

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

TESE

***Staphylococcus* METICILINA-RESISTENTES DE ORIGEM
ANIMAL: DETECÇÃO DE VARIANTES DO GENE *mec* E SEUS
REGULADORES**

DAYANNE ARAÚJO DE MELO

2017



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

DAYANNE ARAÚJO DE MELO

***Staphylococcus* METICILINA-RESISTENTES DE ORIGEM
ANIMAL: DETECÇÃO DE VARIANTES DO GENE *mec* E SEUS
REGULADORES**

Sob a orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientação da Professora
Irene da Silva Coelho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
2017

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

DAYANNE ARAÚJO DE MELO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias.



Miliane Moreira Soares da Souza, DSc. UFRRJ
(Orientador)



Shana de Mattos de Oliveira Coelho, DSc. UFRRJ



Maréa Giambiagi de Marval, DSc. UFRRJ



Ciro César Rossi, PhD. UFRRJ



Celso José Braga de Oliveira, DSc. UFPB

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d528s de Melo, Dayanne Araújo, 1987-
Staphylococcus meticilina-resistentes de origem
animal: detecção de variantes do gene mec e seus
reguladores / Dayanne Araújo de Melo. - 2017.
82 f. : il.

Orientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.
Coorientadora: Irene da Silva Coelho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2017.

1. Resistência aos beta-lactâmicos. 2.
Staphylococcus spp. 3. Gene mec. 4. Reguladores do
gene mec. 5. Mastite Bovina. I. de Souza, Miliane
Moreira Soares, 1970-, orient. II. Coelho, Irene da
Silva, 1979-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.

“Não que por nós mesmos, sejamos capazes de pensar em alguma coisa, como se partisse de nós; pelo contrário a nossa suficiência vem de Deus. ”

(2 Coríntios 3:5)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar no meu caminho pessoas mais que especiais, e por conduzir essa jornada de forma tremenda!! Obrigada Senhor pela sua fidelidade!!

Aos meus familiares pela confiança torcida e amor incondicional sempre.

“Honra teu pai e tua mãe, como o Senhor teu Deus te ordenou, para que se prolongue teus dias, e que te vá bem na terra que o Senhor teu Deus te deu.”

Ao meu esposo, Bruno Duarte, por sempre acreditar no meu potencial, mesmo nos momentos em que eu mesma tinha dúvidas.

A professora Miliane Moreira Soares de Souza pelo exemplo de pessoa e profissional, obrigada pela orientação, pelos conselhos e pelas orações!

A professora Irene da Silva Coelho por todo carinho e atenção, por me apresentar a bioinformática e um mundo novo na Biologia Molecular!

A professora Shana de Mattos de Oliveira Coelho por acreditar no meu potencial profissional e me desafiar a ir além!

Aos companheiros do laboratório por tornarem a minha rotina mais leve, por me ajudarem e incentivarem sempre. Muito feliz por poder compartilhar com vocês minhas experiências, e poder contribuir de alguma forma com a pesquisa de cada um, aprendi muito com vocês!

A equipe do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, da Iowa State University- EUA, sob a orientação da Dr. Catherine Mary Logue, vocês tornaram essa experiência mais que especial, saudades imensas.

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.

Agradeço ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) e a COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pela bolsa de estudos, patrocínios e fomentos agraciados durante este doutorado, e pelo apoio em equipamentos utilizados no Laboratório de Biologia Molecular e em projetos que nos foram contemplados, e a FUNDAÇÃO CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) pela bolsa de doutorado sanduíche, uma das melhores experiências da minha vida.

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

BIOGRAFIA

Dayanne Araújo de Melo ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2006, diplomando-se em dezembro de 2010.

Durante a graduação, foi estagiária no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, realizando projetos na área de diagnóstico bacteriológico, além de auxiliar pesquisas em processos infecciosos em animais de companhia e em mastite bovina. Foi bolsista de iniciação científica do FAPERJ de 2008 a 2010, com os projetos intitulados Avaliação do Perfil de atividade de azitromicina frente a isolados bacterianos oriundos de processos infecciosos em animais de companhia e detecção de mecanismos de resistência”, e “Levantamento da microbiota bacteriana e perfil de suscetibilidade antimicrobiana em dermatopatias de animais de companhia” sob a orientação da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza.

Em 2010, foi aprovada no processo seletivo do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, sob a orientação da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza onde desenvolveu o trabalho “ Implicações da utilização de parâmetros humanos na detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e seus impactos da predição da resistência aos beta-lactâmicos em ambientes de produção leiteira”.

Em 2012, foi aprovada no processo seletivo do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, também sob a orientação da professora PhD Miliane Moreira Soares de Souza desenvolvendo Estudos sobre os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. isolados a partir da cadeia produtiva do leite como subsídio ao controle da mastite bovina.

Durante o curso de Pós Graduação ministrou aulas teórico-práticas na disciplina Bacteriologia Veterinária na UFRRJ, sob a orientação da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza, além de outras colaborações na mesma instituição, na disciplina Microbiologia Básica sob a orientação da professora PhD. Shana Mattos de Oliveira Coelho e na disciplina de Microbiologia Geral sob a orientação da professora PhD. Irene da Silva Coelho.

No período compreendido de julho a novembro de 2016 realizou doutorado “sanduíche” pela FAPERJ na Iowa State University- EUA, desenvolvendo o projeto intitulado “Detecção Molecular do gene *mec* em *Staphylococcus* spp. de diferentes hospedeiros e validação de *primer* Universal, sob a orientação da professora PhD. Catherine Mary Logue.

Em 2017, foi aprovada no processo seletivo do programa de Residência em Medicina Veterinária, na área de Diagnóstico Microbiológico na UFRRJ, sob a tutoria da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza.

RESUMO

MELO, DAYANNE ARAÚJO. *Staphylococcus* meticilina-resistentes de origem animal: detecção de variantes do gene *mec* e seus reguladores. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Staphylococcus spp. é um dos principais patógenos causadores da mastite bovina contagiosa, apresentando um alto nível de resistência antimicrobiana, especialmente aos beta-lactâmicos, o que favorece a sua persistência no rebanho. Com o objetivo de caracterizar cepas resistentes de *Staphylococcus* spp. em ambiente de produção leiteira, um total de 321 amostras de leite, ordenhadeiras, profissionais, e cães e gatos presentes no ambiente de ordenha foi coletado durante as quatro estações do ano no período de 2014 e 2015. Foram obtidas 248 cepas de *Staphylococcus* spp., sendo *Staphylococcus aureus* a espécie prevalente 64,1% (150/234). Os ensaios fenotípicos de resistência aos beta-lactâmicos revelaram elevados percentuais de resistência fenotípica à penicilina, indicando a produção de beta-lactamases como mecanismo de resistência predominante. Apenas *Staphylococcus* coagulase negativos amplificaram para o gene *mec* (*mecA*, *mecA* variante e *mecC*). Três cepas amplificaram o gene *mecA* clássico. Em duas foi possível amplificar a variante do gene *mecA* previamente reportada por nosso grupo de estudo. Ao analisar a correlação entre os marcadores cefoxitina e oxacilina com a detecção do gene *mec*, foi observada que a cefoxitina demonstrou maior poder discriminatório que a oxacilina em cepas de origem bovina do território nacional, entretanto esta correlação não foi observada nas cepas da coleção da Iowa State University analisadas, em que a oxacilina mostrou maior poder de predição. Os *primers* para a detecção dos genes do sistema regulatório *mec*, desenvolvidos neste estudo, classificaram apenas os isolados que amplificaram o gene *mecA* clássico, os quais carregavam o SCC*mec* tipo V, e os *primers* elaborados para a identificação das regiões adjacentes ao gene *mecA* variante não adicionaram novas informações, não sendo possível identificar o sistema regulatório do gene *mec* nos isolados *mecA* variantes. Elevada heterogeneidade genética e consequente baixa correlação clonal, foi observada nas cepas de *S. sciuri mec* positivas submetidas a técnica de PFGE.

Palavras-chave: resistência aos beta-lactâmicos, mastite bovina e gene *mec*.

ABSTRACT

MELO, Dayanne Araújo. *Staphylococcus methicillin resistant from animals: Detection of mec variants and regulatory system*. 82 p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Staphylococcus spp. is the most important pathogen causing contagious bovine mastitis, presenting a high level of antimicrobial resistance, especially to beta-lactams, which favors its persistence in the herd. In order to characterize strains of *Staphylococcus* spp. from a dairy farm located in the South-Fluminense region of the state of Rio de Janeiro, samples of milk, milking, professionals and dogs and cats were collected in the milking environment of a farm during the four seasons of the year in the period of 2014 and 2015. A total of 321 samples were obtained, resulting in 248 isolates of *Staphylococcus* spp., and *Staphylococcus aureus* was the most prevalent specie, 64,1% (150/234). Phenogenotypic tests of resistance to beta-lactams revealed high percentages of phenotypic resistance to penicillin, indicating the production of beta-lactamases as the predominant mechanism of resistance. Only coagulase negative *Staphylococcus* amplified the *mec* gene (*mecA*, *mecA* variant and *mecC*). Three strains amplified the classic *mecA* gene. In two, it was possible to amplify the variant of the *mecA* gene previously reported by our study group. Analyzing the correlation between the cefoxitin and oxacillin markers with the detection of the *mec* gene, was observed that cefoxitin demonstrated greater discriminatory power than oxacillin in strains of bovine origin in the national territory, however this correlation was not observed in the strains of Iowa State University collection, in which oxacillin showed greater predictive power. The primers for the detection of the regulatory system of *mec* gene, developed in this study, classified only the isolates that amplified the classic *mecA* gene, which carried the SCC*mec* type V, and the primers elaborated for the identification of the regions adjacent to *mecA* variant gene, not added new information, and it is not possible to identify the regulatory system of the *mec* gene in variant *mecA* isolates. High genetic heterogeneity and consequent low clonal correlation was observed in strains of *S. sciuri* *mec* positive submitted to PFGE technique.

Keywords: antimicrobial resistance, bovine mastitis, *mecA* gene.

LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

AMH=Ágar Muller Hinton
AMVF: Agar Manitol Vermelho de Fenol
BHI = Infuso Cérebro Coração
CCS = Contagem de Células Somáticas
ccr: “*Cassete Chromosome Recombinases*”
CLSI: “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”
CMT = “*California Mastitis Test*”
DNA = Ácido desoxiribonucléico
dNTP = Desorribonucleotídeo trifosfatado
h = horas
HA-MRSA- *Staphylococcus aureus* meticilina resistente associado a hospitais
H₂O = Água
IS431: ilha de patogenicidade 431
min.= Minuto
mg= Miligrama
mL = Mililitros
mM = Milimolar
mm = Milímetros
MRSA = “*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*” - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
NaCl = Cloreto de sódio
ng = Nanogramas
nm = Nanômetro
pb = Pares de base
PBP = “*Penicillin Binding Protein*” - Proteína Ligadora de Penicilina
PCR = “*Polymerase Chain Reaction*” - Reação em Cadeia de Polimerase
PFGE = Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
pH = Potencial hidrogeniônico
rpm = Rotação por minuto
SCC*mec*: Cassete Cromossômico de *mec* Estafilocócico
SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativos
SCP: *Staphylococcus* Coagulase Positivos
SCV: *Staphylococcus* Coagulase Variável
seg. = Segundo
U = Unidades
V= Voltagem
µg = Micrograma
µL= Microlitro
°C = Graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Difusão em Disco dos beta-lactâmicos.	32
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos da amplificação dos genes <i>mec</i> .	35
Figura 3. Ágar <i>screen</i> de Oxacilina.	35
Figura 4. Microdiluição em caldo com cefoxitina.	36
Figura 5. Teste do Nitrocefin.	36
Figura 6. Esquema ilustrando as diferenças nucleotílicas do gene <i>mecA</i> .	39
Figura 7. Esquema ilustrando a conformação do Cassete cromossômico <i>mec</i> Tipo I a V.	43
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos da amplificação do NESTED-PCR.	46
Figura 9. Dendograma de similaridade das cepas de <i>S. sciuri</i> submetidas a técnica de PFGE.	47

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1. <i>Primers</i> e ciclos empregados para identificação de espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	20
Quadro 2. <i>Primers</i> e ciclos empregados para a amplificação dos genes de resistência	22
Quadro 3. <i>Primers</i> desenhados e ciclos empregados para a amplificação do gene <i>mecA</i>	39
Quadro 4. <i>Primers</i> desenhados e ciclos empregados para a amplificação do sistema regulador do gene <i>mecA</i>	44
Quadro 5. <i>Primers</i> desenhados e ciclos empregados para a amplificação dos genes adjacentes ao gene <i>mecA</i> variante	45
Quadro 6. <i>Primers</i> arbitrários utilizados na identificação dos genes adjacentes ao gene <i>mecA</i> variante.	46

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Esquema das coletas e quantidade de amostras.	15
Tabela 2. Padrão dos resultados de CMT, CCS, e isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. nos animais em lactação no período do inverno.	25
Tabela 3. Padrão dos resultados de CMT, CCS, e isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. nos animais em lactação no período da primavera.	26
Tabela 4. Padrão dos resultados de CMT, CCS, e isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. nos animais em lactação no período do verão.	26
Tabela 5. Padrão dos resultados de CMT, CCS, e isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. nos animais em lactação no período do outono.	27
Tabela 6. Distribuição e Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp de acordo com a estação do ano.	29
Tabela 7. Distribuição e frequência dos resultados obtidos na Difusão em Disco dos beta-lactâmicos (Antibiograma Interpretativo).	33
Tabela 8. Padrão Fenogenotípico da resistência aos beta-lactâmicos.	37
Tabela 9. Padrão de amplificação do gene <i>mec</i> e do <i>primer</i> Universal.	41
Tabela 10. Características dos isolados de <i>S. sciuri</i> submetidos a técnica de PFGE.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Panorama da Produção de Leite Bovino no Brasil	3
2.2	Avaliação da saúde da glândula mamária	4
2.3	Importância do <i>Staphylococcus</i> spp. na Etiopatogenia da Mastite	5
2.4	<i>Staphylococcus</i> spp. meticilina resistentes	8
2.5	Expressão fenotípica do gene <i>mecA</i> - PBP2a	11
2.6	Tipagem Molecular dos isolados de <i>Staphylococcus</i> meticilina resistentes pela técnica de <i>Pulsed-field Gel electrophoresis</i> (PFGE)	12
3	OBJETIVOS	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1	Amostragem	15
4.2	Cepas Controles	16
4.3	Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.	16
4.3.1	Prova da Coagulase.	16
4.3.2.	Resistência a Bacitracina	17
4.4.	Caracterização por MALDI-TOF MS	17
4.5	Caracterização Genotípica das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	18
4.5.1	Extração do DNA total bacteriano	18
4.5.2	Amplificação dos genes através da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction)	19
4.6	Deteção Fenotípica da Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos	20
4.6.1	Difusão em Disco	20
4.6.2.	Ágar <i>screen</i> de Oxacilina	20
4.6.3.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima com cefoxitina	21
4.7	Avaliação da Produção de Beta-lactamases	21
4.7.1	Ensaio de Difusão em Disco	21

4.7.2	Teste de Nitrocefin	21
4.8	Detecção de genes de resistência aos beta-lactâmicos	21
4.9	Sequenciamento e análise das sequências dos reguladores do gene <i>mecA</i>	22
4.10	Desenho de novos <i>primers</i>	23
4.11	Tipagem Molecular dos isolados de <i>Staphylococcus</i> meticilina resistentes pela técnica de <i>Pulsed-field Gel electrophoresis</i> (PFGE)	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Caracterização das amostras de leite	25
5.2	Caracterização dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	28
5.3	Caracterização Fenogenotípica da resistência aos beta-lactâmicos	32
5.4	Desenho de <i>primers</i>	39
5.4.1	<i>Primer</i> Universal para amplificação do gene <i>mecA</i>	39
5.4.2	<i>Primers</i> para a amplificação dos reguladores do gene <i>mecA</i>	43
5.4.3	<i>Primers</i> para a amplificação dos genes adjacentes ao <i>mecA</i> variante	45
5.5	Tipagem Molecular dos isolados de <i>Staphylococcus</i> meticilina resistentes pela técnica de <i>Pulsed-field Gel electrophoresis</i> (PFGE)	47
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de leite foi de 35,2 bilhões de litros em 2014. Do total produzido a mais em 2014, a Região Sul participou com 46%, ou seja, 426 milhões de litros. Os três estados da Região Sul produziram juntos 12,201 bilhões de litros, o que tornou o Sul a maior região produtora de leite do País, superando o Sudeste.

Neste mesmo ano, no Sudeste, São Paulo foi o que mais cresceu, Minas Gerais, que é o maior produtor de leite do Brasil, com volume de 9,367 bilhões de litros, teve um acréscimo de apenas 0,6%, o Espírito Santo cresceu 4,3%, no Rio de Janeiro a pecuária leiteira desacelerou, produziu 540 milhões de litros, uma redução de 5,1% em relação a 2013.

Desde o ano de 2015 tem sido observada uma queda na produção nacional em relação a anos anteriores, dentre os principais fatores que desencadearam esta redução foi a quebra de safra do milho, que encareceu a alimentação concentrada do rebanho, aumentando os custos para o produtor, desestimulando os investimentos na atividade. Outro fator que justifica o menor volume de leite produzido foi o preço internacional do leite, mais baixo quando comparado com o preço nacional, o que desencadeou a importação de leite principalmente da Argentina e do Uruguai.

Perdas significativas no setor também estão relacionadas a gastos com tratamentos, descarte do leite, além de acompanhamento veterinário do rebanho para controle e tratamento da mastite bovina, uma doença inflamatória da glândula mamária de causa multifatorial, podendo ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e mais frequentemente, infecciosa.

Staphylococcus spp. é o principal agente etiológico da mastite bovina contagiosa, sendo o *S. aureus* o mais importante patógeno em vacas leiteiras. *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) tem sido reconhecido como outro importante agente etiológico associado a infecções intra-mamárias, sendo as principais espécies de SCN que acometem vacas leiteiras *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosum*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, and *S. haemolyticus*.

A mastite é a maior responsável pelo uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras, sendo as cefalosporinas, penicilinas e suas combinações, aminoglicosídeos, lincosamidas e macrolídeos, os antimicrobianos mais comumente administrados, tanto durante o período de lactação quanto no período seco, para o tratamento e prevenção da

mastite. Os beta-lactâmicos, por sua grande variedade, representam a classe de antimicrobianos mais amplamente utilizada.

A resistência a meticilina (oxacilina) é um dos principais tipos de resistência do gênero *Staphylococcus*. Tal resistência está relacionada à transferência horizontal do gene *mecA*, que implica na resistência destes microrganismos a toda a classe dos beta-lactâmicos.

Na maioria dos isolados de *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes, a resistência a classe dos beta-lactâmicos é expressa de forma peculiar e heterogênea, sendo a detecção do gene *mecA* o padrão ouro para a detecção deste tipo de resistência. No entanto, em recente estudo foi identificado o primeiro homólogo do gene *mecA*, denominado *mecC*, isolado tanto de animais quanto em humanos. Outro estudo realizado no Brasil, detectou uma nova variante do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. Tanto o homólogo, *mecC*, quanto a variante bovina, não podem ser detectados com *primers* usualmente utilizados para a detecção do gene *mecA*.

O presente estudo considera que a multiplicidade de fatores associados à resistência aos β -lactâmicos, em especial à oxacilina e à cefoxitina, requer uma investigação minuciosa que inclua a detecção de diferentes marcadores genéticos de resistência para interpretar de forma correta o fenótipo de heteroresistência expresso por determinados isolados de *Staphylococcus* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Panorama da Produção de Leite Bovino no Brasil

A produção brasileira de leite foi de 35 bilhões de litros em 2015, número inferior em 0,4% em relação ao ano de 2014, segundo informações disponibilizadas pelo IBGE /Pesquisa da Pecuária Municipal (2016). Igualmente ao ano de 2014, a Região Sul liderou em números de produção de leite, com 12,32 bilhões de litros, sendo responsável por 35,2% da produção nacional. A Região Sudeste teve a segunda maior produção em 2015, representando 34% do total.

No comparativo dos estados, Minas Gerais se destacou novamente como principal produtor de leite, apresentando 9,14 bilhões de litros, o que corresponde a 76,8% da Região Sudeste e 26,11% do total da produção nacional. Em segundo lugar esteve o Estado do Paraná, com produção de 4,66 bilhões de litros de leite em 2015. A região Centro-Oeste representou 13,7% da produção nacional de leite, sendo que o Estado de Goiás representou 73,3% da produção da região. A produtividade média da produção de leite no Brasil foi de 1.609 litros/vaca/ano, em 2015, correspondendo a um crescimento de 5,7% em relação à observada em 2014 (1.525 litros/vaca/ano). O Rio Grande do Sul apresentou a maior produtividade dentre os estados, com 3.073 litros/vaca/ano, um aumento de 1,3% em 2015, comparado ao ano anterior. A menor produtividade foi encontrada no Estado de Roraima (345,2 litros/vaca/ano).

Apesar da importância desta atividade no cenário nacional, é perceptível que a maioria dos estabelecimentos rurais produz pouco leite, e um percentual menor é o responsável pela maior parte da produção nacional. Os estabelecimentos com produção diária inferior a 50 litros representam 79,7% do total e a participação em relação à quantidade produzida é de 25,9% do volume brasileiro. A maior parcela do leite brasileiro provém de sistemas com produção entre 50 e 200 litros por dia e as propriedades com volumes maiores, acima de 200 litros/dia, representam 3,2% do total de produtores de leite do País e 35% do volume nacional (EMBRAPA-Gado de Leite 2012).

No País, verifica-se a existência de um grande número de estabelecimentos que desenvolvem a atividade leiteira em condições ainda precárias. Os pequenos produtores praticam um tipo de exploração aquém da expectativa de um sistema de produção eficiente e sustentável, gerando uma significativa restrição do setor, com reflexos na indústria de lácteos, dependente de matéria-prima de qualidade, para sua modernização e

competitividade diante das exigências do mercado global (EMBRAPA-Gado de Leite 2012).

Uma das principais causas que levam a perdas significativas na produção leiteira, além de gastos com tratamentos, é a mastite bovina, uma inflamação da glândula mamária que pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e mais frequentemente, infecciosa, causadora dos maiores prejuízos econômicos e produtivos aos rebanhos leiteiros em todo o mundo (FONSECA & SANTOS, 2000).

A mastite bacteriana pode ser de duas origens: ambiental, cuja infecção ocorre no período entre ordenhas, apresenta como principais agentes envolvidos patógenos ambientais oportunistas que estão presentes no habitat normal dos animais, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas, com destaque para a espécie *Escherichia coli* (BEAUDEAU et al., 2002); e a contagiosa, cuja infecção ocorre durante a ordenha (SVILAND & WAAGE, 2002; SOMMERHÄUSER et al., 2003), sendo causada por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos. Os agentes mais envolvidos são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. (BRITO & RITO, 2000).

A mastite apresenta duas formas: clínica, em que se observa a presença dos sinais evidentes de inflamação como edema, rubor, aumento de temperatura, endurecimento, dor e pus, além de alteração das características do leite como a presença de grumos (BRADLEY et al., 2002); e a subclínica, na qual não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere (PERSSON & WALLER et al., 2003). Esta forma caracteriza-se por alterações na composição do leite, tais como aumento na contagem de células somáticas (CCS), dos teores de cloro e sódio, e dos teores de proteínas séricas; além da diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (GIANOLA et al., 2004); fazendo com que haja menor rendimento na produção de seus derivados, além de diminuir o tempo de prateleira do produto (BRADLEY et al., 2002).

2.2. Avaliação da saúde da glândula mamária

A presença de células somáticas no leite é um sinal de inflamação da glândula mamária, causada principalmente por agentes infecciosos (Harmon 1994). A invasão da glândula mamária por microrganismos é seguida de um aumento do número de leucócitos no leite, a maioria, neutrófilos polimorfonucleares (Burvenich et al. 1995). Essas células

fazem parte dos mecanismos naturais de defesa do animal, migram da corrente circulatória para a glândula mamária e são designadas de células somáticas do leite.

Células somáticas são constituídas principalmente por leucócitos, distribuídos em macrófagos (60%), neutrófilos (15%) e linfócitos (25%). O leite da glândula mamária sadia da vaca tem entre 20.000 (ou menos) e 50.000 células/mL, considera-se que vacas com CCS (Contagem de Células Somáticas) menor que 200.000/mL têm maior probabilidade de não estarem infectadas com os chamados patógenos principais da mastite, enquanto vacas com CCS acima de 300.000 têm maior probabilidade de estarem infectadas (EMBRAPA Gado de Leite, 2016).

A contagem de células de 250.000/mL tem sido recomendada como valor limiar para indicar a presença ou ausência de inflamação ou mastite. Deve-se registrar, entretanto, que um pequeno percentual de vacas comprovadamente infectadas com os patógenos principais pode apresentar contagens celulares de menos de 250.000/mL, enquanto que algumas vacas infectadas com os chamados patógenos secundários, como *Staphylococcus coagulase negativos*, podem ter CCS acima de 250.000/mL (EMBRAPA Gado de Leite, 2016).

Outra ferramenta utilizada para análise da saúde da glândula mamária que tem sido amplamente utilizada por ser um método rápido e prático é o CMT, no qual 2 mL de leite é misturado com igual volume de solução de detergente (lauril sulfato de sódio a 3%), isso é suficiente para coagular o DNA das células presentes no leite, e de acordo com o grau de coagulação classifica-se as amostras em -, +, ++ e +++. Apesar de o CMT não contar as células, apenas fazer uma estimativa, existe uma correlação proposta entre os seus escores e a CCS (EMBRAPA Gado de Leite, 2016).

O teste do CMT é o teste de referência utilizado pelo nosso grupo de pesquisa para avaliarmos dentro de um rebanho leiteiro as amostras de leite que serão coletadas para a análise bacteriológica, sendo utilizado como uma importante ferramenta de triagem para a identificação de animais com mastite subclínica.

2.3. Importância do *Staphylococcus spp.* na Etiopatogenia da Mastite

Cerca de 50 espécies de *Staphylococcus spp.* compõem a microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos (BECKER et al., 2014), desta forma, o gênero *Staphylococcus* é considerado o principal agente etiológico da mastite bovina contagiosa; este gênero está dividido em dois grupos com base na produção da enzima coagulase.

Staphylococcus coagulase-positivos (SCPs), representados de modo geral por oito espécies: *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae* (TAPONEN et al., 2012; SASAKI et al., 2010), sendo *S. aureus* a espécie mais patogênica do gênero e associada a um amplo espectro de doenças, desde lesões cutâneas superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em animais (SAKAI et al., 2004; SCALETTI et al., 2011). *Staphylococcus aureus*, o principal patógeno deste grupo, possui a capacidade de desenvolver resistência a diferentes antibióticos utilizados na rotina clínica (PANTOSTI et al., 2007), o que torna suas infecções mais difíceis de controlar e de considerável gravidade, podendo levar ao óbito.

Staphylococcus coagulase-negativos (SCNs) podem ser divididos em dois grupos dependendo da sensibilidade. Os *Staphylococcus* sensíveis a novobiocina incluem os *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e os resistentes a novobiocina são as espécies *S. saprophyticus* e *S. xylosus* (HEILMANN & PETERS, 2000; vonEIFF et al., 2004), e ainda o grupo *Staphylococcus sciuri*, composto por *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. vitulinus*, *S. fleurettii* e *S. stepanovicii* (DE VOS et al., 2009; HAUSCHILD et al., 2010).

Staphylococcus coagulase variável: *S. hyicus* faz parte da microbiota comensal de vários animais e é frequentemente encontrado em suínos, associado a doenças epiteliais, sendo primariamente conhecido como agente causador da epidermite exsudativa, mas que também já foi isolado de bovinos com mastite subclínica, infecções em equinos e em humanos (CASANOVA et al., 2011; STEPHAN et al., 2008); *S. agnetis* também compreende o grupo dos coagulase variáveis, cerca de 20-25% dos isolados apresentam resultado positivo para coagulase após 24 horas, e também tem sido detectados no leite de bovinos com mastite (TAPONEN et al., 2012), assim como *S. hyicus*. Já *S. schleiferi* subsp. *coagulans* vem ganhando importância clínica veterinária por ser o agente responsável por otites e piodermites, com maior relevância em cães (YAMASHITA et al., 2005). *S. lutrae* foi descrito em 1997 por Foster e colaboradores como uma espécie de SCP isolada de lontras.

Durante muitos anos, apenas os SCPs eram implicados como patogênicos, sendo *S. aureus* o mais importante patógeno em vacas leiteiras. *Staphylococcus coagulase-negativos* (SCN) têm sido reconhecido como importantes agentes etiológicos associados a infecções intra-mamárias (HOSSEINZADEH & DASTMALCHI SAEI, 2014), sendo as principais espécies de ECN que acometem vacas leiteiras *S. chromogenes*, *S.*

simulans, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, and *S. haemolyticus* (THORBERG et al., 2009; PARK et al., 2011). No entanto, outras espécies também têm sido relatadas.

Nos últimos anos, a importância de *Staphylococcus* coagulase-negativos tem aumentado significativamente. *Staphylococcus sciuri* tem sido frequentemente isolado de processos infecciosos em animais e humanos, o que demonstra que membros deste grupo também possuem potencial patogênico, além de serem importantes carreadores de diferentes genes de resistência e virulência, como genes implicados na formação de biofilme, produção de toxinas e resistência múltipla (NEMEGHAIRE et al., 2014a).

Dada a diversidade de espécies e subespécies do gênero, uma técnica promissora, baseada na análise proteômica MALDI-TOF MS (Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz) tem sido cada vez mais utilizada para a identificação deste gênero, particularmente na identificação microbiológica, destacando a velocidade de obtenção dos resultados, baixo custo, quantidade mínima de amostra exigida e baixos níveis de resíduos químicos e biológicos gerados (DUBOIS et al., 2010; ALATOOM et al., 2011; CARBONNELLE et al., 2011; SALGADO, 2013). O excelente desempenho desta técnica na identificação das espécies de ECNs isolados de mastite bovina foi apontado por diversos estudos (GIEBEL et al., 2010; PIESENS, 2011a; FREY et al., 2013; SALGADO, 2013). Esta técnica permite a identificação rápida e precisa da espécie bacteriana (DECRISTOPHORIS et al., 2011), sendo utilizado como método de referência na identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. avaliadas no presente estudo.

A mastite é a maior responsável pelo uso de antibacterianos em fazendas leiteiras, sendo as cefalosporinas, penicilinas e suas combinações, aminoglicosídeos, lincosamidas e macrolídeos, os antimicrobianos mais comumente administrados, tanto durante o período de lactação quanto no período seco, para o tratamento e prevenção da mastite (SAINI et al., 2012a; SAEI et al., 2012). Entretanto, independentemente da droga utilizada, a baixa taxa de cura é comum em mastites causadas por *S. aureus*, e a resistência é considerada a principal razão para isso (SAINI et al., 2012b). A elevada pressão seletiva no ambiente de produção animal devido ao uso constante de antimicrobianos, favorece a seleção e emergência de bactérias resistentes.

2.4. *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes

Staphylococcus multirresistentes causam desde doenças leves, como infecções de pele, a enfermidades mais graves como pneumonia e septicemia, podendo levar o paciente a óbito, uma vez que as opções terapêuticas nestes casos são limitadas (YE et al., 2016).

A utilização de antimicrobianos nos alimentos dos animais de produção tem sido associada com a emergência de cepas de *Staphylococcus* multirresistentes em humanos e animais (YE et al., 2016). Outro fator que tem auxiliado na emergência destas cepas é o uso indiscriminado de antimicrobianos na clínica veterinária, levando à rápida aquisição de resistência aos antimicrobianos frequentemente utilizados (YOON et al., 2010).

A resistência ao antimicrobiano meticilina, apesar de não ser a mais frequente, é um dos principais tipos de resistência do gênero *Staphylococcus*. *Staphylococcus* meticilina resistente é um importante patógeno de humano isolado de uma ampla variedade de animais domésticos (cães, gatos, coelhos, cavalos, vacas, porcos, galinhas e espécies exóticas), tanto sadios quanto doentes (WEESE et al. 2010). Sua importância não está apenas relacionada à sua distribuição e patogenicidade, mas também à habilidade que este microrganismo possui de resistir aos efeitos dos principais antimicrobianos utilizados na prática terapêutica (JAMALI et al., 2014).

A resistência estafilocócica aos beta-lactâmicos está relacionada a dois mecanismos principais: a produção de beta-lactamases codificada pelo gene *blaZ*, e a alteração do sítio de ação do antimicrobiano, pela produção de uma proteína ligante de penicilina modificada (PBP2a ou PBP2') de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* (SOARES et al., 2012).

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, denominado "cassete cromossômico estafilocócico *mec*" (SCC*mec*), que é formado por 2 componentes principais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade IS431, pelo gene *mecA*, que codifica a resistência, e seus reguladores *mecI* e *mecRI*, e pelo complexo *ccr* que codifica as recombinases do cassete cromossômico, as quais são responsáveis pela correta excisão e conseqüentemente integração deste elemento no cromossoma estafilocócico (HIRAMATSU et al. 2014).

A literatura relata a prevalência de diferentes tipos de SCC*mec* em isolados estafilocócicos de origem humana (ITO et al., 2001), mas a prevalência deste sistema cromossômico em isolados provenientes de animais tem sido relatada (JANSEN et al., 2009). São descritos 11 tipos de elementos SCC*mec*, originados da recombinação de oito

diferentes complexos de genes *ccr* e 6 diferentes genes do complexo *mec* (International Working Group on the *Staphylococcal Cassette Chromosome* elements, 2012).

A expressão do fenótipo da resistência a beta-lactâmicos não depende apenas do gene *mecA*; esta expressão está sob um controle mais complexo, que está apenas começando a ser melhor compreendido. Na maioria dos isolados de MRSA, a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos é expressa de forma peculiar e heterogênea: inóculos formadas a partir de uma única colônia podem apresentar populações com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) diferenciados. Crescimentos compostos por uma maioria de células com valores baixos de CIM para beta-lactâmicos, além de subpopulações de bactérias com valores de CIM extremamente altos numa frequência mais baixa (AEDO & TOMASZ 2016). Devido esta heterogeneidade fenotípica, a detecção do gene *mecA* é considerada pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI VET, 2013; CLSI, 2014), como método padrão ouro para confirmação de isolados meticilina resistentes. Entretanto, ao analisarmos amostras de origem animal, esta proposição não se mostra confiável, uma vez que variantes do gene podem dificultar sua detecção nestas amostras.

No Reino Unido, García-Álvarez e colaboradores (2011) identificaram isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes que carregavam um gene homólogo ao *mecA*, posteriormente nomeado *mecC*, em amostras de origem bovina. A descoberta deste homólogo do gene *mecA* enfatiza a possibilidade da circulação de outros alelos deste gene no ambiente de produção animal, e este pode ser adquirido por *S. aureus*, levando à emergência de novas cepas meticilina resistentes (FITZGERALD et al., 2012). Shov e colaboradores (2014) identificaram recentemente este mesmo homólogo em *Staphylococcus* spp. isolados de humanos e outros animais.

Em estudos anteriores desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Bacteriologia Veterinária da UFRRJ, não foi encontrado um alto nível de correlação entre a detecção fenotípica de resistência aos beta-lactâmicos e a presença do gene *mecA* ao analisarmos cepas oriundas de processos infecciosos em animais domésticos (MENDONÇA 2012; PEREIRA 2010; SOARES 2010). Uma das possíveis razões seria a presença do homólogo, no entanto, não foi possível detectar tal gene.

Mediante a baixa detecção genotípica e elevadas taxas de resistência fenotípica observada nos isolados de *Staphylococcus* de origem animal, tanto o gene *mecA* clássico como seu homólogo *mecC*, em nossos estudos, alguns aspectos foram reconsiderados, como possíveis variações na composição nucleotídica do gene *mecA*, e

consequentemente, a detecção do mesmo como padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina resistentes.

Avaliando estes aspectos, Melo e colaboradores (2014) identificaram uma nova variante do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. A partir do sequenciamento e comparação do gene variante com o clássico *mecA*, observaram-se mutações pontuais ao longo do gene, as quais impossibilitavam a detecção genotípica com *primers* anteriormente descritos, o que justificava a ausência de correlação fenogenotípica da resistência aos beta- lactâmicos nas cepas estudadas.

Estas diferenças na composição do gene *mecA* confirmam a importância de estudos mais detalhados para uma real compreensão da resistência mediada por *mecA* em *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes.

Outro aspecto controverso que deve ser considerado ao analisarmos a resistência mediada por *mecA* é o antimicrobiano utilizado para predizer tal resistência. O CLSI preconiza a cefoxitina como antimicrobiano de eleição para predizer a resistência mediada por *mecA*, e relata que cepas resistentes a oxacilina indicam apenas resistência à classe dos beta-lactâmicos, sem determinar o mecanismo envolvido (CLSI VET, 2014).

Broekman e colaboradores (2009), ao compararem a difusão em disco de cefoxitina e oxacilina com a detecção do gene *mecA* em cepas de *S. aureus*, validaram o proposto pelo CLSI, indicando o uso de cefoxitina, uma vez que este apresentou maior facilidade de leitura e sensibilidade.

Entretanto, Wu e colaboradores (2016), ao avaliarem a difusão em disco e CIM de cefoxitina e oxacilina na predição da resistência mediada por *mecA* em cepas do Grupo *Staphylococcus intermedius* de origem humana e animal concluíram que a cefoxitina não detecta de forma confiável a presença do gene *mecA*, indicando a utilização da oxacilina, por apresentar um melhor poder discriminatório em cepas de *S. pseudintermedius*.

Já Antunes e colaboradores (2007), ao compararem a difusão em disco simples de cefoxitina e oxacilina com a detecção do gene *mecA* em cepas de SCN, concluíram que nenhuma das técnicas apresentou 100% de sensibilidade e especificidade quando analisadas isoladamente para predição da resistência mediada por *mecA* em SCN, recomendando o uso de ambas as técnicas para reduzir as possíveis falhas na detecção deste tipo de resistência.

Associada a todas essas incongruências, a existência de cepas fenotipicamente sensíveis e *mecA* positivas, como descrito por Cuirolo e colaboradores (2011) ao avaliar

cepas MRSA oxacilina e cefoxitina sensíveis, preconiza como melhor teste para a determinação da resistência aos beta- lactâmicos nestes isolados, a detecção da PBP2a.

Desta forma podemos considerar que a identificação correta de cepas meticilina resistentes continua sendo um grande desafio para o laboratório clínico microbiológico.

2.5. Expressão fenotípica do gene *mecA* - PBP2a

A resistência a meticilina nos isolados de *Staphylococcus* spp. é mediada pela aquisição da proteína ligante de penicilina modificada PBP2a, a qual apresenta baixa afinidade com a classe de antimicrobianos beta-lactâmicos. A PBP2a é uma transpeptidase que, com o auxílio do domínio transglicosilase da PBP2 de *S. aureus*, pode catalisar a biossíntese da parede celular bacteriana na presença do antimicrobiano beta-lactâmico possibilitando o crescimento e sobrevivência da bactéria (HARTMAN & TOMASZ., 1984; PINHO et al., 2001).

Em um estudo desenvolvido por Kim e colaboradores (2012), comparando a atividade da *mecA*_{ALGA251} ou *mecC* denominada PBP2a_{ALGA} com a PBP2a codificada pelo gene *mecA* clássico, observaram-se diferenças nos seguintes quesitos: i) Mobilidade - PBP2a_{ALGA} mostrou maior mobilidade do que a PBP2a na SDS-PAGE (separação de proteínas em eletroforese de gel de poliacrilamida- PAGE, na qual nas amostras a separar é adicionado o detergente SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)- apesar das duas proteínas terem o mesmo peso molecular; ii) Temperatura ótima de ação - PBP2a_{ALGA} demonstrou uma menor temperatura ótima de ação em relação a PBP2a- que apresentou atividade estável a 37 °C, em contraste com a PBP2a_{ALGA}, que teve maior rendimento entre 25 °C a 37 °C. A redução da atividade está relacionada a uma instabilidade da proteína ao aumentar a temperatura para 37 °C; iii) Interação com dois beta-lactâmicos (oxacilina e cefoxitina) – PBP2a_{ALGA} se liga quatro vezes mais rápido a oxacilina do que a PBP2a, demonstrando uma maior afinidade por penicilina, em contra partida, não houve diferença significativa quanto à afinidade a cefoxitina. Este resultado sugere que a possível pressão seletiva sofrida pelo microrganismo ancestral contendo o gene *mecA*_{ALGA} ou *mecC*, foi devido a uma exposição a cefalosporina, a qual é rotineiramente utilizada no tratamento e na profilaxia da mastite bovina em medicina veterinária.

Apesar dos isolados de MRSA (*mecA*_{ALGA} e *mecA* clássico) não variarem significativamente na composição do cassete cromossômico *mec* (cerca de uma ou duas

substituições – 99 a 100% idêntico), o gene *mecA*_{ALGA} apresentou apenas similaridade de 69% com o gene *mecA* clássico (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011; KIM et al., 2012).

2.6. Tipagem Molecular dos isolados de *Staphylococcus* meticilina resistentes pela técnica de *Pulsed-field Gel electrophoresis* (PFGE)

O principal objetivo de se utilizar técnicas de tipificação é buscar correlação epidemiológica de isolados oriundos de surtos e verificar se os mesmos são geneticamente relacionados ou representam o mesmo microrganismo. Tal informação ajuda a entender e controlar a propagação de doenças tanto em hospitais quanto na comunidade (TENOVER et al. 1995).

A técnica de PFGE envolve incorporar o organismo em agarose, realizando uma etapa de lise e digestão do DNA cromossomal com enzimas de restrição. Peças dessa agarose contendo fragmentos do DNA cromossomal são inseridos nos poços de um gel de agarose, onde os fragmentos são revelados em padrões de bandas, através de um aparelho que regula a direção da corrente de acordo com um padrão pré-determinado. Desta forma, os padrões de bandas de um isolado podem ser comparados com os de outro isolado para se determinar se há relação entre eles (TENOVER et al. 1995).

Esta técnica, apesar de laboriosa e demorada, possui um elevado poder discriminatório e boa reprodutibilidade. A mesma tem sido empregada na tipificação de isolados de *S. aureus*, principalmente meticilina resistentes (DEURENBERG et al., 2006; HARAN et al. 2011; CARFORA et al. 2016).

Staphylococcus coagulase negativos, típicos oportunistas, hoje representam uns dos principais patógenos de infecções nosocomiais, tendo um impacto substancial na vida e na saúde humana, uma vez que também são considerados importantes reservatórios de genes de virulência e resistência (BECKER et al., 2014). Nemeghaire e colaboradores (2014b) relataram a presença de muitos genes de resistência e marcadores patogênicos oriundos de *S. aureus* em *S. sciuri* meticilina resistentes, sugerindo a troca de material genético entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos.

Desta forma, a tipificação de *Staphylococcus* coagulase negativos pela técnica de PFGE tem sido empregada para investigar, num contexto mais amplo, o papel destas cepas como reservatórios e disseminadores de genes de resistência e virulência para isolados de *S. aureus* meticilina resistentes (NEMEGHAIRE et al. 2014a).

Levando em consideração o exposto, o presente estudo visa acompanhar uma propriedade leiteira durante as quatro estações do ano, identificar e caracterizar os *Staphylococcus* spp. circulantes quanto ao perfil fenogenotípico de resistência aos beta-lactâmicos, e avaliar a diversidade molecular dos microrganismos meticilina resistentes.

3. OBJETIVOS

- Identificar fenogenotipicamente as espécies de *Staphylococcus* spp. envolvidas na etiologia da mastite bovina na propriedade estudada;
- Monitorar a resistência à classe dos beta-lactâmicos por meio de técnicas de detecção fenotípica;
- Detectar os principais genes de resistência à classe dos beta-lactâmicos, *mec* e *blaZ*;
- Desenhar e validar um *primer* Universal para a detecção dos genes *mec* (*mecA* e sua variante);
- Avaliar a presença dos genes *mec* em isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes espécies hospedeiras, oriundos da coleção bacteriológica da Iowa State University;
- Detectar os genes do sistema regulatório *mec* implicados na expressão da resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos;
- Correlacionar os resultados fenotípicos de resistência aos marcados cefoxitina e oxacilina com a predição da resistência mediada por *mec*;
- Tipificar, pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado, isolados meticilina resistentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Uma fazenda localizada na região Sul-fluminense do estado do Rio de Janeiro foi acompanhada durante um ano, 2014-2015. Foram realizadas coletas durante 3 semanas consecutivas em cada estação do ano (Inverno, primavera, verão e outono). Na primeira semana de cada estação, as amostras de leite eram coletadas em duplicata. Uma das amostras seguia para a Clínica do Leite (ESALQ/Campinas) para Contagem de Células Somáticas (CCS) e a outra, para o laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABAC-VET) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para a análise bacteriológica. Nas duas semanas subsequentes, procedia-se apenas a análise bacteriológica.

Uma vez por estação do ano, foram coletados também *swabs* das ordenhadeiras mecânicas, *swab* nasal e de mãos dos profissionais da ordenha e *swabs* nasais dos cães e gatos presentes no ambiente de ordenha; as mesmas foram enviadas para a análise bacteriológica no LABAC-VET. O esquema das coletas bem como os tipos de amostras está ilustrado na tabela 1.

Tabela 1. Esquema de coletas e quantidade de amostras.

Estação do Ano	Coleta/ semana	Tipo de amostra	Total por tipo de Amostra	
Inverno	1ª semana	Leite	31	
		<i>swabs</i> *	4 (Humano -2 nasais e 2 mãos) 4 (teteiras) 2 (Cães -2 nasais)	
	2ª semana	Leite	31	
	3ª semana	Leite	31	
	Primavera	1ª semana	Leite	37
			<i>swabs</i> *	4 (Humano -2 nasais e 2 mãos) 4 (teteiras) 1 (cão - nasais)
2ª semana		Leite	37	
3ª semana		Leite	37	
Verão	1ª semana	Leite	9	
	2ª semana	Leite	9	
		<i>swabs</i> *	6 (Humano -3 nasais e 3 mãos) 4 (teteiras) 3 (1 Gato, 2 Cães -3 nasais)	
	3ª semana	Leite	9	
	Outono	1ª semana	Leite	17
<i>swabs</i> *			4 (Humano -2 nasais e 2 mãos) 4 (teteiras)	
2ª semana		Leite	16	
3ª semana		Leite	17	
Total de amostras			321 amostras	

* *swabs* dos profissionais da ordenha (mão e nasal), ordenhadeira mecânica, cães e gatos (nasal).

Antes da coleta das amostras de leite, era realizada a antissepsia dos tetos com álcool 70% e em seguida, era realizado o “California Mastitis Test” (CMT). De acordo com a intensidade da reação classificavam-se as amostras em – (reação negativa), + (reação fraca), ++ (reação moderada) ou +++ (reação forte). Após o CMT coletavam-se as amostras de leite em *pool*, ou seja, em amostragem composta, uma alíquota de leite de cada teto bovino (Anterior direito- AD; Anterior esquerdo-AE; Posterior direito-PD, Posterior esquerdo-PE).

Como o presente estudo acompanhou o mesmo rebanho durante o período de um ano, o teste do CMT foi realizado em todos os animais em lactação da propriedade em questão, nas diferentes estações do ano, desta forma pode-se avaliar o poder discriminatório deste método de triagem frente aos demais analisados: isolamento de *Staphylococcus* spp. e contagem de células somáticas (CCS).

4.2. Cepas Controles

Foram utilizadas as seguintes cepas como controles dos testes fenotípicos e genotípicos desenvolvidos no presente estudo, como preconizado pelo CLSI (2014).

- ATCC 43 300 – *S. aureus* *mecA* e *blaZ* positivo;
- ATCC 29 213 – *S. aureus*;
- BAA 2312 *S. aureus* *mecC* positivo.

4.3. Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

As amostras de leite e *swabs* foram inoculadas em Ágar Manitol Vermelho de Fenol para isolamento seletivo dos *Staphylococcus* spp. A identificação dos isolados foi realizada através da observação das características das colônias e fermentação (ou não) do manitol (KONEMAN et al., 2008). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintórias.

4.3.1. Prova da coagulase

O teste para detecção da coagulase foi realizado utilizando o crescimento bacteriano obtido em caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI - Britania®), incubado a 37°C por 24 horas. Uma alíquota de 200 µL de cada amostra foi adicionada a 200 µL de

plasma de coelho (Larboclin®), seguida de incubação a 37°C por 6 horas, para visualização do coágulo. Amostras coagulase-negativas foram avaliadas quanto ao seu perfil de resistência à bacitracina (KONEMAN et al., 2008).

4.3.2. Resistência à bacitracina

Staphylococcus coagulase-negativos apresentam características semelhantes ao gênero *Micrococcus* spp., com relação à morfologia, coloração de Gram e às provas da catalase, KOH (3%) e coagulase, e são necessárias provas adicionais para sua diferenciação. Para isso, foi utilizada a prova da bacitracina. Uma suspensão bacteriana (1 mL) incubada por 24 horas em caldo BHI (Britania®) foi distribuída por toda a superfície de uma placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton, com o auxílio de um *swab*. Um disco de bacitracina 0,04 UI (SENSIFAR - CEFAR®) foi depositado sobre a superfície do meio, contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 35 °C ± 2 °C, a zona de inibição ao redor do disco foi observada e medida. *Staphylococcus* spp. são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto os micrococcos são sensíveis e apresentam halo de, no mínimo, 10 mm (KONEMAN et al., 2008). A partir do resultado da prova da coagulase, os isolados foram selecionados, encaminhados para identificação fenotípica das espécies (KONEMAN et al., 2008) e estocados em caldo BHI acrescido de 45% de glicerol para análises complementares.

4.4. Caracterização por MALDI-TOF MS

Os isolados foram identificados quanto a espécie pela técnica do Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF) no Laboratório Integrado de Microbiologia (LIM), Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Para o preparo das amostras, isolados foram cultivadas em ágar BHI a 37 °C por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida, 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados

em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que quanto maior o valor, mais confiável é a identificação. Considerou-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores ≥ 2.000 , indicando, de acordo com o FlexControl software 3.3, como uma identificação segura de gênero e provável de espécie.

4.5. Caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp.

Os isolados estudados foram reativados em Ágar sangue e posteriormente repicados em Ágar Infuso de Cérebro e Coração, e submetidos a extração de DNA para análises genotípicas.

4.5.1. Extração do DNA total bacteriano

Para extração do DNA total, cada isolado foi cultivado em 5ml de Caldo BHI a temperatura ambiente por 12-16 horas a 150 rpm. Em seguida, 1,5ml da cultura foi transferido para microtubos de 1,5 ml e centrifugado por 5 minutos a 1239g e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida três vezes. As células foram resuspendidas em 600 μ L de solução de extração (TrisHCl 200 mM; EDTA 25 mM; SDS 1%, NaCl 25 Mm, pH 8,0) e agitadas em Vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e foi adicionado 600 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico [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 μ L) e adicionado 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de manutenção a - 20 °C por 2 ou 12 h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados 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 em uma capela de exaustão, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura e armazenados a -20 °C.

Para quantificação do DNA total extraído, as amostras foram aplicadas com 1 µL de SYBR Green (INVITROGEN) diluído no gel de agarose 0,8 % e submetidas à eletroforese. Após a corrida, o gel foi visualizado sob transiluminador ultra-violeta 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 50 ng e a qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

4.5.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 1X (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl, e 0,1% Triton X-100, 2,0 mM de MgCl₂; pH 9,0), 0,3 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTP (FERMENTAS), 1 U de Dream Taq™ Green DNA Polimerase (FERMENTAS) e água mili-Q para completar um volume total de reação de 20 µL) e cerca de 20 ng de DNA total.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo corante SYBR Green (INVITROGEN) diluído, possibilitando a visualização dos amplicons no transiluminador ultra-violeta e documentação pela câmera fotográfica (SONY – Modelo DSC-HX1), utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (FERMENTAS).

A caracterização genotípica foi realizada pela amplificação utilizando *primers* específicos para o gênero *Staphylococcus* (ZHANG et al., 2004), e para a espécie *Staphylococcus aureus*, o gene *coa* (HOOKEY et al, 1998), o 23S rDNA (STRAUB et al., 1999) e *nuc* (CIFTCI et al, 2009) (Quadro 1). Considerou-se como *S. aureus*, isolados que amplificaram para pelo menos um dos *primers* testados.

Quadro 1. Primers e ciclos empregados para identificação de espécies de *Staphylococcus* spp.

Gene/Tamanho do fragmento	Espécie	Sequência dos primers (5'-3')	Ciclo*
16S rRNA (756pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	1
<i>Coa</i> (Variável)	<i>S. aureus</i>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	2
23S rDNA (930pb)	<i>S. aureus</i>	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	3
<i>nuc</i> (279 pb)	<i>S. aureus</i>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	4

* 1. (94 °C 40 s, 64° C 1 min., 72 °C 1 min 12 s) x 30; 2. 94 °C 4 min (94 °C 1 min, 60 °C 1 min., 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 5 min; 3. 95°C 5 min (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min; 4. 94 °C 5 min (94 °C 45 seg, 68 °C 45 seg, 72 °C 90 seg) x 30 e 72 °C 10 min.

4.6. Detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos

Os testes de detecção fenotípica da resistência foram executados conforme os padrões estabelecidos pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI VET, 2013) utilizando inóculo contendo $1,5 \times 10^8$ células/mL ajustados segundo a escala 0,5 de McFarland.

4.6.1 Difusão em disco

Todos os isolados foram submetidos à técnica de difusão em disco com os seguintes antimicrobianos: Oxacilina (10 µg) e Cefoxitina (30 µg).

O teste de difusão em disco foi realizado através da distribuição da suspensão bacteriana (0,1 mL) por toda a superfície das placas de ágar Mueller Hinton (Merck), onde foram depositados os discos dos antimicrobianos. Após incubação por 18 horas a 35 °C, os diâmetros formados ao redor do disco foram observados e medidos, em milímetros (CLSI VET, 2013).

4.6.2 Ágar “screen” de oxacilina

Para a realização do ágar “screen”, os isolados de *Staphylococcus* spp. na concentração de 0,5 de McFarland foram semeados na superfície do meio de cultura acrescido de uma concentração final de 6 µg/mL de oxacilina e após 24 horas de incubação a 37 °C, qualquer colônia crescida foi considerada resistente (CLSI VET, 2013).

4.6.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima com cefoxitina

O método da microdiluição em caldo foi utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima de cefoxitina nos isolados. Para isso a solução estoque de cefoxitina (1,0mg/ml) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/ml, 0,5µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 8,0 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml e 512 µg/ml em Caldo Muller Hinton (MH), sendo resistentes os isolados que cresceram em concentração igual ou superior a 4,0 µg/ml.

Após os processos de inoculação e incubação por 18 horas a 35 °C (CLSI VET, 2013). Para a determinação da concentração inibitória mínima foi considerada a primeira concentração do antimicrobiano em que não foi observado o crescimento bacteriano. A leitura foi realizada com o auxílio do reativo resazurina o qual avalia a atividade metabólica microbiana. Quando viável a solução adquire na coloração rosa, quando inviável, roxo. A concentração inibitória mínima foi considerada como a primeira concentração em que a solução adquiriu coloração roxa.

4.7. Avaliação da Produção de β -lactamase

4.7.1 Ensaios de difusão em disco

Ensaios de suscetibilidade com os antimicrobianos Amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg) e Penicilina G (10 UI) foram realizados segundo padrões estabelecidos pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI VET, 2013; CLSI, 2014).

4.7.2 Teste de nitrocefina

A produção de betalactamases foi detectada pelo uso de discos impregnados com Nitrocefina (Sigma®), uma cefalosporina cromogênica. A metodologia foi realizada segundo as recomendações técnicas do fabricante (Sigma®), na qual fragmentos de colônias isoladas foram colocados na superfície de um disco previamente umedecido com água destilada, conforme proposto pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI VET, 2013; CLSI, 2014). Se a cepa testada for produtora de betalactamase ocorrerá a hidrólise do anel beta-lactâmico, com produção de ácido cefalosporânico, e esta reação está associada a alteração de coloração de amarelo para rosa avermelhado.

4.8. Detecção de genes de resistência aos beta-lactâmicos

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes: *mecA* (MURAKAMI et al.1991), *mecA* variante (MELO et al., 2014) e *mecC* (STEEGER et al., 2012), seus genes reguladores *mecI* (LENCASTRE et al., 2002) e *mecRI* (ROSATO et al., 2003), e o gene *blaZ* (ROSATO et al., 2003), com os pares de *primers* descrito no quadro 2.

Quadro 2. *Primers* e ciclos empregados para a amplificação dos genes de resistência.

Gene/Tamanho do fragmento	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Ciclo*
<i>mecA</i> (533 pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1
<i>mecA</i> variante (809 pb)	CAG GCA TGC AGA AAA ATC AA TTG AGT CGA ACC AGG TGA TG	2
<i>mecC</i> (718 pb)	GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC CCT GAA TC[W] GCT AAT AAT ATT TC	3
<i>mecI</i> (209 pb)	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	4
<i>mecRI</i> (234 pb)	CCA AAC CCG ACA ACT AC CGT GTC AGA TAC ATT TCG	5
<i>blaZ</i> (861 pb)	TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG CAT TAC ACT CTT GGC GGT TT	6

*1. 94 °C 30 seg, 55 °C 30 seg, 72 °C 1 min) x 40 e 72 °C 5 min; 2. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min. 3. 94 °C 15 min (94 °C 30 seg, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 35 e 72 °C 10 min 4. 94 °C 4 min (94 °C 30 seg, 53 °C for 30 seg, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 4 min. 5. 95 °C 2 min. (95 °C 1 min, 53 °C 1 min., 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min.; 4. 95 °C 2 min. (94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg, 72 °C 30 seg) x 30 e 72 °C 4 min. 6. 94°C 5min. (94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min.

4.9. Sequenciamento e análise das variantes do *mec* e seus reguladores

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante. Ambas as fitas foram seqüenciadas pela empresa Helixxa (Campinas, Brasil) para confirmação das seqüências e assegurar fidelidade.

As seqüências foram analisadas utilizando o programa Bioedit (HALL et al., 1999) e foram comparadas com outras seqüências depositadas neste banco de dados do NCBI (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997).

4.10. Desenho de novos *primers*

Novos *primers* foram elaborados durante o presente estudo de acordo com os desdobramentos da pesquisa. Sequências dos alvos de interesse depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram comparadas alinhadas e analisadas, no programa Mega versão 7.0 (CASPERMEYER, et al., 2016), e posteriormente foram desenhados os *primers* utilizando o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

4.11. Tipagem Molecular dos isolados de *Staphylococcus* meticilina resistentes pela técnica de *Pulsed-field Gel electrophoresis* (PFGE)

O protocolo utilizado para a tipificação das amostras foi o preconizado pelo *Center for disease and control and prevention safer* (CDC), com alterações. A técnica foi desenvolvida durante o programa de Doutorado Sanduíche na Iowa State University.

Os isolados foram inoculados em placas de ágar tripticase de soja (TSA), e incubados a 37 °C por 18 a 24 horas. Cepas de *Salmonella* sorotipo Branderup H9812 foram utilizadas como controle.

Com o auxílio de um *swab*, as colônias dos isolados e controles foram coletadas e ressuspendidas em 6 mL água MiliQ autoclavada e posteriormente ajustados no espectrofotômetro (Absorvância = 0,9 a 1,1 a 610 nm). Em seguida, 200 µl da suspensão de células ajustadas foram transferidas para um no eppendorf contendo 4 µl de lisostafina para os isolados de *Staphylococcus* spp e 10 µl de Proteínase K para os controles de *S. ser. Braenderup*. Posteriormente adicionaram-se 300 µl de SeaKem® Gold Agarose equilibrados a temperatura de 55 °C à suspensão ajustada contendo a enzima específica de cada tipo de isolado e misturou-se as duas partes lentamente para não formar bolhas. Após homogeneização, a mesma foi depositada nos moldes de *plugs*. Para cada isolado, foram preparados dois *plugs*.

Para preparar a agarose, alguns aspectos foram considerados: a concentração da agarose depende do tipo de isolado, para *Staphylococcus* spp foi utilizada a concentração de 1,8% e para os controles, 1% acrescido de 1% de SDS.

Após a solidificação, os *plugs* dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram depositados em tubos Falcon contendo 3 ml de tampão de Lise (6 mM Tris HCl; 1M NaCl; 100 mM EDTA; 0,5% de Brij-58; 0,2% Desoxilato de Sódio; 0,5% Lauril-

sarcosina de sódio), e incubados a 37 °C por 4 horas. Já os *plugs* dos controles de *S. ser. Braenderup* foram depositados em 3 ml de outro tampão (50 mM Tris; 50 mM EDTA, pH = 8,0 + 1% sarcosil), foram incubados a 54 °C em banho maria e agitados vigorosamente por 2 horas.

Para a lavagem dos *plugs* dos isolados *Staphylococcus* spp. foram realizadas quatro lavagens utilizando em cada uma 6 ml de TE, num intervalo de 30 minutos entre cada. Já nas lavagens dos *plugs* controles de *S. ser. Braenderup* foram realizadas seis lavagens utilizando em cada 6 ml de água MiliQ nas duas primeiras, seguidas de quatro lavagens com TE, num intervalo de 10 minutos entre cada. Após a lavagem dos *plugs*, os mesmos foram estocados em TE e refrigerados a 4 °C.

Para a digestão enzimática, uma porção de aproximadamente 2 mm de cada *plug* foi cortada com o auxílio de bisturi estéril e placa de Petri. Cada porção foi depositada posteriormente em microtubo contendo 100 µl da mistura para a digestão enzimática (*Staphylococcus* spp.: 3 µl de *SmaI*, 10 µl de Tango Buffer e 87 µl de água MiliQ; e controles de *S. ser. Braenderup*: 2,5 µl de *xBall*, 10 µl de Tango Buffer e 87,5 µl de água MiliQ). Os isolados de *Staphylococcus* spp foram incubados a 25 °C e os controles a 37 °C por 3 horas. Após o período de digestão, os *plugs* foram lavados com TE e armazenados para a eletroforese em gel de campo pulsado.

Para a eletroforese em gel de Campo pulsado, os *plugs* foram acomodados na superfície dos dentes do pente e deixados alguns minutos à temperatura ambiente para secar. Foi preparado o tampão de corrida 0,5X TE, e esta concentração do tampão foi utilizada para o preparo do gel, 1% SeaKem[®] Gold agarose.

Após a mistura do gel alcançar uma temperatura de 55° a 60 °C, o mesmo foi depositado lentamente na cama contendo o pente com *plugs* aderidos aos dentes. Desta forma, o gel solidifica com os *plugs* já inseridos nos poços.

Em seguida é realizada a eletroforese em gel de campo pulsado, seguindo os parâmetros para CHEF DR-II, DR-III, e CHEF Mapper (Volts = 200 (6v/cm; Temp. 14 °C, transferência inicial = 5 segundos; Transferência final 40 segundos; tempo de corrida 18 horas).

Após a corrida, o gel foi corado com solução de Brometo de etídio por 20 minutos e uma fotografia do mesmo foi tirada, esta foi avaliada pelo programa *Bionumerics* para a análise dos perfis obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das amostras de leite

Para avaliarmos a presença da mastite estafilocócica nos bovinos do presente estudo, consideraram-se os resultados de CMT, isolamento de *Staphylococcus* spp., e os resultados de CCS de cada animal em lactação nas diferentes estações do ano (Tabelas 2,3,4 e 5).

Tabela 2. Padrão dos resultados de CMT, CCS e isolamento de *Staphylococcus* spp. nos animais em lactação no período do inverno.

Identificação (Inverno)	CMT (AD/PD/AE/PE) / semana			CCS (x mil/mL)	Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp./ semana		
	1	2	3		1	2	3
1	-/-/+	-/-/++	-/-/++	589	+	+	+
2	-/-/++	-/-++/-	+/-+/-	76	-	-	-
3	+/-/-/++	-/-++/-	-/-/++	1057	-	-	-
4	-/-/-	+++/+++/-/++	+++/+++/+++	729	+	+	+
5	-/-/-	-/-+/-	-/-/-	51	+	+	-
6	-/+/-+++	-/+++/+	-/+++/+	6863	+	+	+
7	-/-/+	-/+/-	-/+/-	547	+	+	-
8	-/-/+	-/+++/-	-/+++/+++	793	+	+	+
9	-/+++/+	++/++/-/+	+++/+++/+++	1263	+	+	-
10	-/+++/-	++/++/-/++	+++/+++/+	717	-	-	-
11	-/-/-	-/-+/-	-/-/+	68	-	-	-
12	-/+/-	-/+++/-	-/+++/-	343	-	-	-
13	-/-/+	-/-/+	-/-/+	133	-	-	-
14	+/-/-	+/-+/-	-/+/-	177	-	-	-
15	-/-/-	-/-/-	+/-/-	99	+	-	-
16	-/-/-	-/-/-	-/-/-	48	+	+	-
17	+/-/-	+/-/-	++/-/-	441	+	+	+
18	+/-/+	-/+++/-/+	-/+++/+	340	+	+	+
19	-/-/-	-/-/+	-/-/-	386	+	+	+
20	-/-/-	-/-/-	-/-/-	91	+	+	-
21	-/+/-	-/-/-	++/-/+	629	+	+	+
22	-/-/-	-/-/-	-/-/-	149	-	-	-
23	-/-/-	-/-/-	-/+/-	118	+	+	-
24	-/-/-	-/-/-	-/+++/-	16	+	+	-
25	-/+/-	-/+/-	-/+++/+	600	+	+	+
26	-/-/+	-/+/-	-/-/++	575	-	-	-
27	-/-/-	+/-/-	-/-/-	19	+	+	-
28	-/-/-	-/-/-	-/-/-	107	+	+	+
29	-/-/-	-/-/-	-/-/-	8	+	+	+
30	-/-/-	-/-/-	-/-/-	25	-	-	-
31	+++/-++/+	-/+/-	-/-/-	877	-	+	-

*CMT- California Mastite Teste; (-): reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada e (+++) reação forte; AD: Anterior direito; AE: Anterior esquerdo; PD: Posterior direito; PE: Posterior esquerdo; CCS: Contagem de células somáticas; N.A: não avaliado (morte/descarte).

Tabela 3. Padrão dos resultados de CMT, CCS e isolamento de *Staphylococcus* spp. nos animais em lactação no período da primavera.

Identificação (Primavera)	CMT (AD/PD/AE/PE) / semana			CCS (x mil/mL)	Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp./ semana		
	1	2	3		1	2	3
1	-/-/-	+/+/-/-	+/+/-/-	307	-	-	-
2	-/+/-/-	-/-/-	-/-/-	242	+	+	-
3	-/-/+	-/-/+++	-/-/+	272	+	+	-
4	-/+/+	-/+++/+/+++	-/+++/-/+++	793	-	-	+
5	-/-/+	-/-/-	+/+/-/+	142	-	-	-
6	+/-/-	-/-/-	-/+++/-/+	100	-	+	-
7	+++/-/+++/-	+++/-/+++/-	+++/+++/-/-	9999	+	-	-
8	-/+/+/+	+++/+++/+++	+++/+++/+++/+++	1582	-	+	-
9	+/-/-/+	-/-/+++	+/+++/+++	730	+	+	+
10	-/-/+	-/-/-	-/-/-	46	-	-	-
11	-/-/-	-/-/+	+/+/-/-	354	-	+	-
12	-/-/-	+/-/+++	-/+++/-	273	+	+	-
13	-/+/+/+	-/+/+/+	+/+++/+++/+++	1618	+	+	-
14	-/-/+++	-/-/+++	-/-/+++	269	-	-	-
15	-/+/-	+/-/-	-/-/-	10	-	-	-
16	+/+/-/-	-/-/+	-/-/-	360	+	+	-
17	-/-/-	-/-/-	-/-/+	12	-	-	-
18	+/+/-/+	+++/-/-	+/-/+	491	-	+	-
19	-/-/-	-/-/-	-/-/-	12	-	+	+
20	-/+/-	-/+++/-	-/-/-	171	-	-	-
21	-/-/-	-/-/+	-/+/-	1	+	-	-
22	+++/-/-	-/+++	+++/-/+++/-	1071	-	+	-
23	+/+++/-	-/-/-	-/-/-	423	+	+	-
24	-/-/-	-/-/-	-/-/-	17	-	+	-
25	+/-/-	-/-/-	-/-/-	1	+	-	-
26	-/+/-	-/-/-	-/-/-	15	+	+	-
27	+/-/-	-/+++/-	-/+++/-	346	+	-	-
28	+/+++/+/+++	+++/+++/+++	+/-/+	1429	+	-	-
29	+/-/+	+++/+++	-/-/-	815	+	-	-
30	+/+/-	-/-/-	-/-/-	139	+	+	-
31	-/-/-	-/-/-	-/-/-	52	+	+	-
32	-/+/+	+/-/-	+++/+++/-	897	+	+	-
33	-/-/-	-/+/+	+/+/-/+++	428	+	+	-
34	-/-/-	+/+/-/+++	-/N.A/-	19	-	+	-
35	-/-/-	-/-/-	-/-/-	120	-	-	+
36	-/-/-	-/-/-	-/+/-	74	-	-	-
37	-/+/+	-/+++	-/-/+	4483	+	+	-

*CMT- California Mastite Teste; (-): reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada e (+++) reação forte; AD: Anterior direito; AE: Anterior esquerdo; PD: Posterior direito; PE: Posterior esquerdo; CCS: Contagem de células somáticas; N.A: não avaliado (morte/descarte).

Tabela 4. Padrão dos resultados de CMT, CCS e isolamento de *Staphylococcus* spp. nos animais em lactação no período do verão.

Identificação (Verão)	CMT (AD/PD/AE/PE) / semana			CCS (x mil/mL)	Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp./ semana		
	1	2	3		1	2	3
1	-/-/-	-/-/-	-/-/-	170	+	+	+
2	-/-/+++	-/+++	-/+++	430	-	+	-
3	-/+++/+/+++	-/-/-	-/-/-	89	+	-	-
4	-/+/-	-/+/-	-/+/-	160	+	+	+
5	-/+++/+	-/+++/+++	-/+++/+++	1439	+	+	+
6	-/+++/+++	-/-/-	-/-/+++	6920	+	+	+
7	+++/+++/+++	-/+++/+++	+++/+++/+++	3829	+	+	+
8	+/-/+	-/-/+++	+/+/-	282	+	-	-
9	-/-/-	-/-/-	N.A	11	+	-	N.A
10	N.A	N.A	+/-/-	N.A	N.A	N.A	+

*CMT- California Mastite Teste; (-): reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada e (+++) reação forte; AD: Anterior direito; AE: Anterior esquerdo; PD: Posterior direito; PE: Posterior esquerdo; CCS: Contagem de células somáticas; N.A: não avaliado (morte/descarte).

Tabela 5. Padrão dos resultados de CMT, CCS e isolamento de *Staphylococcus* spp. nos animais em lactação no período do outono.

Identificação (Outono)	CMT (AD/PD/AE/PE) / semana			CCS (x mil/mL)	Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp./ semana		
	1	2	3		1	2	3
1	+++/+++/-/-	+++/-/+++/-	+++/-/+++/-	5816	+	+	-
2	++/++/++/++	-/+++/-/-	++/+++/+/++	1984	+	+	-
3	-/-/-/+	++/-/-/+++	+++/+/+/++	657	+	+	-
4	++/++/+++/++	+++/+++/+++/+	+++/+++/+++/+++	5731	+	+	+
5	+/+/+/+	+/+/+/+	+++/+++/+++/+++	1986	-	-	-
6	-/-/+/-	-/-/+	+/-/-/-	135	+	-	-
7	++/++/++/+	++/+++/+/-	+++/+++/+++/+++	1957	+	+	-
8	+/-/+/>++	-/+++/-/-	N.A	5471	++	-	N.A
9	-/++/-/++	-/-/+++/+++	-/-/++/++	1583	-	-	-
10	-/-/+/++	-/-/+/++	-/-/+++/-	1022	-	+	-
11	-/-/+++/-	++/++/-/-	++/+/+/+++	771	+	+	-
12	-/-/-/-	N.A	N.A	237	-	N.A	N.A
13	++/-/-/-	++/-/-/-	++/-/-/-	262	+	+	-
14	-/-/-/-	-/+++/-/++	+/+++/++/++	96	+	-	-
15	-/-/-/-	-/-/-/-	N.A	176	+	+	N.A
16	+++/-/+++/+++	+++/+++/-/+++	N.A	7033	+	+	N.A
17	-/+/-/-	-/-/-/-	-/-/++/+	363	+	-	-
18	N.A	N.A	-/-/-/-	N.A	N.A	N.A	-
19	N.A	N.A	++/-/-/-	N.A	N.A	N.A	-
20	N.A	N.A	+++/++/++/-	N.A	N.A	N.A	-
21	N.A	N.A	-/-/+++/+++	N.A	N.A	N.A	-

*CMT- California Mastite Teste; (-): reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada e (+++) reação forte; AD: Anterior direito; AE: Anterior esquerdo; PD: Posterior direito; PE: Posterior esquerdo; CCS: Contagem de células somáticas; N.A: não avaliado (morte/descarte).

Nas estações do verão e da primavera não foi possível a avaliação de todos os parâmetros (CMT, CCS e isolamento de *Staphylococcus* spp.). O animal 9 do verão, e os 8, 12, 15 e 16 do outono, foram retirados do rebanho, por motivo doença/morte/ e ou descarte, da mesma forma os animais 18, 19 20 e 21 do outono que foram inseridos no rebanho após o início das análises.

Analisando os resultados de CMT nas semanas das diferentes estações podemos observar a evolução do quadro presuntivo de mastite subclínica nos animais testados, e de forma geral foi possível observar uma correlação com o isolamento de *Staphylococcus* spp.

Avaliando os resultados do CMT como positivos verdadeiros (++ ou +++) e correlacionando diretamente com os resultados de isolamento de *Staphylococcus* spp., e posteriormente comparando os resultados obtidos com os valores de referência para CCS de ≥ 250.000 como indicativo de infecção intramamária (IIM), observamos que: i) No inverno, dentre os 16 animais CMT negativos, identificou-se isolamento de *Staphylococcus* em 11/16, porém apenas dois animais (7 e 19) apresentaram resultado de CCS ≥ 250.000 , indicando IIM; já dentre os 15 animais CMT positivos, foi possível isolar *Staphylococcus* spp. em 10/15, e em 100% destes foram observados valores de CCS

indicativo para IIM; dentre os 5/15 animais CMT positivos sem crescimento de *Staphylococcus* spp. apenas o animal 2 apresentou valor de CCS inferior a 250.000, sendo considerado um falso positivo, aos demais animais CMT positivos, com ausência de isolamento de *Staphylococcus* spp. e CCS sugestiva de IIM, atribuímos outros agentes como possíveis causadores da mastite subclínica; ii) Na primavera, dentre os 11 animais CMT negativos, identificou-se isolamento de *Staphylococcus* em 7/11, e nenhum destes apresentou resultado de CCS sugestivo de IIM; já dentre os 25 animais CMT positivos, foi possível isolar *Staphylococcus* spp. em 22/25, e apenas quatro animais (2, 6, 30 e 34) apresentaram valor de CCS inferior a 250.000, e o animal 5 estaria acometido por uma IIM não estafilocócica; iii) no verão, 100% (2/2) animais CMT negativo apresentaram valores negativos tanto para o isolamento quanto para a CCS, já dentre os sete animais CMT positivos, foi possível isolar *Staphylococcus* spp. em 6/7, apenas os animais 3 e 4 seriam considerados falso-positivos, apresentando valores positivos de CMT, acompanhado de isolamento de *Staphylococcus* porém com CCS inferior a 250.000; iv) no outono, 3 animais apresentaram valor de CMT negativo, sendo em 2/3 positivos para o isolamento de *Staphylococcus* spp. porém com valores de CCS inferior a 250.000, dentre os 14 animais CMT positivos, foi possível isolar *Staphylococcus* spp. em 12/14, e apenas um animal apresentou perfil falso-positivo para a IIM estafilocócica, e dois animais apresentaram perfil sugestivo de mastite não estafilocócica.

Tais resultados demonstram que o Teste do CMT apresenta uma boa correlação com a detecção da mastite subclínica estafilocócica, uma vez que apresentou baixa taxa de falso-positivos e falso-negativos, acompanhado de uma alta correlação tanto com o isolamento quanto com o valor de CCS. Desta forma, podemos considerar que este teste dentre as inúmeras vantagens, como o fato de ser de fácil execução e leitura, e apresentar baixo custo, constitui uma importante ferramenta de triagem na avaliação da saúde da glândula mamária.

5.2 Caracterização dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Após a incubação das 321 amostras (de leite, *swabs* dos profissionais e dos cães e gatos) em meio seletivo AMVF, um total de 248 isolados de *Staphylococcus* spp. foram obtidos. Os isolados foram submetidos aos testes fenotípicos de identificação, como mostra a tabela 6.

Tabela 6. Distribuição e identificação de *Staphylococcus* spp. de acordo com as estações do ano.

Estação do ano	Classificação/ Total	Testes Fenotípicos/ Total		MALDI- TOF/Total	Testes Genotípicos	
		Coag	Bac		<i>Staphylococcus</i> spp. 16S rRna	<i>S. aureus</i> coa/nuc/DNAr
Inverno	SCP (61)	+ (60)	R	<i>S. aureus</i> (58)	+	+
				Grupo SIG (1)	+	NA
				N.I* (1)	+	NA
				<i>S. aureus</i> (1)	+	+
				<i>S. haemolyticus</i> (7)	+	NA
	SCN (25)	- (22)	R	<i>S. equorum</i> (5)	+	NA
				<i>S. chromogenes</i> (4)	+	NA
				<i>S. sciuri</i> (4)	+	NA
				<i>S. saprophyticus</i> (2)	+	NA
				<i>S. haemolyticus</i> (1)	+	-
SCV (1)	+ (3)	R	<i>S. chromogenes</i> (1)	+	-	
SCV (1)	- (1)	R	<i>S. equorum</i> (1)	+	-	
SCV (1)	- (1)	R	<i>S. hyicus</i> (1)	+	NA	
Primavera	SCP (34)	+ (34)	R	<i>S. aureus</i> (33)	+	+
				N.A (1)	N.A	NA
				<i>S. chromogenes</i> (5)	+	NA
				<i>S. haemolyticus</i> (5)	+	NA
				<i>S. xylosus</i> (2)	+	NA
	SCN (19)	- (18)	R	<i>S. saprophyticus</i> (2)	+	NA
				<i>S. sciuri</i> (1)	+	NA
				<i>S. epidermidis</i> (1)	+	NA
				<i>S. capitis</i> (1)	+	NA
				N.I* (1)	+	NA
SCV (1)	+ (1)	R	<i>S. xylosus</i> (1)	+	-	
SCV (1)	- (1)	R	<i>S. hyicus</i> (1)	+	NA	
Verão	SCP (17)	+ (17)	R	<i>S. aureus</i> (16)	+	+
				N.A (1)	N.A	NA
				<i>S. saprophyticus</i> (4)	+	NA
				<i>S. haemolyticus</i> (2)	+	NA
				<i>S. epidermidis</i> (2)	+	NA
	SCN (26)	- (24)	R	<i>S. sciuri</i> (2)	+	NA
				<i>S. nepalensis</i> (2)	+	NA
				<i>S. chromogenes</i> (1)	+	NA
				<i>S. xylosus</i> (1)	+	NA
				<i>S. kloosii</i> (1)	+	NA
SCV (1)	+ (2)	R	<i>S. warneri</i> (1)	+	NA	
SCV (1)	+ (2)	R	<i>S. arlettae</i> (1)	+	NA	
SCV (1)	+ (2)	R	N.I* (4)	+	NA	
SCV (1)	+ (2)	R	N.A (1)	N.A	NA	
SCV (1)	+ (2)	R	<i>S. haemolyticus</i> (1)	+	-	
SCV (1)	+ (2)	R	<i>S. epidermidis</i> (1)	+	-	
Outono	SCP (45)	+ (41)	R	<i>S. aureus</i> (38)	+	+
				Grupo SIG (1)	+	NA
				N.A (2)	N.A	NA
				<i>S. aureus</i> (4)	+	+
				<i>S. chromogenes</i> (6)	+	NA
	SCN (19)	- (19)	R	<i>S. saprophyticus</i> (3)	+	NA
				<i>S. epidermidis</i> (2)	+	NA
				<i>S. xylosus</i> (2)	+	NA
				<i>S. haemolyticus</i> (1)	+	NA
				<i>S. sciuri</i> (1)	+	NA
SCV (1)	- (4)	R	<i>S. equorum</i> (1)	+	NA	
SCV (1)	- (4)	R	N.I* (3)	+	NA	

*SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo; SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo; SCV – *Staphylococcus* coagulase variável; Coag – prova da coagulase; Bac- prova da Bacitracina; R- resistente; + positivo; N.I- não identificado; N.A- não avaliado.

Dentre os 248 isolados obtidos, foram identificados quanto a espécie, 94,3% dos isolados (234/248). Uma ampla variedade de espécies foi identificada, sendo a espécie *S. aureus* a prevalente, 64,1% (150/234), como representante do grupo SCP, acompanhada das espécies *S. haemolyticus* com 7,3% (17/234), *S. chromogenes* com 6,8% (16/234) e *S. saprophyticus* com 4,7% (11/234), como principais representantes do grupo SCN.

S. aureus é uma das espécies mais comuns que causam mastite, e é frequentemente isolado de leite mastítico bovino, sendo uma das causas de maior gasto na produção leiteira (ARTURSSON et al., 2016; SØRENSEN et al., 2010). Estudos divergem bastante sobre as espécies de SCN mais isoladas de infecções intramamárias no gado leiteiro; *S. chromogenes* é frequentemente isolado do leite, e também têm sido encontrado no canal e na pele dos tetos mamários (PIESSENS, 2011a; THORBERG et al., 2009; TAPONEN et al., 2008); *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* também tem sido descritos como agentes causadores de mastite em bovinos (SOARES et al., 2012; (PARK et al., 2011; SOARES, 2010; THORBERG et al., 2009; SAMPIMON et al., 2009).

Quanto aos testes fenotípicos, alguns isolados identificados como SCP apresentaram resultado negativo para a prova da coagulase (1 isolado no inverno e 4 no outono). Tais resultados podem ser explicados uma vez que a expressão da coagulase está sujeita à regulação coordenada de vários loci gênicos, onde o mais estudado é o regulador *agr*. O sistema *agr* atua como regulador positivo de proteínas secretoras (α e β hemolisinas, proteases, DNAses e estafiloquinases) e pode reprimir a transcrição dos genes que codificam a proteína A, coagulase e outras proteínas associadas à parede celular (NOVICK & JIANG, 2003). Desta forma, alguns isolados de *S. aureus* podem apresentar-se negativos em teste in vitro o que poderia estar associado à uma clivagem parcial por proteases (estafiloquinases) (MARQUES, 2012). Akineden e colaboradores (2011) também identificaram isolados genotipicamente caracterizados como *S. aureus*, oriundos do leite de vacas mastíticas, que não expressavam fenotipicamente a produção da coagulase.

S. aureus coagulase- negativos foram primeiramente isolados de amostras de leite provenientes de casos de mastite bovina subclínica (LAEVENS et al. 1996; MATTHEWS et al. 1997; MALINOWSKI et al. 2009) e, apesar de já descrito na literatura, este achado é considerado raro.

Seis isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos, 2 *S. haemolyticus*, 1 *S. chromogenes*, 1 *S. equorum*, 1 *S. xylosum* e 1 *S. epidermidis* apresentaram resultado positivo na prova da coagulase e foram negativos para o PCR do gene *coa*, apresentando

resultado negativo. Santos e colaboradores (2016) relataram a habilidade de algumas cepas de *S. choromogenes*, uma espécie de SCN, produzir fibrina a partir do fibrinogênio, sendo considerados coagulase positivos. Tal achado deve ser levado em consideração nas análises, uma vez que uma avaliação superficial poderia facilmente identificar erroneamente estes isolados como *S. aureus*.

Todos os isolados foram confirmados fenotipicamente quanto ao gênero pela prova da bacitracina.

Quanto aos métodos moleculares de identificação, a técnica MALDI-TOF MS foi utilizada para a identificação das espécies após a confirmação do gênero *Staphylococcus* realizada por PCR. Isolados identificados como *Staphylococcus aureus* foram submetidos a confirmação genotípica de espécie através da análise dos genes *coa*, *nuc* e DNAr.

A técnica de MALDI-TOF MS tem sido amplamente utilizada na identificação de diferentes microrganismos, uma vez que a mesma apresenta vantajosa relação custo benefício e alta acurácia. Vantagens como quantidade mínima de amostra necessária para identificação, baixo custo, níveis insignificantes de resíduos químicos e biológicos gerados e tempo para obtenção de resultados extraordinariamente curto (CHERKAOUI et al., 2010; ALATOOM et al., 2011; CARBONNELLE et al., 2011).

Ao analisarmos a frequência e a distribuição dos isolados identificados observamos que nas quatro estações houve a prevalência de *S. aureus* com os devidos percentuais: inverno, 66,7% de *S. aureus* (58/87); primavera, 61,1% (40/54); verão, 37,2% (16/43) e outono, 59,4% (38/64). Tais achados corroboram com o descrito na literatura, que afirma que *S. aureus* é um dos agentes etiológicos mais comumente associados a infecções clínicas e subclínicas em vacas em lactação, uma vez que o reservatório deste agente é o quarto mamário infectado e cuja transmissão geralmente ocorre durante a ordenha (SAEI et al., 2012; ARTURSSON et al., 2016), pela contaminação de máquinas, equipamentos ou mãos dos ordenadores (SAKWINSKA et al. 2011).

Foram identificadas também espécies diferentes de *Staphylococcus* coagulase negativos em cada estação. O maior quantitativo de isolados bacterianos obtidos nas estações do inverno e primavera está diretamente relacionado ao maior número de animais em lactação nesse período. Apesar da significativa redução do número de animais em lactação no verão, um total de 9 animais, em decorrência de venda, morte e/ou descarte, foi possível obter 43 isolados, o que proporcionalmente representou um quantitativo elevado em relação as amostragens do inverno/primavera. Também foi identificada maior variedade de espécies de SCNs neste período, um total de 12 espécies.

Estas observações estão possivelmente relacionadas ao aumento das chuvas típicas desta estação, ao clima úmido e quente propício para a proliferação bacteriana e na maior dificuldade em controlar a higiene, aumentando o risco de infecção durante a ordenha (NÓBREGA & LANGONI, 2011), outro fator que predispõe esta alta incidência é a imunossupressão nos animais devido ao estresse térmico (OLDE-RIEKERINK & BARKEMA, 2007).

5.3. Caracterização Fenogenotípica da resistência aos beta-lactâmicos

Todos os isolados foram submetidos à difusão em disco para a pesquisa de resistência aos beta-lactâmicos (antibiograma interpretativo), contendo os discos de cefoxitina, penicilina G, oxacilina e amoxicilina + ácido clavulânico (Figura 1). Os resultados estão descritos na tabela 7.

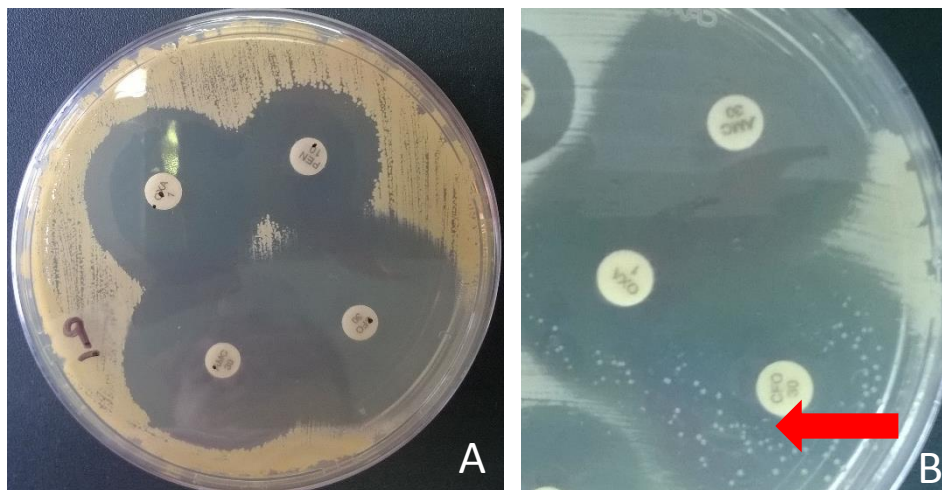


Figura 1. A: Difusão em Disco (DD); **B:** Heterorresistência: mutantes resistentes no interior do halo de inibição, como indicado pela seta vermelha.

Tabela 7. Distribuição e frequência dos resultados fenotípicos da difusão em disco dos beta-lactâmicos testados (Antibiograma interpretativo).

Estação do Ano	Classificação/ Total	Número de isolados fenotipicamente resistentes				
		PEN		AMC	OXA	CFO
		R	R/+			
Inverno	SCP (61)	3	45	0	0	0
	SCN (26)	1	11	1	3	0
Primavera	SCP (34)	3	25	1	3	0
	SCN (20)	1	13	0	4	0
Verão	SCP (17)	0	13	0	0	0
	SCN (26)	0	18	0	5	2
Outono	SCP (45)	31	10	1	3	2
	SCN (19)	9	0	2	0	2
Percentual de Resistência		19,3%	54,4%	2%	7,3%	1,6%

*SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo; SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo; PEN- Penicilina G; AMC- amoxicilina + ácido clavulânico; OXA- oxacilina; CFO, cefoxitina; R- resistente; R/+ - resistente e positivo para zona *edge*.

Considerando os padrões estabelecidos pelo CLSI (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013; CLSI, 2014), a detecção de resistência aos beta - lactâmicos deve ser realizada rotineiramente com a penicilina, para detecção da produção de beta-lactamases. Os resultados positivos para a produção desta enzima são considerados ao observarmos uma zona de halo bem definida (zona *edge*), em isolados resistentes.

No presente estudo, 54,4% (135/248) dos *Staphylococcus* spp. isolados apresentaram resistência fenotípica e também foram positivos para a zona *edge*, já 19,3% dos isolados (48/248) apresentaram apenas resistência fenotípica. Para contribuir com a leitura interpretativa do antibiograma, a amoxicilina associada ao inibidor de beta-lactamases ácido clavulânico foi incluída nos ensaios. A resistência observada foi de 2% (5/248).

Estes resultados sugerem que o mecanismo de resistência predominante seria a produção de beta-lactamases. Waller e colaboradores (2011) também afirmam que a produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência mais comum em *Staphylococcus* spp.

Em 7,3% (18/248) dos *Staphylococcus* spp. foi observada resistência a oxacilina, a interpretação desta resistência foi recentemente alterada. Estudos demonstram que a oxacilina não seria um bom marcador para predizer resistência mediada por *mecA*, sendo indicado apenas para *S. pseudintermedius* (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013). Desta forma, a resistência a este antimicrobiano indica que o isolado é resistente a classe dos beta- lactâmicos, sem indicar o possível mecanismo de resistência envolvido (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013; CLSI, 2014). No entanto, o CLSI não

descreve os parâmetros ideais para avaliar a resistência mediada por *mecA* em outras espécies de *Staphylococcus* spp. principalmente espécies raras de SCN.

A resistência a cefoxitina foi encontrada em 1,6% (6/248) dos isolados. Estudos ressaltam que este seria o antimicrobiano de eleição para predizer resistência mediada por *mecA*, onde o mecanismo de resistência envolvido é a produção da PBP2a. Os resultados do presente estudo sugerem que a prevalência de resistência mediada por *mecA*, bem como o percentual de resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite bovina é geralmente baixa, corroborando com achados prévios (MONECKE, et al., 2007; BENGTTSSON et al, 2009; BOTREL et al., 2010; SAMPIMON *et al.*, 2011; FREY *et al.*, 2013; KREWER et al., 2013).

Rossi e colaboradores (2017) avaliaram fenogenotipicamente a resistência mediada por *mecA* em isolados de *Staphylococcus* spp., incluindo cepas de *S. lentus*, *S. nepalensis* e *S. pettenkoferi*. Nesta análise foram utilizados discos de cefoxitina e oxacilina para avaliar a resistência mediada por *mecA*, dos 75 isolados testados 71 foram resistentes a oxacilina e apenas 2 foram resistentes a cefoxitina. Desta forma, o antimicrobiano oxacilina demonstrou maior correlação com a presença do gene *mecA* do que a cefoxitina. Tais resultados devem ser levados em consideração, uma vez que os parâmetros descritos pelo CLSI não abrangem todas as espécies do gênero *Staphylococcus*.

Ao analisarmos a distribuição e frequência dos resultados fenotípicos da difusão em disco simples dos beta-lactâmicos testados nas diferentes estações do ano, e considerando a resistência a penicilina (que foi a prevalente) observamos que os percentuais para esta resistência não variaram muito entre as estações, apresentando valores de 69% (60/87) no inverno, 77,8% (42/54) na primavera, 72,1% (31/43) no verão e 78,1% (50/64) no outono. Essa prevalência se justifica uma vez que o uso de pentabiótico injetável era amplamente utilizado no tratamento da mastite bovina nesta propriedade. Estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa durante os 15 anos de experiência na área, vem demonstrando níveis cada vez mais elevados de resistência nos rebanhos leiteiros, principalmente à classe dos beta-lactâmicos. (SOARES 2008; SOARES 2010, MENDONÇA 2012, ALENCAR 2014, MOTTA 2014; ROJAS 2014).

Após a realização do teste de difusão em disco, todos os isolados foram submetidos a PCR para detecção dos genes *mec* (*mecA*, *mecA* variante e *mecC*) além de uma PCR para a detecção simultânea do gene *mecA* e sua variante, utilizando o *primer* Universal desenvolvido neste estudo (Figura 2).

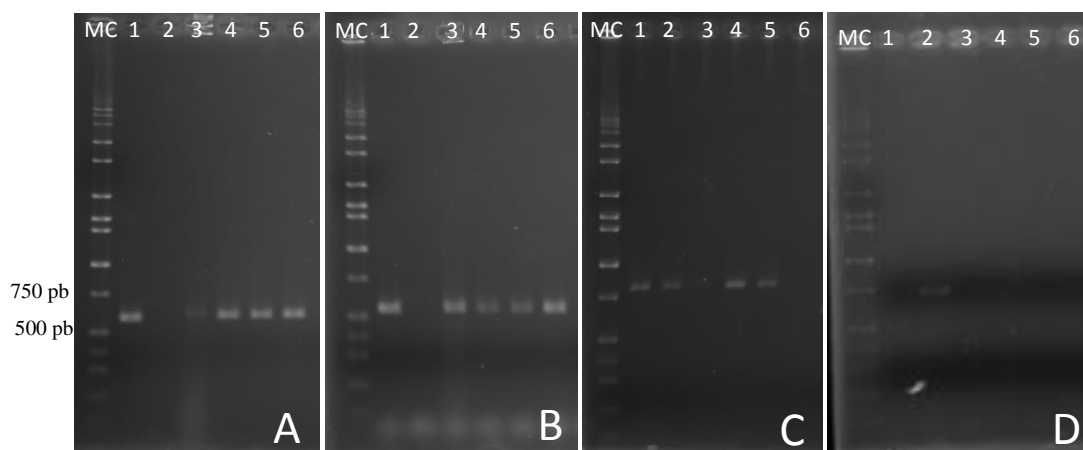


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *mec*. **A:** Universal (574 pb), 1- Controle positivo, 2- Branco, 3-6 cepas positivas; **B:** Murakami (533pb) 1- Controle positivo, 2- Branco, 3-6 cepas positivas; **C:** Variante (809pb), 1- Controle positivo, 2-5 cepas positivas, 6- Branco; e **D:** *mecC* (718pb), 1- Branco, 2- Controle positivo, 3-5 cepas negativas. MC: marcador de tamanho molecular (Hi-Lo Dna marker- 10000pb).

Os isolados positivos para o gene *mec* foram então submetidos a outros testes fenotípicos de resistência, uma vez que muitos isolados meticilina resistentes apresentam resultados heterogêneos de resistência à classe de beta-lactâmicos. Isso ocorre, pois, algumas vezes uma única célula produz culturas bacterianas em que a maioria das células apresenta um baixo ou moderado nível de resistência antimicrobiana, dando origem a cepas suscetíveis (KIM et al., 2012).

Desta forma, foram realizados os ensaios de ágar *screen* (Figura 3) com oxacilina para complementar a avaliação das cepas oxacilina resistentes e também microdiluição em caldo com cefoxitina (Figura 4) para a pesquisa de cepas com resistência mediada por *mecA*, como preconizado pelo CLSI (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013; CLSI, 2014).

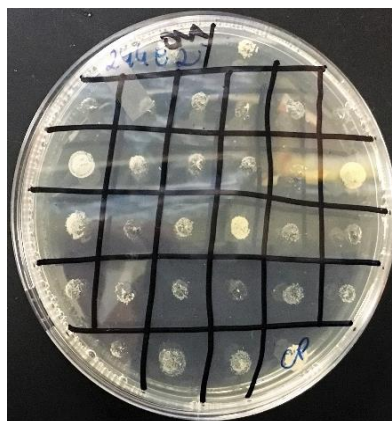


Figura 3. Ágar *screen* oxacilina 6µg/mL. Podemos observar a presença de isolados positivos pelo crescimento bacteriano.

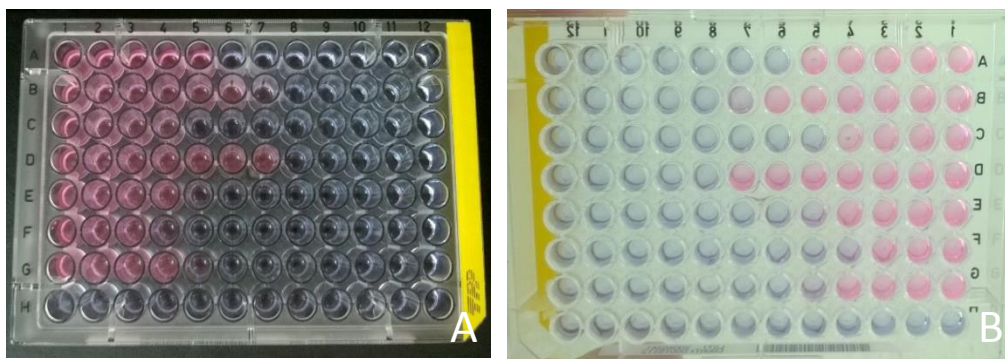


Figura 4. Microdiluição em caldo com cefoxitina. A viabilidade metabólica dos isolados foi avaliada com o uso do reativo resazurina. Em rosa, bactérias viáveis e em roxo, não viáveis.

Os isolados positivos nas reações anteriores foram submetidos a uma nova PCR para a detecção dos genes reguladores do gene *mecA*, desenvolvidos neste estudo, e para a pesquisa do gene *blaZ*. O teste fenotípico do Nitrocefim (Figura 5) também foi realizado nos isolados positivos, com o objetivo de complementar os resultados fenotípicos de resistência aos beta-lactâmicos e permitir uma melhor correlação dos resultados fenogenotípicos de resistência. Os resultados obtidos estão disponíveis na tabela 8.

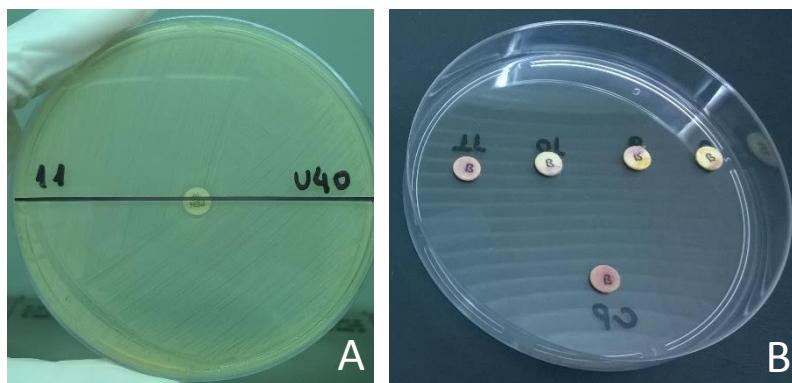


Figura 5. Teste do Nitrocefim. **A:** Isolado submetido ao crescimento em meio contendo disco de Penicilina G e posteriormente sendo submetido a Reação no disco de Nitrocefim (**B**).

Tabela 8. Padrão fenogenotípico de resistência aos beta-lactâmicos dos isolados de *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes, nas diferentes estações do ano.

Estação do Ano	MALDI- TOF MS	Teste Fenotípicos de Resistência						Análise Genotípica			
		DD CFO	DD OXA	DD PEN	Ágar <i>screen</i> OXA	MC CFO	Nitrocefim	Univ	Gene <i>mec</i>	Reg. <i>mec</i>	<i>blaZ</i>
Inverno	<i>S. sciuri</i>	S	R	S	S	R	-	+	-	-	-
Primavera	<i>S. sciuri</i>	S	R	S	S	S	+	+	-	-	+
Verão	<i>S. haemolyticus</i>	R	S	R/+	S	R	+	+	<i>mecA</i>	<i>mecRI</i> / Tipo V	+
	<i>S. saprophyticus</i>	R	S	R	S	S	+	+	<i>mecA</i>	<i>mecRI</i> / Tipo V	+
Outono	<i>S. epidermidis</i>	S	S	R	S	R	+	+	<i>mecA</i>	<i>mecRI</i> / Tipo V	+
	<i>S. sciuri</i>	S	S	R	S	S	+	+	Variante <i>mecA</i>	-	-
	<i>S. sciuri</i>	S	S	S	S	R	-	-	Variante <i>mecA</i>	-	-

*DD – difusão em disco; CFO-cefoxitina; PEN- penicilina; OXA- oxacilina; A.S OXA- Ágar *screen* com oxacilina; MC CFO- microdiluição em caldo com cefoxitina; Univ- *primer* Universal; Reg. *mec*- genes reguladores do sistema *mec*; R- resistente; R/+ - resitente e positivo para o teste da zona *edge*; S- sensível; + positivo e – negativo.

Dentre os 248 *Staphylococcus* spp. Identificados, apenas em 7 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos foi possível observar a amplificação do gene *mec*, sendo o mesmo detectado em 4 isolados de *S. sciuri* e em 1 *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*. Desse modo, como discutido anteriormente, e de acordo com os resultados do antibiograma interpretativo, o mecanismo de resistência predominante seria a produção de beta-lactamases.

Considerando os resultados obtidos na DD de penicilina, o teste do Nitrocefim e a detecção do gene *blaZ* para a pesquisa de produção de beta-lactamases, observamos que destes sete isolados: i) dois isolados apresentaram 100% de correlação fenogenotípica, sendo sensíveis para a DDS de penicilina e negativos para o teste do nitrocefim e detecção do gene *blaZ*; ii) em um isolado sensível a penicilina, mas positivo para o teste do nitrocefim foi possível a amplificação do gene *blaZ*; iii) em quatro isolados resistentes fenotipicamente para ambos os testes, foi possível a detecção do gene *blaZ* em 75% (3/4) dos isolados, porém dentre estes isolados, apenas um resistente a penicilina foi também positivo para o teste da zona *edge*, indicativo de produção de beta-lactmase; iv) e um isolado apresentou perfil de resistência fenotípica com ausência do gene *blaZ*.

De acordo com os resultados obtidos, o teste de nitrocefim se mostrou mais fidedigno quanto à presença do gene *blaZ*. Já no isolado fenotipicamente resistente, porém negativo para a presença do gene *blaZ*, foi possível detectar a presença do gene *mecA* variante, justificando então a resistência fenotípica observada.

Como preconizado pelo CLSI, os testes fenotípicos que indicam resistência mediada por *mecA* consideram os resultados do antimicrobiano cefoxitina. Desta forma, podemos observar que os isolados *mecA* positivos apresentaram resistência em pelo menos um dos testes (DD de cefoxitina e/ou MC com cefoxitina). Já nos dois isolados positivos para o gene *mecA* variante, um isolado apresentou resistência ao teste MC com cefoxitina, como preconizado pelo CLSI, e o outro apresentou perfil fenotípico totalmente sensível. Em um estudo anterior, realizado pelo nosso grupo, também foi observada a presença do gene e ausência de resistência fenotípica (MELO et al., 2014).

Um isolado identificado como *S. sciuri*, do inverno, apresentou resistência aos testes DD de oxacilina e MC com cefoxitina. Este isolado ao ser submetido a PCR apresentou produto sugestivo a amplificação do gene *mecC*. Visando confirmar a detecção do gene *mecC*, o produto de PCR foi purificado e enviado para o sequenciamento. A sequência foi então analisada e comparada com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI. O resultado obtido, no entanto, não demonstrou similaridade com as sequências do gene *mecC* disponíveis, sendo possível identificar a sequência apenas como um precursor de uma proteína codificante. Até o presente momento não foi descrita a presença deste homólogo em cepas de *Staphylococcus* spp. nas Américas.

Paterson e colaboradores (2014) demonstraram que o gene *mecC* também confere resistência a metilina, e assim como preconizado pelo CLSI para o gene *mecA*, o antimicrobiano cefoxitina apresenta maior capacidade discriminatória do que a oxacilina, nos testes de difusão em disco, e microdiluição em ágar e caldo. Este homólogo tem sido descrito em vários países da Europa, em diferentes espécies animais e em humanos (SHOV et al., 2014), porém até o presente momento não foi descrito nas Américas.

Harrison e colaboradores (2014) descreveram pela primeira vez a presença do gene *mecC* na espécie *S. sciuri*, comprovando que assim como o *mecA*, ele é amplamente disseminado nas diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. Este trabalho relata ainda, que este isolado também carrega um novo híbrido do SCC*mec*, classificado como SCC*mec* tipo VII, que codifica o gene *mecA* e o *mecC* em uma região separada, demonstrando a variabilidade genética nesta espécie, o que poderia justificar a presença de isolados *mecC* positivos com uma composição gênica diferenciada. Até o momento o gene *mecC* tem sido descrito apenas no continente europeu, sugerindo uma dependência regional para a detecção do mesmo.

5.4 Desenho de primers

5.4.1 Primer Universal para amplificação do gene *mecA*

Foi desenhado um par de primers considerando as particularidades existentes na composição nucleotídica do gene *mecA* e *mecA* variante de isolados de *Staphylococcus* spp. (KF058904, KF058903, KF058901, KF058902, KF058900, KF058905, KF058906, KF058907) de diferentes origens depositadas no GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), alinhadas usando ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) com no programa MEGA versão 8.0 program (Tamura *et al.*, 2007). O alinhamento resultante foi utilizado para desenhar os primers usando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen and Skaletsky 2000) (Figura 6, Quadro 3).

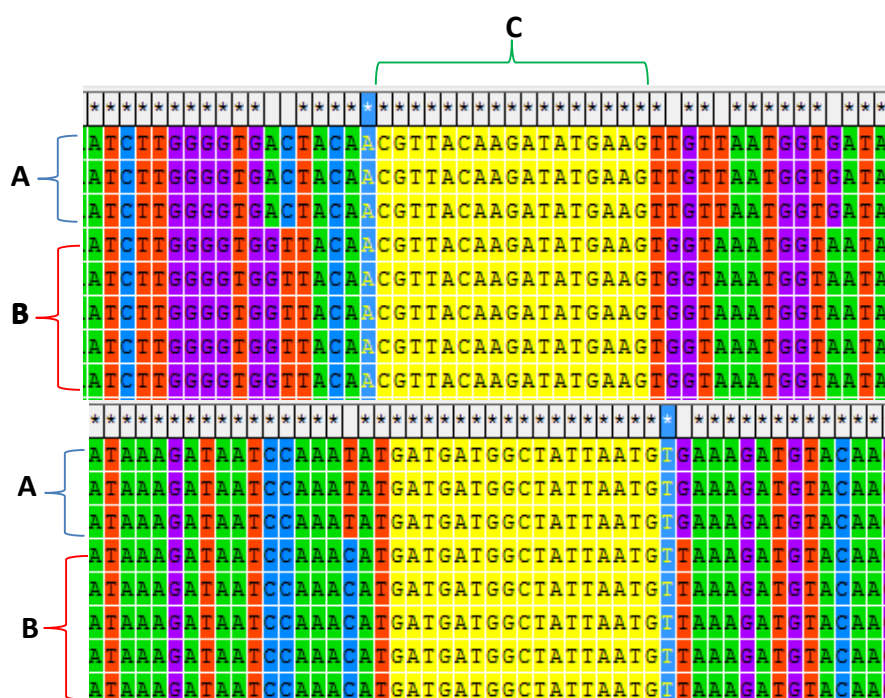


Figura 6. Esquema ilustrando as diferenças nucleotídicas do gene *mecA* e a região de anelamento do primer Universal; **A:** sequências nucleotídicas do gene *mecA* clássico (HE681097.1, FR753166.1 e AB425824.1); **B:** sequências nucleotídicas do gene *mecA* variante (KF058904, KF058903, KF058901, KF058902 e KF058900); **C:** região de alinhamento do primer Universal.

Quadro 3. Primers desenhados e ciclo empregado para a amplificação do gene *mecA*.

Denominação do primer/	Gene	Sequência do primer (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Ciclo*
Universal F Universal R	<i>MecA</i>	ACG TTA CAA GAT ATG AAG GAA ACA TTA ATA GCC ATC ATC	574 pb	1

*1. 5 min at 94°C, 30 x (1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72 °C), and 10 min at 72 °C.

A análise do desempenho do *primer* Universal nos isolados testados, demonstrou que o mesmo foi capaz de amplificar todos os genes *mec* (*mecA*, *mecA* variante e *mecC*). No entanto, em um isolado não foi possível a identificação do gene *mec*, porém foi observada resistência fenotípica a oxacilina, e em outro isolado foi possível apenas a detecção do gene *mecA* variante. Tais resultados podem estar relacionados a possíveis mutações na região de anelamento deste *primer*, ou o mesmo pode estar se ligando de forma inespecífica no genoma bacteriano, apesar de o produto gerado apresentar tamanho de fragmento correto.

Para uma melhor análise do poder de detecção do *primer* Universal desenvolvido neste estudo, um projeto visando a validação do mesmo, considerando diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. de vários hospedeiros, animais e humanos, foi realizado, como parte do Doutorado Sanduíche pela FAPERJ, no período de Julho a Dezembro de 2016, na Iowa State University - EUA.

Para estas análises foram utilizados isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes espécies animais e fontes previamente identificados e estocados, pertencentes a coleção de isolados do Laboratório de Patogênese Bacteriana, situado no Departamento de Microbiologia Veterinária e Medicina Preventiva na Iowa State University.

Um total de 315 isolados, identificados primariamente como meticilina resistentes, de diferentes origens, tais como animais de produção (porcos, ovelhas e bovinos), carne processada (presunto, peito de peru, carne suína e de frango), animais de companhia (cavalos e gatos), além de isolados humanos oriundos de pacientes hospitalares e *swabs* nasais de profissionais da saúde foram analisados.

Os isolados foram submetidos a PCR para a confirmação da presença dos genes *mec* (*mecA* clássico, *mecA* variante e *mecC*), e posteriormente submetidos a uma nova PCR utilizando o *primer* universal (Tabela 9).

Tabela 9. Padrão de amplificação do gene *mec* e do *primer* Universal.

Origem	Espécie /n° de isolados	Detecção do gene <i>mec</i>			
		<i>mec</i> Universal	<i>mecA</i> clássico	<i>mecA</i> variante	<i>mecC</i>
Bovino (Nasal)	<i>S. aureus</i> (1)	+	-	+	-
Bezerro (Nasal)	<i>S. xylosus</i> (1)	-	-	+	-
Carne Bovina	<i>S. xylosus</i> (1)	-	-	+	-
	<i>S. aureus</i> (2)	+	-	+	-
	<i>S. epidermidis</i> (1)	+	+	-	-
	<i>S. haemolyticus</i> (1)	+	+	-	-
Peito de Peru (Frios)	<i>Staphylococcus spp.</i> (1)	+	+	-	-
	<i>S. epidermidis</i> (2)	+	+	-	-
	<i>S. haemolyticus</i> (1)	+	+	-	-
Porco (Nasal)	<i>S. aureus</i> (2)	+	+	+	-
	<i>S. xylosus</i> (1)	+	+	+	-
	<i>S. aureus</i> (80)	+	+	-	-
	<i>S. epidermidis</i> (12)	+	+	-	-
	<i>S. saprophyticus</i> (1)	+	+	-	-
	<i>S. warnerii</i> (1)	+	+	-	-
Carne de Porco	<i>S. intermedius</i> (1)	+	+	-	-
	<i>S. aureus</i> (5)	+	+	-	-
	<i>Staphylococcus spp.</i> (2)	+	+	-	-
Cavalo (nasal)	<i>S. epidermidis</i> (1)	+	+	-	-
Presunto	<i>S. epidermidis</i> (2)	+	+	-	-
Cordeiro (nasal)	<i>S. xylosus</i> (1)	+	+	-	-
Humanos	<i>S. aureus</i> (99)	+	+	-	-
Total: 215 isolados					

Dentre os 315 isolados testados, foi observada amplificação para os genes *mec* em 215 isolados. Cinco isolados amplificaram apenas para o gene *mecA* variante sendo todos de origem bovina, no entanto apenas em três isolados de *S. aureus* foi possível observar a correlação positiva com o *primer* Universal, dois isolados de *S. xylosus* positivos para o gene *mecA* variante foram negativos para a reação utilizando o *primer* Universal.

Três isolados de origem suína amplificaram tanto para o gene *mecA* clássico quanto para o gene *mecA* variante (2 *S. aureus*, 1 *S. xylosus*), além de amplificarem com o *primer* universal. Foi a primeira vez que o gene *mecA* variante foi encontrado em isolados de origem suína, uma vez que os mesmos só haviam sido detectados em isolados de origem bovina no Brasil. Tais resultados corroboram com os nossos achados do Brasil, e fortalecem a importância de se pesquisar este tipo de gene *mec* nos isolados de origem animal para uma real predição da resistência mediada por *mecA*.

A presença de cepas de *Staphylococcus* carreadores simultâneos de diferentes genes *mec* também foi descrita por Harrison e colaboradores (2014), que relataram a presença de isolados *S. sciuri* que carream simultaneamente o gene *mecA* e o *mecC*, estudos mais avançados são necessários para uma melhor compreensão da regulação e ação destes genes na expressão da resistência mediada por *mec* nestes isolados.

O gene *mecA* clássico foi detectado em 97,7% dos isolados (210/215), e o *primer* Universal apresentou 100% de correlação com a detecção do gene *mecA* clássico. Estes resultados reforçam a hipótese de que uma correlação negativa entre a detecção do gene *mecA* variante e o *primer* Universal pode estar associada a espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos, uma vez que essas espécies apresentam uma ampla diversidade genética, podendo apresentar mutações na região de anelamento do *primer* Universal o que impossibilitaria sua detecção.

Não foram detectados isolados positivos para o gene *mecC*, nos 315 isolados examinados, apenas o controle positivo amplificou. Estes resultados mostram que a colonização e presença de *Staphylococcus* meticilina resistentes em diferentes hospedeiros e fontes é um problema comum, porém grave, e o controle é um desafio contínuo tanto para a saúde humana quanto para a animal.

Todos os 215 isolados de *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos foram submetidos aos testes fenotípicos para a detecção de resistência mediada por *mecA*: difusão em disco de oxacilina e cefoxitina, ágar “*screen*” de oxacilina e determinação da concentração inibitória mínima com cefoxitina.

Quanto a difusão em disco os isolados apresentaram o seguinte perfil de resistência: 100% dos isolados (215/215) foram resistentes a oxacilina, 96,7% (208/215) resistentes a cefoxitina. A técnica de ágar *screen* de oxacilina apresentou 68,4% (147/215) de resistência e a microdiluição em caldo com cefoxitina para a determinação da concentração inibitória mínima apresentou 83,2% (179/215) de resistência.

Os resultados fenotípicos de resistência obtidos no presente estudo corroboram com os achados na literatura, a qual relata que muitos isolados meticilina resistentes apresentam resultados heterogêneos de resistência à classe de beta-lactâmicos, isso ocorre pois algumas vezes uma única célula produz culturas bacterianas em que a maioria das células apresenta um baixo ou moderado nível de resistência antimicrobiana, podendo produzir até cepas suscetíveis (KIM et al., 2012).

Mediante as diferentes combinações fenotípicas e buscando uma maior correlação fenogenotípica, o presente trabalho sugere utilizar os diferentes marcadores fenotípicos

para uma maior acurácia nos resultados de resistência mediada por *mecA*, além de considerar os diferentes marcadores genotípicos, para uma real detecção deste tipo de resistência.

5.4.2. Primers para a amplificação dos reguladores do gene *mecA*

Foram elaborados *primers* com base nas sequências dos principais tipos de cassete cromossômico *mec* (Tipo I, II, III, IV e V), disponíveis no banco de dados do NCBI (Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), através da utilização do Programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Figura 7, Quadro 4).

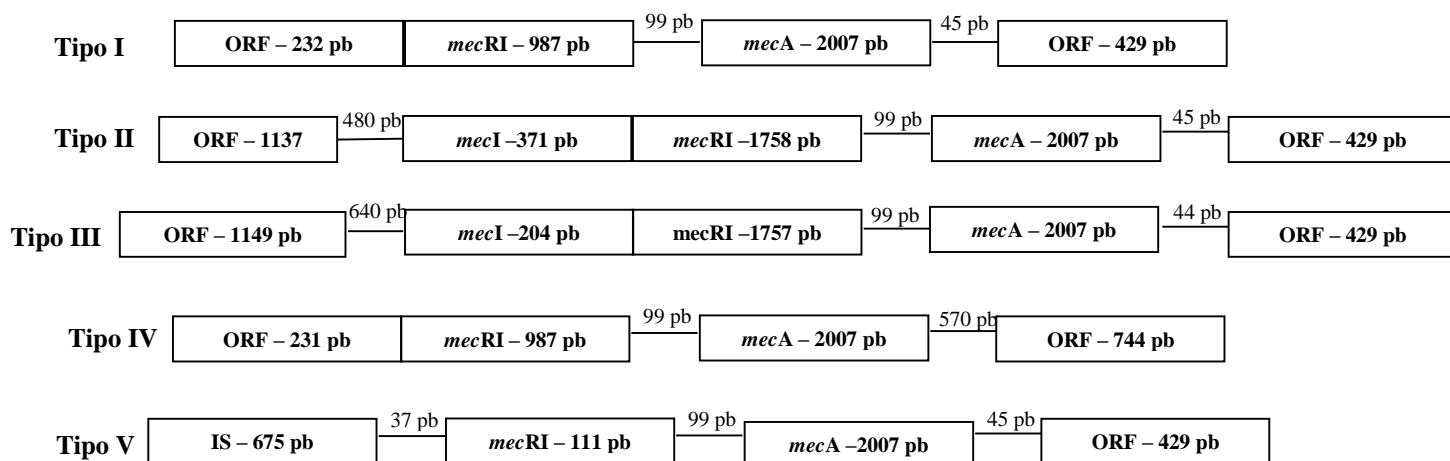


Figura 7. Esquema ilustrando a conformação dos cassetes cromossômicos *mec* do Tipo I ao V, utilizados para o desenho dos *primers*.

Quadro 4. *Primers* desenhados e ciclos empregados para a amplificação dos reguladores do gene *mecA*.

Denominação do primer/	Gene regulador/Tipo de Cassete	<i>Primers</i> (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Ciclo*
mecIF mecIR	<i>mecI</i> / Tipo I e II	GAC TTG CAT TCA GGC TTT CG GAA GCA AAT GGA TGG TTC GT	627 pb	1
mecRIantesF2 mecRIantesR2	<i>mecRI</i> /Tipo II e III	GTT GTG CTT TTT CGC CAT TC CAA GCA CCG TTA CTA TCT GCA C	733 pb	1
mecRIintF2 mecRIintR2	<i>mecRI</i> /Tipo II e III	TAA GCT TGC TCC CGT TCA TT TCA AAC ATT GAT AAT CCG ATG G	623 pb	1
mecRIposF2 mecRIposR2	<i>mecRI</i> /Tipo II e III	GGT TTC GAC TAC GAC AGT TGG ACC AAA CCC GAC AAC TAC AA	732 pb	2
mecRIantesF4 mecRIantesR4	<i>mecRI</i> /Tipo I e IV	TTT ATC GCC CAA AGC TTC TT AAG GCA TTC CGA CAA ATT GA	640 pb	2
mecRIposF4 mecRIposR4	<i>mecRI</i> /Tipo I e IV	GGT TTC GAC TAC GAC AGT TGG ACC AAA CCC GAC AAC TAC AA	732 pb	2
mecRIVF mecRIVR	<i>mecRI</i> /Tipo V	TTG GGG CAT ATT CTT GAA CC TCG GAC GTT CAG TCA TTT CT	771 pb	2

*1. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min; 2. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min.

Entendendo que a presença do gene *mec* (*mecA*, *mecA* variante e *mecC*) e resultados fenotípicos de resistência estão diretamente relacionados ao controle da expressão do gene *mecA* pelo seu sistema regulatório, novos *primers* foram desenhados no presente estudo considerando a composição gênica dos genes *mecRI* e *mecI*, que compõem os cassetes cromossômicos *mec* (tipo I, II, III, IV e V).

Quanto a presença dos genes do sistema regulatório *mec* (*mecRI* e *mecI*) com os *primers* desenvolvidos no presente estudo, três isolados amplificaram com o *primer* referente ao gene *mecRI* que compõe o SCC*mec* tipo V. Visando a correta identificação do gene regulador detectado, os produtos de PCR foram purificados e enviados para o sequenciamento. Após edição das sequências, as mesmas foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados do NCBI. Após a análise foi possível a confirmação, os três isolados, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*, *mecA* positivos, apresentaram o SCC*mec* tipo V. Este resultado corrobora com achados de Khaji e colaboradores (2016), que detectaram SCC*mec* tipo V em 60% (24/40) dos isolados de *Staphylococcus* metilina resistentes oriundos de leite bovino. Estes resultados sugerem que o gene *mecA* nestes isolados foi adquirido na comunidade (LENCASTRE et al. 2007), outros estudos também relatam a presença do SCC*mec* tipo V em seus isolados metilina resistentes (NEMEGHAIRE et al. 2014; HARAN et al., 2011).

No entanto, não foi possível a detecção dos genes do sistema regulatório *mec* nos demais isolados. Devido à recorrente dificuldade de detectar os genes reguladores do sistema *mec* nos isolados *mecA* variante positivos, uma nova tentativa foi realizada com o objetivo de entender melhor como funciona esta regulação nestes isolados.

5.4.3 Primers para a amplificação dos genes adjacentes ao *mecA* variante

Além dos *primers* baseados na composição dos cassetes, outros *primers* também foram desenhados. Estes foram desenhados especificamente para a detecção dos genes adjacentes ao gene *mecA* variante descrito por Melo e colaboradores (2014), uma vez que informações sobre o sistema regulatório do gene *mecA* variante ainda não foram elucidadas (Quadro 5).

Quadro 5. *Primers* desenhados e ciclo empregado para a amplificação dos genes adjacentes ao *mecA* variante.

Denominação do primer/	<i>Primers</i> (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Ciclo*
mecA-A mecA-A1	ATG AAA AAA TTA ATC ATA GCC AT GTC ATT TCC ACT TCG CCA TT	185 pb	1
mecA-A mecA-A2	ATG AAA AAA TTA ATC ATA GCC AT TTT GTC TTC AAT GGC ATC TAG TGT	117 pb	1
mecA-B mecA-B1	TGT TTT CTT ACC GTT ATC ATA TAA AT CAG GCA CAG CTG AAC TCA AG	197 pb	1
mecA-B mecA-B2	TGT TTTC TTA CCG TTA TCA TAT AAA T TGG CAA GTT ACA ATG CCA AA	68 pb	1

*1. 94 °C 5 min (94 °C 30 seg, 50 °C 30seg, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min.

Os *primers* nomeados em A (*mecA*-A, A1 e A2) se ligam a região *upstream* do gene enquanto o B (*mecA*-B, B1 e B2) se liga à região *downstream*.

Os *primers* foram testados e todos amplificaram. Após este teste, foi realizada então uma nova PCR utilizando o *primer* *mecA*- A1 com o *primer* arbitrário (ARB 5), e outra utilizando o *primer* *mecA*-B1 com o mesmo arbitrário, como proposto por Li e colaboradores (2005).

Posteriormente foi realizado uma reação de Nested-PCR com os produtos de amplificação descritos anteriormente como “template”. Para a reação de Nested-PCR foi utilizado os *primers* *mecA*- A2 com o *primer* arbitrário (ARB 2), com o produto de PCR referente a reação *mecA*-A1 e ARB 5, e uma outra reação com o *primer* *mecB*-B2 com o

primer arbitrário ARB 2, utilizando como amostra o produto de PCR referente a PCR utilizando os primers *mecA*-B2 com o ARB 5 (Li et al., 2005).

Quadro 6. *Primers* arbitrários utilizados na identificação dos genes adjacentes ao gene *mecA* variante.

Denominação do primer/	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Referência	Ciclo*
ARB 2	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	(Li et al., 2005)	1
ARB 5	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(N)10 TAC NG	(Li et al., 2005)	1

*1. 95 °C 8 min (95 °C 45 seg, 55 °C 45 seg, 72 °C 1 min e 30 seg) x 35(+5 seg por ciclo) e 72 °C 10 min.

Após a corrida dos produtos da reação do NESTED- PCR, foi observada amplificação apenas na reação onde foram utilizados os *primers* *mecB*-B2 e ARB 2 (Figura 8).

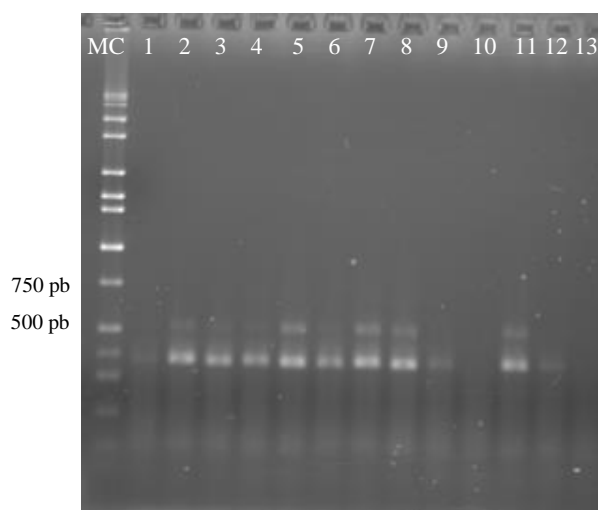


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do NESTED-PCR. MC: marcador de tamanho molecular (Hi-Lo Dna marker- 10000pb); 1-12, cepas *mecA* variante positivas; 13- Branco.

Os produtos foram purificados e enviados para o sequenciamento. A análise da sequência obtida permitiu apenas a confirmação do gene *mecA*, devido o tamanho da sequência obtida e pela porção do gene amplificada. O mecanismo de regulação do gene *mecA* variante continua desconhecido, sendo necessárias novas abordagens para uma melhor compreensão deste sistema.

5.5 Tipagem Molecular dos isolados de *Staphylococcus* metilina resistentes pela técnica de *Pulsed-field Gel electrophoresis* (PFGE)

Os isolados *mecA* positivos do presente estudo foram submetidos a técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE). No entanto, não foi possível realizar a digestão enzimática do material genético em dois isolados de *S. sciuri* identificados no outono. Visando uma análise mais robusta os isolados de *S. sciuri* do presente estudo foram comparados com outros *S. sciuri* oriundo de propriedades leiteiras a região Sul-Fluminense do estado do Rio de Janeiro e de uma situada no estado do Rio grande do Sul (Figura 9; Tabela 10).

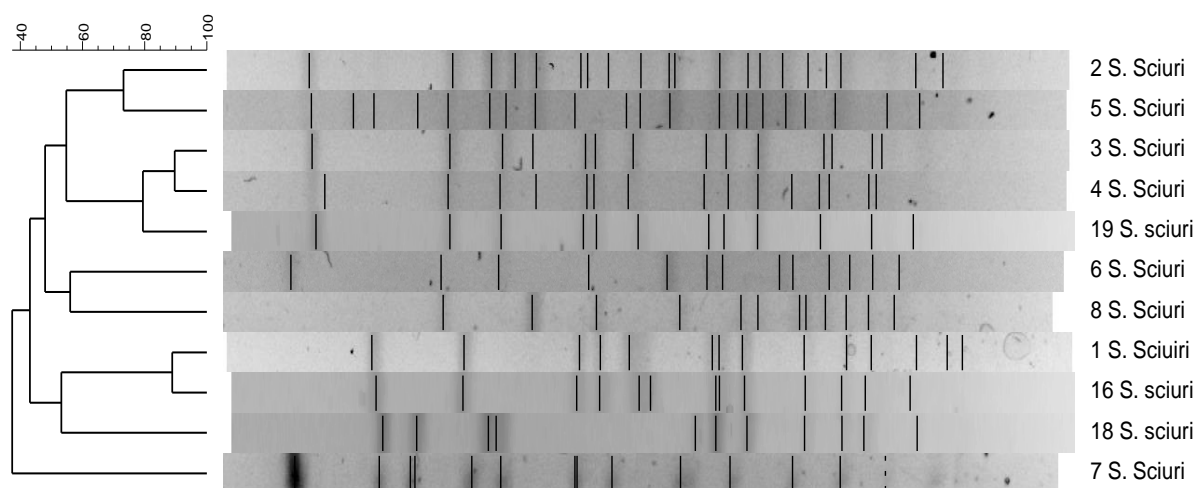


Figura 9. Dendrograma de similaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus sciuri* utilizando a técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) através do método de agrupamento Dice, Bionumerics.

Tabela 10. Características dos isolados de *S. sciuri* submetidos a técnica de PFGE.

Identificação	Origem	Região/Fazenda/ Ano de coleta	Fenótipo				Genótipo	
			DD OXA	DD CFO	A.S OXA	MC CFO	Univ	Gene <i>mec</i>
2	Mão (ordenhador)	Sul- Fluminense- RJ Fazenda B-2012	S	R	S	S	+	-
3	Leite	Sul- Fluminense- RJ Fazenda D-2012	S	S	S	S	-	<i>mecA</i> variante
4	Leite	Sul- Fluminense- RJ Fazenda C-2012	S	S	S	S	-	<i>mecA</i> variante
5	Leite	Presente estudo (Inverno – 2013)	R	S	S	R	+	-
19	Leite	Rio Grande do Sul Fazenda E-2014	R	S	S	R	-	<i>mecA</i> variante
6	Leite	Presente estudo (Primavera – 2013)	R	S	S	S	+	<i>mecA</i> variante
8	Leite	Sul- Fluminense- RJ Fazenda F-2014	S	S	S	R	+	<i>mecA</i> clássico
1	Leite	Sul- Fluminense- RJ Fazenda A-2012	S	S	S	S	+	<i>mecA</i> variante
16	Leite	Sul- Fluminense- RJ Fazenda A-2012	S	S	S	R	+	<i>mecA</i> variante
18	Mão (ordenhador)	Sul- Fluminense- RJ Fazenda D-2012	S	S	S	R	+	<i>mecA</i> variante
7	Leite	Sul- Fluminense- RJ Fazenda C-2012	S	S	S	S	-	<i>mecA</i> variante

*DD – difusão em disco; CFO-cefoxitina; OXA- oxacilina; A.S OXA- Ágar *screen* com oxacilina; MC CFO- microdiluição em caldo com cefoxitina; Univ- *primer* Universal; R- resistente; S- sensível; + positivo e – negativo.

Através da técnica de PFGE foi possível observar grande heterogeneidade genética nos 11 isolados selecionados. Foi possível observar a presença de dois isolados (3 e 4) intimamente relacionados, diferindo em apenas um fragmento. Apesar de pertencerem a propriedades distintas ambos foram obtidos no mesmo ano, e apresentaram perfil fenogenotípico semelhante. A dispersão deste clone pode estar relacionada a proximidade das propriedades analisadas, permitindo o compartilhamento de tratadores, veterinários, além de fatores ambientais. Já as demais cepas não apresentaram indicativo de relação clonal.

Estudos anteriores realizados por nosso laboratório em diferentes propriedades da região Sul-Fluminense do Estado de Rio de Janeiro, ao avaliar *Staphylococcus* coagulase negativos, apresentaram resultados similares, elevada heterogeneidade genética e ausência de cepas clonais (ALENCAR, 2013).

Nemeghaire e colaboradores (2014) ao caracterizar cepas de *S. sciuri* metilina resistentes oriundos de porcos, vacas e frangos de corte de diferentes propriedades através

da técnica de PFGE, também observaram uma elevada diversidade de perfis e formação de distintos grupamentos.

Calazans-Silva e colaboradores (2013), ao comparar sequências do gene *mec* (*mecA* clássico e variante) de diferentes hospedeiros animais e humanos, e de distintas espécies de *Staphylococcus*, observou divergência genômica entre as sequências do gene *mecA* nas diferentes origens, com formação de dois grupos distintos, um composto por sequências do gene *mecA* oriundo de cães, gatos, equinos, roedores e homem e outro formado apenas por isolados de origem bovina, o que poderia justificar a diversidade, bem como a peculiaridade dos isolados de origem bovina.

Alterações na composição do gene *mecA* em *Staphylococcus* metilina resistentes oriundos do ambiente de produção (LA-MRS, “livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus*”) pode estar relacionado a pressão seletiva no ambiente de produção leiteira, além das condições encontradas no próprio hospedeiro bovino, resultando numa maior diversidade.

Estudos filogenéticos recentes revelaram que algumas linhagens de *S. aureus* isoladas de animais derivam de linhagens humanas e que nesta mudança de hospedeiros, estes microrganismos sofreram adaptações genéticas, perdendo fatores de virulência desnecessários no novo hospedeiro além de adquirirem características necessárias a colonização desse novo ambiente (PANTOSTI et al., 2012).

Estas particularidades podem justificar a heterogeneidade genética, e consequentemente a baixa correlação clonal das cepas estudadas, uma vez que o conceito de clone como indivíduos genotipicamente indistinguíveis não se aplica a bactérias, devido as elevadas taxas de mutação e recombinação, assim como o ganho ou a perda de elementos genéticos móveis que podem tornar (dependendo da espécie), o genoma bacteriano altamente variável.

6. CONCLUSÃO

- O teste do CMT é um importante teste de triagem para seleção de animais suspeitos e correlacionado a valores superiores a 250.000 na CCS apresenta um elevado poder de detecção de mastite subclínica estafilocócica;
- *Staphylococcus aureus* é a espécie prevalente na propriedade estudada;
- Os elevados percentuais de resistência fenotípica ao antimicrobiano penicilina, indicam a produção de beta-lactamases como mecanismo de resistência predominante;
- Para prever a resistência mediada por *mecA* deve-se considerar os resultados fenotípicos tanto do antimicrobiano oxacilina quanto de cefoxitina para uma melhor correlação fenogenotípica;
- O gene *mecA* variante não é exclusivo de amostras bovinas, uma vez que foi detectado em isolados oriundos de suínos nas análises desenvolvidas na Iowa State University;
- Novas abordagens se fazem necessárias para a detecção dos genes do sistema regulatório *mec* e caracterização de *SCCmec* dos isolados *mecA* variantes, uma vez que só foi possível identificar os mesmos nos isolados *mecA* clássicos positivos;
- A seleção positiva exercida pelo ambiente de produção leiteira, associado aos processos de adaptação ao hospedeiro bovino, podem estar relacionados a elevada heterogeneidade genética e conseqüente baixa correlação clonal, observada nas cepas de *S. sciuri mec* positivas submetidas a técnica de PFGE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEDO, S.; TOMASZ, A. **The role of stringent stress response – in the antibiotic resistant phenotype of MRSA.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 60, n. 4, pp. 2311-2317, 2016.

AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. **A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk.** Journal of Dairy Research, v. 78, n. 1, pp. 38–42, 2011.

ALATOOM, A.A.; CUNNINGHAM, S.A.; IHDE, S.M.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. **Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of grampositive cocci by use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry.** Journal of Clinical Microbiology, v. 49, n. 8, pp. 2868–2873, 2011.

ALENCAR, T. A.; MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, D. A.; ROJAS, A. C. M.; MOTTA, C. C.; SANTIAGO, G. S. ; DUBENCZUK, F. C.; MEDEIROS, P. T. C.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. **Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do estado do Rio de Janeiro, Brasil e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v. 36, n. 2, pp.199-208, 2014.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs.** Nucleic Acids Research, v. 25, n. 17, pp. 3389-3402, 1997.

ANTUNES, A. L. S.; SECCHI, C.; REITER, K. C.; PEREZ, L. R. R.; FREITAS, A. L. P.; AZEVEDO, P. A. **Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n. 6, pp. 719-723, 2007.

ARTURSSON, K.; SÖDERLUND, R.; LIU, L.; MONECKE, S.; SCHELIN, J. **Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics.** *Veterinary Microbiology*, v. 193, n. 1, pp. 156-161, 2016.

BEAUDEAU, F.; FOURICHON, C.; SEEGER H. & BAREILLE N. **Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts.** *Preventive Veterinary Medicine*, v. 53, n. 1, pp. 43-54, 2002.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. **Coagulase-Negative Staphylococci.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 4, pp. 870–926, 2014.

BENGTSSON, B.; UNNERSTAD, H. E.; ERICSSON, H.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; PERSSON WALLER, K. **Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows.** *Veterinary Microbiology*, v. 136, n. 1-2, pp. 142–149, 2009.

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 Pathogens and Disease*, v. 7, n. 5, pp. 479-487, 2010.

BRADLEY, A.J. **Bovine mastitis: an evolving disease.** *Veterinary Journal*, v. 164, n. 2, pp.116-128, 2002.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. **Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Juiz de Fora. v. 51, n. 2, pp.129-135, 2000.

BROEKMAN, N. M.; VAN, T. T.; MONSON, T. A.; MARSHALL, S. A.; WARSHAUER, D. M. **Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Clinical microbiology*. v. 47, n. 1, pp. 217–219, 2009.

CALAZANS- SILVA, A. C.; MEDEIROS, P. T. C.; MELO, D. A.; CARVALHO, O. S.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. **Genetic analysis of *mecA* gene and detection of homologue *pbpD* in *Staphylococcus sciuri* group.** Brazilian Journal Microbiology, v. 45, n. 2, pp 651–655, 2014.

CASANOVA, C.; ISELIN, L.; VON STEIGER, N.; DROZ, S.; SENDI, P. ***Staphylococcus hyicus* bacteremia in a farmer.** Journal of Clinical Microbiology, v. 49, n. 12, pp. 4377–4378, 2011.

CASPERMEYER, J. **MEGA Evolutionary Software re- Engineered to handle Today's Big Data Demands.** Molecular Biology and Evolution, v. 33, n. 7, pp. 1887, 2016.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. **MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory.** Clinical Biochemistry, v. 44, n. 1, pp. 104–109, 2011.

CARFORA, V.; GIACINTI, G.; SAGRAFOLI, D.; MARRI, N.; GIANGOLINI, G.; ALBA, P.; FELTRIN, F.; SORBARA, L.; AMORUSO, R.; CAPRIOLI, A.; AMATISTE, S.; BATTISTI, A. **Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 6, pp. 1–8, 2016.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S. **Comparison of two matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation.** Journal of Clinical Microbiology, v. 48, n. 4, pp. 1169–1175, 2010.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E. E.; SAVASAN, S. **Detection of methicillin resistance and *slime* factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, n. 2, pp. 254-261, 2009.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard — Fourth Edition.** CLSI document VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

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

COELHO, S. M. O., **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.

CUIROLO, A.; CANIDIA, L. F.; GARDELLA, N.; FERNÁNDEZ, S.; GUTKIND, G., ROSATO, A.; MOLLERACH, M. **Oxacillin- and cefoxitin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 37, n. 2, pp. 178-179, 2011.

DECRISTOPHORIS, P.; FASOLA, A.; BENAGLI, C., TONOLLA, M.; PETRINI, O. **Identification of *Staphylococcus intermedius* group by MALDI-TOF MS.** Systematic and Applied Microbiology, v. 34, n. 1, pp. 45–51, 2011.

DEURENBERG, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A. W.; BRUGGEMAN, C. A.; STOBBERINGH, E. E. **The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Clinical Microbiology and Infection, v. 13, n. 3, pp. 222–235, 2007.

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J. P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P. O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J. **Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.** Journal of Clinical Microbiology, v. 48, n. 3, pp. 941–945, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite**, <http://www.cnp.gl.embrapa.br/>. Acessado em: 4 de Janeiro de 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite**, http://www.cnp.gl.embrapa.br/totem/conteudo/Qualidade_de_leite_e_mastite/Outras_publicacoes/Celulas_somaticas_no_leite.pdf. Acessado em: 08 de março de 2017.

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

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo. Lemos Editorial. 175p, 2000.

FREY, Y., RODRIGUEZ, J.P., THOMANN, A., SCHWENDENER, S., PERRETEN, V. **Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk**. Journal of Dairy Science, v. 96, n. 4, pp. 2247-2257, 2013.

GARCIA-ALVAREZ, L.; HOLDEN, M.T.; LINDSAY, H.; WEBB, C.R.; BROWN, D.F.; CURRAN, M.D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D.J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S.D.; EDWARDS, G.F.; GIRVAN, E.K.; KEARNS, A.M.; PICHON, B.; HILL, R.L.; LARSEN, A.R.; SKOV, R.L.; PEACOCK, S.J.; MASKELL, D.J.; HOLMES, M.A. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study**. Lancet Infection Diseases, v.11, n. 8, pp. 595–603, 2011.

GIANOLA, D., HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., CHANG, Y. M. **Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle**. Livestock Production Science, v. 88, n. 3, pp. 251-261, 2004.

GIEBEL, R.; WORDEN, C.; RUST, S.M.; KLEINHEINZ, G.T.; ROBBINS, M.; SANDRIN, T.R. **Microbial Fingerprinting using MALDI-TOF MS: Applications and Challenges**. *Advances in Applied Microbiology*, v. 71, n. 1, pp. 149-84, 2010.

HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, n. 1, pp. 95-98, 1999.

HAUSCHILD, T., STEPANOVIC, S. **Identification of *Staphylococcus* spp. by PCRrestriction fragment length polymorphism analysis of *dna J* gene**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 12, pp. 3875–3879, 2008.

HARAN, K. P.; GODDEN, S. M.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J. B.; SREEVATSANA S. **Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 3, pp. 688–695, 2011.

HARTMAN, B. J., AND TOMASZ, A. **Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus***. *Journal of Bacteriology*, v. 158, n. 2, pp. 513–516, 1984.

HARRISON, E. M.; PATERSON, G. K.; HOLDEN, M. T. G.; BA, X.; ROLO, J.; MORGAN, FIONA J. E.; PICHON, B.; KEARNS, ANGELA; ZADOKS, RUTH N.; PEACOCK, SHARON J.; PARKHILL, J.; HOLMES M. A. **A novel hybrid SCC*mec*-*mecC* region in *Staphylococcus sciuri***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 4, pp. 911–918, 2014.

HEILMANN, C. & PETERS, G. **Biology and pathogenicity of *S. epidermidis***. In: Fischetti VA; Novick RP; Ferreti JJ; Portnoy DA; Rood JI *Gram-positive pathogens*. Washington, D.C.: ASM Press, pp. 442-449, 2000.

HIGGINS ET, RONEY C, CROWE E, HYMES C. **Ideal versus ought predilections for approach and avoidance: Distinct self-regulatory systems.** Journal of Personality and Social Psychology, v. 66, n. 2, pp. 276-86, 1994.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; MATSUO, M.; SASAKI, T.; MORIMOTO, Y.; SEKIGUCHI, A.; BABA, T. **Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy.** Journal of Infection Chemoterapy, v. 20, n. 10, pp. 593-601, 2014.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. **Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene.** Journal of Clinical Microbiology, v. 36, n. 4, p. 1083–1089, 1998.

HOSSEINZADEH, S.; SAEI, H. D . **Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci.** International Journal of Veterinary Science and Medicine, v. 2, n. 1, pp. 27–34, 2014.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA / **Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário.** SIDRA. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br. Acesso: Dezembro 2016.

International Working Group on the *Staphylococcal Cassette Chromosome* elements. Disponível em www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN. Acesso: Fevereiro de 2012.

ITO T; KATAYAMA Y.; ASDA K.; MORI N.; TSUTSUMIMOTO K.; TIENSASITORN C.; HIRAMATSU K. **Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 12, pp.1323-1336, 2001.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. **Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from bovine clinical mastitis.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 4, pp. 2226- 2230, 2014.

JANSEN, M.D.; BOX, A.T.A.; FLUIT, A.C. **SCCmec Typing in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of Animal Origin.** Emerging Infectious Diseases, v. 15, n. 1, pp.136, 2009.

KHAJI, L.; HOSSEIN, M.; SHAHREZA, S. **SCCmec Types in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of Various Types of Milk.** Electronic Journal of Biology, v.13, n. 1, pp. 14-17, 2016.

KIM, C.; MILHEIRIÇO, C.; GARDETE, S.; HOLMES, M. A.; HOLDEN, M. T. G.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. **Properties of a Novel PBP2A Protein Homolog from *Staphylococcus aureus* Strain LGA251 and Its Contribution to the beta-Lactam-resistant Phenotype.** Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 44, pp. 36854-63, 2012.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**, 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.

KREWER, C. C.; LACERDA, I. P. de; AMANSO, E. S.; CAVALCANTE, N. B.; PEIXOTO, R. de; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; COSTA, M. M. da; MOTA; R. A. **Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 33, n. 5, pp. 601-606, 2013.

LAEVENS, H.; DEVRIESE, L. A.; DELUYKER, H.; HOMMEZ, J. DE KRUIF, A. **An atypical *Staphylococcus aureus* intramammary infection in a dairy herd.** Veterinary Microbiology, v. 52, n. 3-4, pp. 271–275, 1996.

LENCASTRE, H., OLIVEIRA, D. C. **Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, n. 7, pp. 2155–2161, 2002.

LI, G.; LATURNUS, C.; EWERS, C.; WIELER, L. H. **Identification of Genes Required for Avian *Escherichia coli* Septicemia by Signature-Tagged Mutagenesis.** Infection and Immunity, v. 73, n. 5, pp. 2818–2827, 2005.

MALINOWSKI, E.; LASSA, H.; KLOSSOWSKA, A.; SMULSKI, S.; KACZMAROWSKI, M. **Atypical *Staphylococcus aureus* as an etiological agent of mastitis in cows.** Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. v. 53, n. 1, pp. 383–387, 2009.

MARQUES, V. F. **Caracterização fenogenotípica dos fatores de virulência em *Staphylococcus spp.* isolados de mastite bovina.** 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2012.

MATTHEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S. P. **Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction.** Journal of Food Protection, v. 60, n. 6, pp. 686–688, 1997.

MELO, D. A.; COELHO, I. S.; MOTTA, C. C.; ROJAS, A. C. C. M.; DUBENCZUK, F. C.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. **Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus spp.*** Brazilian Journal of Microbiology, v. 45, n. 3, pp. 1075-1082, 2014.

MENDONCA, E. C. L. **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.** 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2012.

MENDONCA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, A. D.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O. C.; SOUZA, M. M. S. **Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus spp.* isolados de mastite bovina.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 31, n. 9, pp. 859-864, 2012.

MONCKE, S.; KUHNERT, P.; HOTZEL, H.; SLICKERS, P.; EHRLICH, R. **Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants**

of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 125, n. 1-2, pp. 128–140, 2007.

MOTTA, C. C. **Análise genotípica e proteômica na identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados do leite e sua cadeia produtiva e caracterização da resistência a beta-lactâmicos.** 2014. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. **Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 10, pp. 2240-2244, 1991.

NEMEGHAIRE, S.; ARGUDIN, M.A.; FESSLER, A.T.; HAUSCHILD, T.; SCHWARZ, S.; BUTAYE, P. **The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes.** *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 34, pp. 342-356, 2014a.

NEMEGHAIRE, S.; ARGUDIN, M.A.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* in healthy chickens.** *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3-4, pp. 357-363, 2014b.

NOBREGA D.B. & LANGONI H. **Breed and season influence on milk quality parameters and in mastitis occurrence.** *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 31, n. 12, pp. 1045-1052, 2011.

NOVICK, R.P.; JIANG, D. **The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing.** *Microbiology*, v. 149, n. 1, pp. 2709-2717, 2003.

OLDE RIEKERINK R.G.M.; BARKEMA, H.W.; STRYHN, H. **The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis.** *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 4, pp. 1704-1715, 2007.

PATERSON, G. K.; MORGAN, F. J. E.; HARRISON, E. M.; CARTWRIGHT, E. J. P.; TO`RO`K, M. E.; ZADOKS, R. N.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; HOLMES, M. A. **Prevalence and characterization of human *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, n. 4, pp. 907–910, 2014.

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M.. **Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*.** Future Microbiology, v. 2, n. 3, pp. 323–334, 2007.

PANTOSTI, A. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health.** Frontiers in Microbiology, v. 3, n. 127, pp. 1-12 2012.

PARK, J.Y.; FOX, L.K.; SEO, K.S.; MCGUIRE, M.A.; PARK, Y.H.; RURANGIRWA, F.R.; SISCHO, W.M.; BOHACH, G.A. **Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections.** Veterinary Microbiology, v. 147, n. 1-2, pp. 142-148, 2011.

PERSSON WALLER K., COLDITZ I.G., LUN S.; OSTENSSON K. **Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis.** Research Veterinary Science, v. 74, n. 1, pp. 31-36, 2003.

PIESSENS, V. Epidemiology and characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from dairy farms. 213p. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)** – Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium, 2011.

PINHO, M. G., DE LENCASTRE, H., AND TOMASZ, A. **An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci.** Proceedings of the National Academy Science, U.S.A. v. 98, n. 19, pp. 10886–10891, 2001.

ROJAS, Anna Carolina Coelho Marin. ***Staphylococcus* spp. coagulase-negativos em unidades leiteiras: identificação fenotípica e proteômica e análise da resistência antimicrobiana.** 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de

Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2014.

ROSATO, A.E; KREISWIRTH, B.N; GRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; AECHER, G.L. ***mecA-BlaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.47, n. 4, pp. 1463-1466, 2003.

ROSSI, C. C.; DIAS, I. S.; MUNIZ, I. M.; LILENBAUM, W.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **The oral microbiota of domestic cats harbors a wide variety of *Staphylococcus* species with zoonotic potential.** Veterinary Microbiology, v. 201, n. 1, pp. 136–140, 2017.

SAEI, H.D. ***coa* types and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis.** Comparative Clinical Pathology, v. 21, n. 1, pp. 301-307, 2012.

SALGADO, B.A.B. **Identificação Molecular e Caracterização da Resistência a Mupirocina de Cepas de *Staphylococcus* spp. de Origem Canina.** 2013. 110p. Dissertacao (Mestrado em Ciencias Biologicas). Instituto de Microbiologia Paulo Goes, Departamento de Microbiologia Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 2013.

SANTOS, D. C.; LANGE, C. C.; COSTA, P. A. C. R.; SANTOS, K. R. N.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M. ***Staphylococcus chromogenes*: a coagulase-negative *Staphylococcus* that can clot plasma.** Journal of Clinical Microbiology, v. 54, n. 5, pp. 1372-5, 2016.

SASAKI, T. TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. **Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci.** Journal of Clinical Microbiology, v. 48, n. 3, pp. 765–769, 2010.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; LEGER, D.; DUFOUR, S.; SHELDON, A. G.; SCHOLL, D. T.; BARKEMA, H. W. **Antimicrobial use on Canadian dairy farms.** Journal of Dairy Science, v. 95, n. 3, pp. 1209–1221, 2012a.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; SCHOLL, D. T.; DEVRIES, T. J.; BARKEMA, H. W. **Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms.** Journal of Dairy Science, v. 95, n. 4, pp. 1921–1929, 2012b.

SAKAI, H. **Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets.** Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n. 12, pp. 5739-5744, 2004.

SAKWINSK, O.; MORISSET, D.; MADEC J, Y.; WALDVOGEL, A.; MOREILLON, P.; HAENNI, M. **Link between Genotype and Antimicrobial Resistance in Bovine Mastitis-Related *Staphylococcus aureus* Strains, Determined by Comparing Swiss and French Isolates from the Rhône Valley.** Applied and Environmental Microbiology, v. 77, n. 10, pp. 3428–3432, 2011.

SAMPIMON, O.C.; LAM, T.J.; MEVIUS, D.J.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS. R.N. **Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples.** Veterinary Microbiology, v. 150, n. 1-2, pp. 173–179, 2011.

SCALETTI, E. R.; LUCKNER, S. R.; KRAUSE, K. S. **Structural features and kinetic characterization of alanine racemase from *Staphylococcus aureus* (Mu50).** Acta Crystallographica Section D (Biological Crystallography), v. 68, n. 1, pp. 82–92, 2011.

SKOV R, LARSEN AR, KEARNS A.; HOLMES, M.; EDWARDS, C.T.G; HILL, R. **Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin.** Journal of Antimicrobial and Chemotherapy, v. 69, n. 1, pp. 133–5, 2014.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. M. O.; CUNHA, C. M. M.; OLIVEIRA, D. F. B.; MIRANDA, A. F.; SOUZA, M. M. S. **Caracterização fenotípica da**

resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciência Rural*, v. 38, n. 5, pp. 1346-1350, 2008.

SOARES, L.C. **Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina.** 2010. 82p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2010.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; PRIBUL, B.R.; OLIVA, M. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. **Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 8, pp. 692-696, 2012.

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, M.; FAILING, K. **The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control program.** *Veterinary Microbiology*, v. 96, n. 1, pp. 91-102, 2003.

STEPHAN, R.; HASSLER, C.; NITZSCHE, S.; IVERSON, C.; SWEIFEL, C. **Characteristics of *Staphylococcus hyicus* strains isolated from pig carcasses in two different slaughterhouses.** *Meat Science*, v. 80, n. 2, pp. 505–510, 2008.

STEEGER, M.; ANDERSEN, P. S.; KEARNS, A.; PICHON, B.; HOLMES, M. A.; EDWARDS, G.; LAURENT, F.; TEALE, C.; SHOV, R.; LARSEN A. R. **Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 4, pp. 395-400, 2012.

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.** *Journal of Food Protection*, v. 62, n. 10, pp.1150-1156, 1999.

SVILAND, S. & WAAGE, S. **Clinical bovine mastitis in Norway.** Preventive Veterinary Medicine, v. 54, n. 1, pp. 65-78. 2002.

TAPONEN, S.; SUPRE, K.; PIESENS, V.; VAN COILLIE, E.; DE VliegHER, S., KOORT, J. ***Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 62, n. 1, pp. 61-65, 2012.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. **Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing.** Journal of Clinical Microbiology, v. 33, n. 9, pp. 2233–2239, 1995.

THORBERG, B.M., DANIELSSON-THAM, M.L., EMANUELSON, U., WALLER, K.P. **Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase negative staphylococci.** Journal of Dairy Science, v. 92, n. 10, pp. 4962-4970, 2009.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. **Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci.** Lancet of Infectious Disease, v.2, n. 11, pp.677-685, 2004.

WALLER, K.P.; ASPAN, A.; NYMAN, A.; PERSSON, Y.; ANDERSSON, U.G. **CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis.** Veterinary Microbiology, v. 152, n. 1-2, pp. 112–116, 2011.

WEESE, J. S. **Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* in animals.** Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal, v. 51, n. 3, pp. 233-244, 2010.

WU, M. T.; BURNHAM, C. A. D.; WESTBLADE, L. F.; BARD, J. D.; LAWHON, S. D.; WALLACA, M. A.; STANLEY, T.; BURD, E.; HINDLER, J.; HUMPHRLES, R. M. **Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk and MIC Breakpoints for Prediction of Methicillin Resistance in Human and Veterinary Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group.** Journal of Clinical Microbiology, v. 54, n. 3, pp. 535-542, 2016.

YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; UCHIDA, E.; HARUNA, A.; IGIMI, S. **Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates.** Journal of Veterinary Medical Science, v. 67, n. 3, pp. 263-268, 2005.

YE, X.; Wang, X.; Fan, Y.; Peng, Y.; Li, L.; Li, S.; Huang, J.; Yao, Z.; Chen, Sidong. **Genotypic and phenotypic markers of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC9 in humans.** Applied and Environmental Microbiology, v. 82, n. 13, pp. 3892-3899, 2016.

YOON, J.W.; LEE, K.J.; LEE, S.Y.; HAE, M.J.; PARK, J.K.; YOO, J.H.; PARK, H.M. **Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea.** Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 20, n. 12, pp. 1764-8, 2010.

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, n. 11, pp. 4947–4955, 2004.