, T. L.; HANCOCK, D.; TENOVER, F.; MILLER, J. M. **Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol. v.33, pp.551-555, 1995.

BENEDETTE, M. F.; SILVA, D.; ROCHA, F.P.C. **Mastite bovina**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça, v.7, nº11, pp.1-5, 2008.

BENS, C. C.; VOSS, A.; KLAASSEN, C. H. **Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis**. J. Clin. Microbiol. v.44, pp.1875–1876, 2006.

BOTREL M. A.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J.Y.; CALAVAS, D. **Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France**. Foodborne Pathog. Dis. v.7, pp.479–487, 2010.

BRADLEY A. J., LEACH K. A., BREEN J. E., GREEN L. E., GREEN M. J. **Survey of the incidence and a etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales**. Vet. Rec. v.160, pp.253–258, 2007.

BRAEM, G.; DE VliegHER, S.; SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; LEROY, F.; DE VUYST L. **(GTG)₅-PCR fingerprinting for the classification and identification of**

coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: a comparison of type strains and field isolates. Vet. Microbiol. v.147, pp.67–74, 2011.

CABRAL, K.G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M.; LANGONI, H.; DE SÁ, M.E.P.; VICTÓRIA, C.; DA SILVA, A.V. **Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil.** Can. J. Microbiol. 50: 901–909, 2004.

CASSOL, D.M.S.; SANDOVAL, G.A.F.; PERICOLE, J.J.; GIL, P.C.N.; MARSON, F.A. **Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento.** A Hora Veterinária, v.29, nº175, 2010.

CASSONE M. & GIORDANO A. **Resistance genes traveling the microbial internet: down the drain, up the food chain?** Expert Rev. Anti Infect. Ther. v.7, pp.637–639, 2009.

CHIOU, C. S.; WEI, H. L.; YANG, L. C. **Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol. v.38, pp.2186–2190, 2000.

CHUNG, M.; DE LENCASTRE, H.; MATTHEWS, P.; TOMASZ, A.; ADAMSSON, I.; AIRES DE SOUSA, M.; CAMOU, T.; COCUZZA, C.; CORSO, A.; COUTO, I.; DOMINGUEZ, A.; GNIADKOWSKI, M.; GOERING, R.; GOMES, A.; KIKUCHI, K.; MARCHESE, A.; MATO, R.; MELTER, O.; OLIVEIRA, D.; PALACIO, R.; SA-LEAO, R.; SANTOS SANCHES, I.; SONG, J. H.; TASSIOS, P. T.; VILLARI P. **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multi laboratory effort using identical protocols and MRSA strains.** Microb. Drug. Resist. v.6, pp.189–198, 2000.

COELHO, S. M. S., **Caracterização fenotípica e genotípica de fatores de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, 2008.

COOPER, J. E. & FEIL, E. J. **The phylogeny of *Staphylococcus aureus* – which genes make the best intra-species markers?** Microbiology v.152, pp.1297–1305, 2006.

COSTA, E. O.; R AIA, M.R.; WATANABE, E.T.; G ARINO, F.; COELHO, V. **Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios.** Napgama, v.3, nº4, pp.14–17, 2000.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Diversidade genética.** Viçosa, Editora UFV. 278p, 2008.

CUNY C.; STROMMENGER B.; WITTE W.; STANEK C. **Groups of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital.** Microb. Drug Resist., v.14, pp.307–310, 2008.

DE BRUIJN, F.J **Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria.** Appl. Environ. Microbiol. v.58, pp.2180–2187, 1992.

DE BRUIJN, F.J.; RADEMAKER, J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, U.; LOUWS, F.J. **Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses.**In: Stacey G, Mullin B, Gresshoff P. (eds), *Biology of plant-microbe interaction; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant- Microbe Interactions*. USA, APS Press, pp.497-502, 1996.

DE VUYST, L.; CAMU, N., DE WINTER, T.; VANDEMEULEBROECKE, K.; VAN DE PERRE, V.; VANCANNEYT, M.; DE VOS, P.; CLEENWERCK, I. **Validation of the (GTG)₅-rep- PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans.** *Int. J. Food Microbiol.*v.125, pp.79–90, 2008.

DEPLANO, A.; SCHUERMANS, A.; VAN ELDERE, J.; WITTE, W.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; GRUNDMANN, H.; JONAS, D.; NOORDHOEK G. T.; DIJKSTRA, J.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J.; VAN DER ZEE, A.; BERGMANS, A.; BLANC, D. S.; TENOVER, F. C.; COOKSON, B. C.; O'NEIL, G.; STRUELENS, M. J. AND THE EUROPEAN STUDY GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL MARKERS OF THE ESCMID. **Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis.** *J. Clin. Microbiol.* v.38, pp.3527–3533, 2000.

DIARIO DO VALE, **Rio Leite Sul Reúne Pecuaristas no dia 13 em Resende.** Reportagem online.<http://diariodovale.uol.com.br/noticias/0,43091,Rio-Leite-Sul-reune-pecuaristas-dia-13-em-Resende.html#ixzz2HQDzvwDq> acessada 29 de dezembro de 2011 às 19hrs.

ENRIGHT, M. C. & SPRATT, B. G. **Multilocus sequence typing.** *Trends Microbiol.* v.7, pp.482-487, 1999.

EUZÉBY, J. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**,2007.

FARBER, J. M. ; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRET, T. J. **Molecular typing and differentiation.** In: DOWNES, F.P.; ITO, H. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th ed. Washington D. C.: American Public Health Association chap. 11,pp.127-156, 2001.

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. **How clonal is *Staphylococcus aureus*?** *J. Bacteriol.* v.185, pp.3307-3316, 2003.

FERREIRA, L. M. **Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas nos casos de mastite bovina.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP Jaboticabal, 2008.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. **Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina.** *Cienc.Rural*, Santa Maria,v.36, nº4,2006.

FITZGERALD, J. R. & MUSSER, J. M. **Evolutionary genomics of pathogenic bacteria.** Trends Microbiol. v.9, pp.547-553, 2001.

FITZGERALD, J. R.; STURDEVANT, D. E.; MACKIE, S. M.; GILL, S. R.; MUSSER, J. M. **Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA v.98, pp.8821-8826, 2001.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. **Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species.** FEMS Microbiol.Lett., v.205, pp.31–36, 2001.

GILLINGS, M. & HOLLEY, M. **Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements.** Letters Appl. Microbiol., Bedford, v.25, pp.17-21, 1997.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T.V.K.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. **Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos.** Acta .Sci. Technol., Maringá, v.30, n°1, pp.109-118, 2008.

HAENNI, M.; GALOFARO, L.; PONSIN, C.; BES, M.; LAURENT, F.; MADEC, J.Y. ***Staphylococcal* bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone.** J. Antimicrob. Chemother., v.66, pp. 216–218, 2011.

HALLIN, M.; DENIS, O.; DEPLANO, A.; DE MENDONCA, R.; DE RYCK, R.; ROTTIERS, S.; STRUELENS, M. J. **Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey.** J. Antimicrob. Chemother. v.59, pp.465–472, 2007.

HASMAN H., MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L.; STEGGER, M.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M. **Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry.** Vet. Microbiol. v.141, pp.326–331, 2010.

HATA, E. ; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; UCHIDA, I.; TANAKA, K.; EGUCHI, M. **Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans.** J. Clin. Microbiol. v.48, pp.2130–2139, 2010.

HOOKEY, J.V.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. **Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based in PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene.** J Clin Microbiol, Washington, v.36, n°4, pp.1083-1089, 1998.

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.** Euro Surveill., v.15, pp.19542, 2010.

- HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. **ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria.** *Molecular Microbiology* 5: 825-834, 1991.
- IKAWATY, R.; BROUWER, E.C.; JANSEN, M.D.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. **Characterization of Dutch *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis using a Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis.** *Vet. Microbiol.* v.136, pp.277–284, 2009.
- ISHII, S. & SADOWSKY, M.J. **Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution.** *Environ. Microbiol.*v.11, pp. 733–740, 2009.
- 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.***Vet. Microbiol.* v.80, pp.131-138, 2001.
- JØRGENSEN, H. J.; MØRK, T.; CAUGANT, D. A.; KEARNS, A.; RØRVIK, L. M. **Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk.** *Appl. Environ. Microbiol.* v.71, pp.8352-8361, 2005.
- 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.** *Emerg. Infect. Dis.* v.13, pp.630-632, 2007.
- KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. **Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows.** *J. Clin. Microbiol.* v.33, pp.376-380, 1995.
- KARAHAN M ; CETINKAYA B. **Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey.** *Vet J.*,v.174, n°2, pp.428-431, 2007.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagn.Microbiol.**6^aed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.
- KORENOVÁ, J.; LOPAŠOVSKÁ, J.; KUČHTA, T. **Biofilm forming bacterial contaminants in small and medium-sized ewes' milk and meat processing enterprise in Slovakia.** *J. Food Nutr. Res.* v.48, pp.115–120, 2009.
- KOREEN, L., RAMASWAMY S. V., GRAVISS E. A., NAIDICH S., MUSSER J. M. ***spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation.** *J. Clin. Microbiol.*, v.42, pp.792-9,2004.
- LANOOT, B.; VANCANNEYT, M.; DAWYNDT, P.; CNOCKAERT, M.; ZHANG, J.L.; HUANG, Y.; LIU, Z.H.; SWINGS, J. **BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S.***

colombiensis, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. Syst. Appl. Microbiol, v.27, pp.84–92, 2004.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. **Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting.** J. Basic Microbiol., v.33, pp.413-426, 1993.

LOEFFLER, A. & LLOYD, D. H. **Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community?** Epidemiol. Infect. v.138, pp.595–605, 2010.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. **Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard.** Appl. Environ. Microbiol. v.69, pp.290–296, 2003.

MARAFON, G. J. **Industrialização da agricultura e formação do Complexo Agroindustrial no Brasil.** Geo UERJ Revista do Departamento de Geografia, Rio de Janeiro, v.3, pp.7-21, 2004.

MARQUES, V. F. **Caracterização Fenogenotípica Dos Fatores De Virulência Em *Staphylococcus* spp. Isolados De Mastite Bovina.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, 2012.

MASLOW, J. & MULLIGAN, M. E. **Epidemiologic Typing Systems.** Infec. Control and Hosp. Epidem., v.17, n°9, pp.595-604, 1996.

MCDUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K., TENOVER, F. C. **Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database.** J. Clin. Microbiol. v.41, pp.5113–5120, 2003.

MEACHAM, K.J.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; BAUER, R.J.; MARRS, C.F. **Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR.** J. Clin. Microbiol. v.41, pp.5224–5226, 2003.

MEINTANIS, C.; CHALKOU, K.I.; KORMAS, K.A.; LYMPEROPOULOU, D.S.; KATSIFAS, E.A.; HATZINIKOLAOU, D.G.; KARAGOUNI, A.D **Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus Geobacillus.** Lett. Appl. Microbiol. v.46, pp.395–401, 2008.

MENDOÇA, E. L. C. **Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastites clínicas e subclínicas em unidades leiteiras de municípios do rio de janeiro como subsídio para implementação de medidas de controle.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, 2012.

MIDDLETON, J.; FOX, L.; GAY, J.; TYLER, J.; BESSER T. **Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices.** Epidemiol. Infect. v.129, pp.387- 395, 2002.

MONECKE, S.; COOMBS, G.; SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C.; AKPAKA, P.; BORG, M.; CHOW, H.; JATZWALK, L.; JONAS, D.; KADLEC, K.; KEARNS, A.; LAURENT, F.; O'BRIEN, F. G.; PEARSON, J.; RUPPELT, A.; SCHWARZ, S.; SCICLUNA, E.; SLICKERS, P.; TAN, H. L.; WEBER, S.; EHRICHT, R. **A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. PLoS ONE v.6, e17936., 2011.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. **Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms**. J. Clin. Microbiol. v.40, pp.2119-2125, 2002.

MORET-STALDER, S.; FOURNIER, C.; MISEREZ, R.; ALBINI, S.; DOHERR, M.G.; REIST, M.; SCHAEREN, W.; KIRCHHOFER, M.; GRABER, H.U.; STEINER, A.; KAUFMANN, T. **Prevalence study of *Staphylococcus aureus* in quarter milk samples of dairy cows in the Canton of Bern, Switzerland**. Prev. Vet. Med. v.88, pp.72–76, 2009.

MØRK, T., TOLLERSRUD, T.; KVITLÉ, B.; JØRGENSEN, H. J.; WAAGE, S. **Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis**. J. Clin. Microbiol. v.43, pp.3979–3984, 2005.

MURCHAN, S., KAUFFMANN, M. E.; DEPLANO, A. ; DE RYCK, R.; STRUELENS, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; RAMSJÖ, U.; COOMBES, G.; COOKSON, B. **Harmonization of pulsed field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains**. J. Clin. Microbiol. v.41, pp.1574-1585, 2003.

OLIVE, D. M. & BEAN, P. **Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms**. J. Clin. Microbiol. v.37, pp.1661–1669, 1999.

PANTOSTI, A. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health**. Front Microbiol.,v.3, pp.127, 2012.

PAPALEXANDRATOU, Z.; CLEENWERCK, I. DE VOS, P.; DE VUYST, L. **(GTG)₅-PCR reference framework for acetic acid bacteria**. FEMS Microbiol. Lett., v.301, pp.44–49, 2009.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, I. P.; GUTSER, K.; KERESZTÚRI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. **Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary**. Int. J. Food Microbiol.,v.118, pp.186-193, 1997.

PRESTES D.S.; FILAPPI A. & CECIM M. **Susceptibilidade à Mastite, fatores que a influenciam: uma revisão**. Revista FZVA, Uruguaiiana, v.9, nº1, pp.118-132, 2002.

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**. J. Med. Microbiol. v.56, pp.1505-1511, 2007.

RIBEIRO M.E.R., PETRINE L.A., AITA M.F., BALBINOTTI M., STUMPF JR W., GOMES J.F., SCHRAMM R.C., MARTINS P.R. & BARBOSA R.S. **Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul.** Rev. Bras. Agrociênc. v.9, nº3, pp.287-290, 2003.

ROBINSON, D. A. & ENRIGHT, M. C. **Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Clin. Microbiol. Infect., v.10, pp. 92–97, 2004.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEZUTKA, A., D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R. **Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms.** Trends in Food Science & Technology, v.18, nº6, pp.306-319, 2007.

ROESCH M., DOHERR M. G., SCHAREN W., SCHALLIBAUM M., BLUM J. W. **Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems.** J. Dairy Res. v.74, pp.86–92, 2007.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. **Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.** Cell, v.37, nº1, pp.67-75, 1984.

SILVA, N. **Doença da glândula mamária: mamite/mastite.** In: MARQUES, D. C. Criação de bovinos. 7 ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, pp.435 - 451, 2003.

SMITH, E. M.; GREEN, L. E.; MEDLEY, G. F.; BIRD, H. E.; DOWSON, C. G. **Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom.** J. Clin. Microbiol. v.43, pp.4731-4736, 2005.

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*.** J. Med. Microbiol. v.58, pp.1343–1353, 2009

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. **The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme.** Vet. Microbiol. v.96, pp.91-102, 2003.

SON, R.; MICKY, V.; KASING, A.; RAHA, A.R.; PATRICK, G.B.; GULAM, R. **Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 outbreak strains in Miri, Sarawak (Malaysia).** Acta Tropica v.83, pp.169-176, 2002.

SOUSA, M.R.P., RISTOW, A.M., NOGUEIRA, E.B., FILHO, R.A.T. CORTEZ, M.A.S. **Caracterização de Pequenas Unidades Produtoras de Leite na região Centro e Noroeste do estado do Rio de Janeiro.** Ciência Veterinária v.18, nº2/3, pp.79-89, 2011.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; MELO, P. C.; FERRAUDO, G. M.; FERRAUDO, A. S.; CONDE, S. O.; FOGAÇA JUNIOR, F. A. **Molecular epidemiology of *Staphylococcus***

aureus isolates at different sites in the milk producing dairy farms. Brazilian Journal of Microbiology, 43(4): 1646-1650, 2012.

SPIGAGLIA, P. & MASTRANTONIO, P. **Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*.** J. Clin. Microbiol. v.41, pp.2454–2457, 2003.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. **A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products.** J. Food Prot., v.62, pp.1150-1156, 1999.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; SEMAN, M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; SEDLÁČEK, I.; SWINGS, J. **Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp.** FEMS Microbiol. Lett. v.247, pp.59–63, 2005.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, G.; ARCHER, J.; BIDDLE, S.; BYRNE, R.; GOERING, G.; HANCOCK, G. A.; HÉBERT, B.; HILL, R. **Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol. v.32, pp.407–415, 1994.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. N.; ALMEIDA, L. R. **Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça, v.7.nº10, pp.1-7, 2008.

TYLER, K. D.; WANG, G.; TYLER, S. D.; JOHNSON, W. M. **Factors affecting reliability and reproducibility of amplification- based DNA fingerprint of representative bacterial pathogens.** Journal of Clinical Microbiology, v.35,nº2,pp.199-214, 1997.

VAN BELKUM, A.; BAX, R.; PEERBOOMS, P.; GOESSENS, W. H. F.; VAN LEEUWEN, N.; QUINT, W. G. V. **Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** J. Clin. Microbiol. v.31, pp.798±803, 1992.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KAUFMANN, M. E.; COOKSON, B.; FOREY, F.; ETIENNE, J.; GOERING, R.; TENOVER, F.; STEWARD, C.; O'BRIEN, F. **Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study.** J. Clin. Microbiol. v.36, pp.1653–1659, 1998.

VAN DER ZEE, A; VERBAKEL, H.; VAN ZON, J.C. **Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: Comparison of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker.** J. Clin. Microbiol. v.37, pp.342-349, 1999.

VAN LEEUWEN, W.; MELLES, D. C.; ALAIDAN, A.; AL-AHDAL, M.; BOELEN, H. A. M.; SNIJDERS, S. V.; WERTHEIM, H.; VAN DUIJKEREN, E.; PEETERS, J. K.; VAN DER SPEK, P. J.; GORKINK, R.; SIMONS, G.; VERBRUGH, H. A.; VAN BELKUM, A. **Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol. V.187, pp.4584-459, 2005.

VANDERHAEGHEN, W.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals.** Epidemiol. Infect. v.138, pp.606–625, 2010.

VERSALOVIC, J. & LUPSKI, J.R. **Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes.** In: De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (Eds.), *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*, 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, pp.38–48, 1999.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. **Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction.** Methods Mol. Cell.Biol. v.5, pp. 25–40, 1994.

VERSALOVIC, J.; KOUETH, T.; LUPSKI, J.R. **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.** Nucleic Acid Research v.19, pp.6823-6831, 1991.

WHIST A.C., OSTERAS O. & SOLVEROD L. **Clinical mastitis in Norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial.** Dairy Sci. v.89, pp.4649-4659, 2006.

WIESER, M., BUSSE, H.J. **Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol.v.50, pp.1087–1093, 2000.

WILSON, L.A. & SHARP, P.M. **Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR.** Mol. Biol. Evol.v.23, pp.1156–1168, 2006.

WOODS C. R.; VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J. R. **Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence based primers in the polymerase chain reaction.** J. Clin. Microbiol.v.30,pp.2921±2929, 1992.

ZADOKS, R. N.; VAN LEEUWEN, W. B.; KREFT, D.; FOX, L. K.; BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM, A. **Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking-equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing.** J. Clin. Microbiol. v.40, pp.3894-3902, 2002.

ZADOKS, R.; VAN LEEUWEN, W.; BARKEMA, H.; SAMPIMON, O.; VERBRUGH, H.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM, A. **Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates.** J. Clin. Microbiol. v.38, pp.1931-1939, 2000.

ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. **Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*.** Veterinária e Zootecnia, v.15, nº1, 56-65, 2008.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V. **Subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*: cost benefit analysis of antibiotic therapy in lactating cows.** Arq.Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, pp.577-585, 2007.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. **New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci.** Journal of clinical microbiology, v.42,nº11,pp.4947–4955, 2004.

ZSCHÖCK, M.; RISSE, K.; SOMMERHÄUSER, J. **Occurrence and clonal relatedness of sec/tst-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis.**Lett. Appl. Microbiol. v.38, pp.493-498, 2004.

ANEXO I

Origem dos isolados de *Staphylococcus aureus* utilizados no presente estudo.

Isolado	Fazenda	Município
1	A	Piraí
2	B	Rio Claro
3	C	Rio Claro
4	A	Piraí
5	A	Piraí
6	C	Rio Claro
7	C	Rio Claro
8	C	Rio Claro
9	C	Rio Claro
10	A	Piraí
11	A	Piraí
12	A	Piraí
13	A	Piraí
14	A	Piraí
15	A	Piraí
16	A	Piraí
17	D	Seropédica
18	D	Seropédica
19	D	Seropédica
20	D	Seropédica
21	D	Seropédica
22	E	Rio Claro
23	E	Rio Claro
24	E	Rio Claro
25	E	Rio Claro
26	E	Rio Claro
27	E	Rio Claro
28	E	Rio Claro
29	E	Rio Claro
30	E	Rio Claro
31	E	Rio Claro
32	E	Rio Claro
33	F	Rio Claro
34	F	Rio Claro
35	F	Rio Claro
36	F	Rio Claro
37	F	Rio Claro
38	F	Rio Claro
39	F	Rio Claro
40	G	Paracambi
41	G	Paracambi
42	G	Paracambi

43	G	Paracambi
44	G	Paracambi
45	G	Paracambi
46	G	Paracambi
47	G	Paracambi
48	G	Paracambi
49	G	Paracambi
50	H	Paracambi
51	H	Paracambi
52	H	Paracambi
53	H	Paracambi
54	H	Paracambi
55	H	Paracambi
56	H	Paracambi

ANEXO II

Protocolos com variações utilizadas para a padronização da técnica de ERIC- PCR para *Staphylococcus aureus*.

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
MgCl ₂ (Fermentas®)	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM
dNTP (Fermentas®)	0,5mM	1 mM	0,25 mM	0,25 mM	1 mM	1,25 mM
Primer (Bionner®)	0,6µM	1,2µM	1,2µM	1,2µM	1,2µM	1,2µM
Taq polimerase (Fermentas®)	2U	2U	2U	2U	2U	2U
DNA	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng
Volume da reação	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Ciclo	95°C 7min. 30x(90°C 30s, 58°C 1 min, 65°C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 7min. 30x(90°C 30s, 52°C 1 min., 65°C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30s, 52°C 1 min., 65°C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30s, 40°C 1 min., 65°C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30s, 40°C 1 min., 65°C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30s, 40°C 1 min., 65°C 8 min.) 68°C 16 min.

ANEXO II (Continuação)

	Protocolo 7	Protocolo 8	Protocolo 9	Protocolo 10	Protocolo 11	Protocolo 12
MgCl ₂ (Fermentas®)	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM
dNTP (Fermentas®)	1,25 mM	1,25 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,4 mM	0,4 mM
Primer (Bionner®)	1,2µM	2µM	0,5µM	2µM	2µM	2µM
Taq-polimerase (Fermentas®)	1U	1U	4U	4U	4U	4U
DNA	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng
Volume da reação	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	50 µl	50 µl
Ciclo	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x(94°C 30 seg., 44°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.

ANEXO III

Protocolos com diferentes concentrações e condições para a padronização da técnica de (GTG)5- PCR para *Staphylococcus aureus*.

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6	Protocolo 7	Protocolo 8
MgCl ₂ (Fermentas®)	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM
dNTP (Fermentas®)	200µM	200µM	200µM	200µM	200µM	200µM	0,2 mM	0,4 mM
Primer (Bionner®)	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	0,5µM	2µM
Taq Polimerase (Fermentas®)	2U	2U	2U	1U	2U	4U	4U	4U
BSA	0,1%	0,1%	-	-	-	-	-	-
Formamida	-	1,6µl	-	-	-	-	-	-
Triton 100X	-	-	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,01%
DNA	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng	10ng
Volume da reação	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Ciclo	95°C 1min. 30x (94°C30 seg., 52°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C1min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 44°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.	95°C 1min. 30x (94°C 30 seg., 40°C 1 min., 65° C 8 min.) 68°C 16 min.