

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

TESE

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O
MONITORAMENTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
***Staphylococcus aureus* EM AMBIENTES DE PRODUÇÃO**
LEITEIRA

Bianca da Silva Soares

2017



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

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O
MONITORAMENTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Staphylococcus aureus EM AMBIENTES DE PRODUÇÃO
LEITEIRA**

Bianca da Silva Soares

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

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

Seropédica, RJ
Fevereiro 2017

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

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

S676a Soares, Bianca da Silva, 1989-
Aplicação de técnicas moleculares para o monitoramento da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* em ambientes de produção leiteira. / Bianca da Silva Soares. - 2017.
67 f.

Orientador: Miliane Moreira Soares Souza.
Coorientador: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias , 2017.

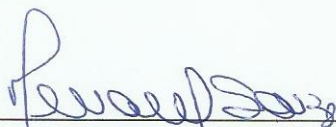
1. Mastite bovina. 2. Perfil de virulência. 3. Tipagem molecular . 4. Suscetibilidade a antimicrobianos. I. Souza, Miliane Moreira Soares , 1970-, orient. II. Coelho, Shana de Mattos de Oliveira, 1980-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias . IV. Título.

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

BIANCA DA SILVA SOARES

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

Tese defendida em 17/02/2017



Miliane Moreira Soares de Souza. DSc. UFRRJ
(Orientador)



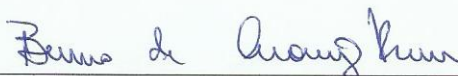
Irene da Silva Coelho. DSc. UFRRJ



Ciro César Rossi. UFRJ



Márcia Giambiagi. DSc. UFRJ



Bruno de Araújo Penna. DSc. UFF

“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas e os resultados somente através das experiências.”
Carl Jung

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado tantas bênçãos na minha vida.

Aos meus pais, Djalma e Joana, e ao meu irmão, Hugo Leonardo, por sempre me apoiar e incentivar em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Miliane Moreira Soares de Souza, pela oportunidade de ser orientada por um exemplo de mulher guerreira, que compartilha todos os seus conhecimentos científicos e também de vida.

À minha co-orientadora Shana de Mattos de Oliveira Coelho, por me inspirar como uma professora fantástica e me fazer ficar encantada por microbiologia. Também gostaria de agradecer por todos os conselhos e por toda atenção dada durante toda minha trajetória na UFRRJ.

À professora Irene da Silva Coelho, por ser tão acessível e atenciosa, a quem também devo agradecer por todos os ensinamentos em Biologia Molecular.

Às amigas, que essa jornada me deu, Tatiani Abreu, Dayanne Melo, Cássia Couto e Marisol Alvim, por todos os bons momentos e por toda cumplicidade! Espero que continuamos a mesma amizade apesar do fim da pós-graduação.

À todos os pós graduandos do LABACVET, que eu tive a oportunidade de conhecer e conviver diariamente durante esta trajetória (Greiciane Bronzato, Gabrielli Santiago, Ramon Pimenta, Viviane Marques, Bruno Carvalho, Anna Rojas e Naiara Miranda).

À todos os estagiários do LABACVET, por todo auxílio e apoio.

À professora Catherine Logue, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe durante 4 meses do doutorado sanduíche no seu laboratório na Iowa State University (ISU), muito obrigada por compartilhar todos os conhecimentos e por ser praticamente uma mãe durante a minha estadia.

Às amigas que eu fiz na ISU, Nicolle Barbieri e Esra Buyukcangaz por todo apoio, companheirismo e por me fazerem me sentir tão bem recebida em um país tão longe de casa.

Às amigas que construí em diversos lugares durante a pós-graduação, Letícia Vidal, Camila Pantoja, Maristela Peckle, muito obrigada por todos os momentos!!!

Ao Curso de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ, e aos funcionários, pelo apoio em materiais e pelas condições que recebemos para trabalhar e estudar.

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

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela disponibilização do auxílio para realização do presente estudo.

BIOGRAFIA

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

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

No ano de 2007, ingressou no Curso de Ciências Biológicas-Bacharelado, na Universidade Severino Sombra em Vassouras-RJ, diplomando-se em janeiro de 2011. Foi aluna de iniciação científica do Laboratório de Insetos Vetores da Universidade Severino Sombra durante o período de fevereiro de 2008 a dezembro de 2010, sob orientação da Prof.^a Marise Maleck de Oliveira Cabral, período em que foi bolsista do programa interno PIBIC/USS.

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

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob orientação da Prof.^a Dr.^a Miliane Moreira Soares de Souza, em 2012, e iniciou o curso em março de 2013. No período de Janeiro a Maio de 2015 realizou doutorado sanduiche na Iowa State University sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Catherine Mary Logue. Durante o 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia (2015) ganhou o prêmio de melhor resumo na área de Microbiologia Veterinária. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de setembro de 2013 a fevereiro de 2017.

RESUMO

SOARES, Bianca da Silva. **Aplicação de técnicas moleculares para o monitoramento da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* em ambientes de produção leiteira.** 53p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A produção leiteira bovina no Brasil está em constante crescimento sendo predominante abastecida através da produção familiar. A mastite bovina é frequente nos rebanhos leiteiros ocasionando grandes perdas econômicas para a indústria leiteira. A mastite é ocasionada pela inflamação do tecido mamário por agentes físicos, químicos ou por patógenos. *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno causador de mastite bovina subclínica crônica. O sucesso da persistência deste patógeno no hospedeiro ocorre devido a uma série de fatores de colonização e virulência que esta bactéria possui. Esta espécie bacteriana possui heterogeneidade genética e uma população caracterizada por cepas geneticamente diversificadas. A análise da variação genética é uma importante ferramenta para fins de estudos epidemiológicos. Para a realização da presente tese, foram estudadas 53 cepas de *S.aureus* oriundas do leite de vacas com mastite subclínica de seis fazendas em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. As 53 cepas de *S. aureus* foram submetidas a detecção dos perfis de virulência, tipagem do gene *agr* e do *spa*. Das 53 cepas de *S. aureus*, 17 cepas foram selecionadas através dos perfis de virulência (previamente estabelecidos) para serem submetidas às técnicas de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), Tipagem da Sequência Multilocus (MLST), avaliação fenotípica da produção de biofilme, suscetibilidade a antimicrobianos e a detecção genotípica de resistência a meticilina. Foi possível detectar 58,5% (31/53) de isolados positivos para o gene *icaA*; 83% (44/53) para o gene *icaD*; 66% (35/53) para o gene *fbnA*; 26,4% (14/53) positivos para o gene *fbnB*; 3,7% (2/53) para o gene *cap8*; 92,4% (49/53) para o gene *hla* e 84,9% (45/53) para o gene *hlyB*. Nenhum isolado foi positivo para o gene *cap5*. A partir destes resultados foi possível estabelecer 18 diferentes perfis. Através da técnica de PFGE foi possível observar grande heterogeneidade genética e ausência de cepas clonais. A análise fenotípica da produção de biofilme, demonstrou a prevalência de cepas com baixa expressão fenotípica. A maioria dos isolados (67,9% - 36/53) foi classificada como grupo II do sistema *agr*. A tipagem do gene *spa* evidenciou 12 diferentes tipos nos 53 isolados testados, sendo prevalente o *spa* tipo 605 (54,7% - 29/53). A técnica de tipagem MLST gerou cinco tipos diferentes de ST/CC, sendo prevalente o ST/CC 126 (64,7% - 11/17). As cepas testadas foram resistentes aos antibióticos ciprofloxacina, eritromicina e penicilina. Não foi possível detectar a presença de nenhuma cepa MRSA no presente estudo.

Palavras-chave: Mastite bovina, Perfil de virulência, Tipagem molecular e Suscetibilidade a antimicrobianos.

ABSTRACT

SOARES, Bianca da Silva. **Application of molecular techniques to monitor the genetic diversity of *Staphylococcus aureus* in dairy production environments.** 53p. Thesis (PhD in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Brazilian dairy production is constantly growing and is predominantly supplied through family production. Bovine mastitis is common in dairy herds, causing high economic losses for the dairy industry. Mastitis is caused by inflammation of the mammary tissue by physical, chemical or pathogens. Mastitis is caused by inflammation of the mammary tissue by physical, chemical or pathogens. *Staphylococcus aureus* acts as an important pathogen causing subclinical bovine mastitis. Success of this pathogen persistence in the host occurs due to a series of factors of colonization and virulence that this bacterium has. This bacterial species carries genetic heterogeneity and a population characterized by genetically diverse strains. The analysis of the genetic variation appear as an important tool for epidemiological studies. For the realization of this thesis, were selected 53 *S. aureus* strains originated from cows with subclinical mastitis six farms in different cities of the State of Rio de Janeiro. The 53 strains of *S. aureus* were submitted to detection of the virulence profiles, agr and spa gene typing. From the 53 strains of *S. aureus*, 17 strains were selected through the virulence profiles (previously established) to be submitted to Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST), phenotypic production of Biofilm, antimicrobial susceptibility, and genotypic detection of methicillin resistance. It was possible to detected 58.5% (31/53) positive isolates for *icaA* gene; 83% (44/53) for *icaD* gene; 66% (35/53) for *fbnA* gene; 26.4% (14/53) positive for *fbnB* gene; 3.7% (2/53) for *cap8* gene; 92.4% (49/53) for the *hla* gene and 84.9% (45/53) for *hlyB* gene. No isolate showed positive for the gene *cap5*. These results enabled to establish 18 different profiles. Phenotypic analysis of biofilm production, demonstrated a prevalence of strains with a low phenotypic expression. Most isolates (67.9% - 36/53) classified as Group II of *agr* system. Typing of *spa* gene showed 12 different types in 53 isolates tested, been prevalent the *spa* type 605 (54.7% - 29/53). These isolates underwent PFGE with analysis of the profiles generated was observed extensive genetic heterogeneity of the selected isolates and no clones. The typing technique MLST generated five different types of ST/CC, been ST/CC 126 the most prevalent (64.7% - 11/17). The strains tested were resistant to ciprofloxacin, erythromycin and penicillin. It was not possible to detect the presence of any MRSA strain in this study.

KEY WORD: Bovine Mastitis, Virulence Profile, Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ABHI= ágar infuso cérebro e coração
BHI = Infuso Cérebro Coração
CC=Complexo clonal
CCS= Contagem de células somáticas
CMT = *California Mastitis Test*
CV= *core variable*
DNA = Ácido desoxiribonucléico
dNTP= Desorribonucleotídeo trifosfatado
EMG= elementos genéticos móveis
FBN= Proteínas ligantes a fibronectina
H₂O = Água
HÁ-MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associado a hospitais
hrs= horas
LA-MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associado a ambientes de produção
MB= mega base
mg= Miligrama
min= Minuto
mL = Mililitros
MLST= *Multilocus Sequence Typing*
mM = Milimolar
MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
MSCRAMM= Componentes da superfície microbianas que reconhecem moléculas de matriz adesiva
NaCl = Cloreto de sódio
ng= Nanogramas
°C = Graus Celsius
pb= Pares de base
PCR = *Polymerase Chain Reaction*
PFGE = *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
s= Segundo
SaPis= Ilha de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*
SCC_{mec}= Cassete *mec*
SDS= Dodecil sulfato de sódio
ST= Tipo de Sequência
TE= Tris EDTA
TSA= Agar Trypticase de soja
USA= *United State America*
USDA= *United States Department of Agriculture*
V= Voltagem
µg = Micrograma
µL= Microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	19
Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do produto de amplificação do gene <i>coa</i> e <i>nuc</i> para identificação do <i>Staphylococcus aureus</i> . (A) <i>coa</i> (variável pb) M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo (600pb), B: branco e 1: Isolado positivo (800pb); (B) <i>nuc</i> de <i>S. aureus</i> (279 pb) M: marcador de tamanho molecular (100bp), CP: controle positivo, B: branco e 1: Isolado positivo.	
Figura 2	25
Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos genes <i>agr (RNA III)</i> (200 pb) e <i>agr II</i> (572 pb). M: marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific), B: branco, 1: produto de amplificação do gene <i>agr (RNA III)</i> , 2: produto de amplificação do gene <i>agr II</i> .	
Figura 3	30
Dendograma de similaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando a técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) através do método de agrupamento Dice, Bionumerics.	

ÍNDICE DE GRÁFICO

		Pág.
Gráfico 1	Porcentagem de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> suscetíveis aos antimicrobianos testados pela técnica de difusão em disco.	37
Gráfico 2	Porcentagem de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> suscetíveis aos antimicrobianos testados pela técnica de CIM automatizada (Sensititre- Thermo Scientific®).	37

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> .	11
Quadro 2. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação de genes para tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação de genes de resistência a meticilina de <i>Staphylococcus aureus</i>	17

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Origens, perfis de amplificação de genes de virulência das 53 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.	21
Tabela 2. Perfil de virulência formado através da detecção dos genes de virulência das 53 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.	23
Tabela 3. Detecção da produção de biofilme fenotípica e genotípica das 17 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> selecionadas de acordo com o perfil obtido através da técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado).	24
Tabela 4. Origens e tipagem pelo <i>agr</i> das 53 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.	26
Tabela 5. Origens e tipagem através da amplificação e seqüenciamento do gene <i>spa</i> das 53 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.	28
Tabela 6. Detecção e distribuição de <i>spa</i> - tipo das 53 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.	29
Tabela 7. Origens e agrupamentos das 17 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro, gerados a partir da utilização da técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado).	31
Tabela 8. Origens e perfil alélico gerado através da técnica de MLST (Tipagem da Sequência Multilocus) das 17 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> selecionadas de acordo com o perfil obtido através da técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado).	32
Tabela 9. Origens, perfis de amplificação de genes de virulência, tipagem do <i>spa</i> , tipagem pelo <i>agr</i> , tipagem por PFGE e tipagem por MLST dos 17 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro selecionadas para análise comparativa.	36

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Panorama da produção leiteira	2
2.2. Mastite bovina causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.3. MRSA- <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina	3
2.4. Fatores de colonização e virulência	4
2.5. Diversidade genética do <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.6. Técnicas de tipagem molecular	6
2.6.1. Tipagem pelo sistema agr	7
2.6.2. PFGE (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)	7
2.6.3. Tipagem da Sequência Multilocus (<i>Multilocus Sequence Typing- MLST</i>)	8
2.6.4. Tipagem do <i>spa</i>	9
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Amostragem	11
4.2. Extração do DNA bacteriano	12
4.3. Detecção dos genes de colonização e virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
4.4. Técnicas de Tipagem	13
4.4.1. Tipagem de <i>S. aureus</i> através do sistema agr	13
4.4.2. Tipagem do <i>spa</i>	14
4.4.4. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE</i>)	14
4.4.5. Tipagem da Sequência Multilocus (<i>Multilocus Sequence Typing- MLST</i>)	15
4.5. Detecção da suscetibilidade a antimicrobianos	16
4.6. Detecção genotípica de cepas MRSA	17
4.7. Detecção fenotípica da produção de biofilme	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1. Identificação genotípica dos isolados de <i>Staphylococcus spp.</i>	19
5.2. Detecção dos genes de colonização e virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
5.2.1. Detecção fenotípica e genotípica da formação de biofilme	23
5.3. Técnicas de Tipagem	25
5.3.1. Tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> através do sistema agr	25
5.3.3. Tipagem do <i>spa</i>	27
5.3.4. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE</i>)	29
5.3.5. Tipagem da Sequência Multilocus (<i>Multilocus Sequence Typing- MLST</i>)	31
5.3.6. Análise comparativa dos perfis genéticos gerados pelas diferentes técnicas de tipagem molecular	33
5.4. Comparação de técnicas e detecção da suscetibilidade a antimicrobianos	37
5.5. Detecção genotípica de cepas MRSA	38
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

A produção leiteira bovina no Brasil cresce em uma taxa constante, sendo a região sudeste, a saber, os Estados de MG e SP, responsável pela maior parte da produção do país. O crescimento observado da produção de leite é devido tanto ao aumento do número de vacas ordenhadas, quanto ao crescimento da produtividade dos animais brasileiros. No entanto, a produção de leite está dispersa em estabelecimentos agropecuários bastante heterogêneos, sendo predominante a produção familiar caracterizada por um número elevado de animais, porém com baixa produtividade (MAIA *et al.*, 2013)

A mastite bovina é a enfermidade mais frequente nos rebanhos leiteiros, sendo o maior impacto negativo sobre a economia pecuária leiteira. É uma doença multifatorial, sendo a causa principal relacionada a colonização do tecido secretor do úbere por agentes patogênicos, em especial, bactérias. As perdas ocasionadas pela mastite decorrem da menor quantidade de leite produzido e da diminuição da qualidade do leite com alterações na sua composição. A espécie *Staphylococcus aureus* é frequentemente relacionada com casos de mastite subclínica. Este importante patógeno é rotineiramente encontrado no úbere de bovinos, além das perdas econômicas, essa espécie bacteriana representa potencial risco à saúde pública (BANDEIRA *et al.*, 2013).

O mecanismo de persistência de *S. aureus* na glândula mámaria ainda não foi completamente elucidado. Um dos mecanismos utilizados por *S. aureus* é a capacidade de invadir uma variedade de fagócitos e sobreviver a certos tipos de células do hospedeiro. O mecanismo de internalização é realizado através da proteína ligante a fibronectina. Além disso, a persistência de *S. aureus* no hospedeiro muitas vezes está relacionada com a capacidade de formar biofilme. *S. aureus* produzem uma série de toxinas a fim de manter o processo infeccioso (ARGUDIN *et al.*, 2010; ATALLA *et al.*, 2008).

O tamanho do genoma de *S. aureus* varia entre 2.5 e 2.9 megabases (MB). O genoma do *S. aureus* é composto aproximadamente de 80% essencial (core) e 20% de genes acessórios os quais consistem os elementos móveis genéticos. O genoma essencial é herdado dos ancestrais e altamente conservado entre as cepas de *S. aureus*. A parte do genoma onde estão inseridos os elementos móveis é composta por elementos que codificam alguns fatores de virulência e resistência a antimicrobianos que são transferidos horizontalmente entre os isolados. As cepas de *S. aureus* se diversificam frequentemente mais por mutação pontual do que por recombinação (GILL, 2009).

As técnicas de tipagem possuem a capacidade de definir e monitorar as mudanças genéticas dentro de uma espécie bacteriana. Além disso, diferentes técnicas de tipagem oferecem possibilidade de investigar a distribuição de clones na comunidade, no hospital e em ambientes de produção, particularmente importante durante surtos. A tipagem bacteriana é crucial para elucidar rotas de transmissão e vigilância epidemiológica das infecções. As principais técnicas utilizadas para estudar a estrutura populacional de *S. aureus* são: *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), tipagem do gene *spa*, tipagem do gene *agr* e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (SABAT *et al.*, 2013).

O presente trabalho avaliou a diversidade genética de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina através da detecção de fatores de virulência, tipagem do *agr*, tipagem do *spa*, PFGE e MLST.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Panorama da produção leiteira

De acordo com dados do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), a União Européia foi a maioria produtora de leite em 2014, com 144,7 bilhões de litros produzidos, a Índia encontra-se em segundo lugar com 141,1 bilhões de litros, os Estados Unidos na terceira posição com 93,1 bilhões de litros e China no quarto lugar com 38,5 bilhões (USDA, 2015). O Brasil vem apresentando aumento gradativo na produção leiteira, devido ao seu extenso território e condições favoráveis para as atividades de agricultura, e atualmente situa-se na quinta posição, com 36 bilhões de litros. A estimativa para a produção de leite para os anos de 2015 e 2016 é de 36,2 e 36,8 bilhões de litros respectivamente (USDA, 2015). O principal estado produtor de leite no Brasil é Minas Gerais (26% do total), seguido pelo Rio Grande do Sul (15%) e Paraná (12%). O estado do Rio de Janeiro ocupa a 10ª posição no *ranking* de produção leiteira no Brasil com um volume de produção leiteira em 2013 de 569, 088 milhões de litros (DERAL, 2014). Embora o país esteja enfrentando uma crise econômica, fontes comerciais acreditam que o setor leiteiro irá sofrer menos impacto do que os demais segmentos (USDA, 2015), uma vez que as previsões são de aumento de 2% no consumo de leite para 2016. Este crescimento ocorre principalmente devido ao aumento do uso industrial.

O Brasil possui mais de 1,5 milhões de produtores de leite. Pelo menos 70% deste montante são pequenos produtores que encontram dificuldades devido ao alto custo de manutenção das atividades do setor. Custos que estão relacionados, em grande parte, com o elevado montante de capital imobilizado na atividade em relação ao nível de produção do estabelecimento (RODRIGUES *et al.*, 2009). A produção de leite ocupa lugar de destaque na economia de agronegócio do Estado do Rio de Janeiro, estando presente na quase totalidade de seus municípios, gerando um grande número de empregos permanentes nos diversos setores da cadeia. Além disso, um grande percentual (82%) de agricultores familiares é responsável pela produção leiteira do Estado, e, em sua grande maioria, produzindo menos de 100 litros dia (EMATER-RIO, 2016).

2.2. Mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*

A mastite ocorre quando um agente infeccioso, químico, mecânico ou térmico, acomete a glândula mamária, produzindo uma reação inflamatória e danos ao tecido glandular (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). A enfermidade em bovinos pode ser causada por diversas espécies de microrganismos, prevalecendo a etiologia bacteriana, com relevância para a espécie *Staphylococcus aureus*, caracterizada como causadora de mastites contagiosas, cuja contaminação e disseminação ocorrem geralmente durante a ordenha, sendo o úbere a principal fonte de infecção (BARDIAU *et al.*, 2016; CAPURRO *et al.*, 2010). As cepas de *S. aureus* podem causar infecções agudas, de natureza clínica (quando existem sinais clínicos aparentes), ou crônica, normalmente quadros subclínicos. A mastite subclínica é caracterizada não só pela alteração dos padrões físicos- químicos do leite, mas pela elevação da contagem de células somáticas. A mastite representa um importante problema econômico para os produtores rurais com redução da quantidade e qualidade do leite, prolongando o custoso tratamento por antibióticos e levando ao abate prematuro (HALASA *et al.*, 2007). A mastite bovina causada por *S. aureus* é relatada em todos os países com prevalência de 5% a 70% de vacas e 90% dos rebanhos. O custo da mastite bovina é estimado entre 100 a 200, dólares por animal (ZECCONI, 2006).

Na patogênese da mastite bovina, um aspecto peculiar é representado pela importância fundamental da imunidade inata contra patógenos invasores. A persistência de *S. aureus* na glândula mamária e a baixa resposta do patógeno a antibioticoterapia faz com o que a mastite bovina ocasionada por esta espécie cronifique e seja uma causa frequente de abate (PEREYRA *et al.*, 2016; ZECCIONI *et al.*, 2006; HEBERT *et al.*, 2000). Atributos de patogenicidade desenvolvidos por esta espécie estão diretamente relacionados a infecção crônica: a formação de biofilme, sobrevivência intracelular, expressão capsular e agrupamento do gene regulador acessório (*agr*) (BARDIAU *et al.*, 2016; RINALDI *et al.*, 2010). Estes fatores auxiliam o patógeno a evadir a resposta imune do hospedeiro (KENAR *et al.*, 2012; BRADY *et al.*, 2011).

Em 1978 foi relatado pela primeira vez a presença de *S. aureus* no rebanho leiteiro brasileiro (MULLER *et al.*, 1978), e desde então este patógeno tem sido encontrado distribuído em todo o país (MARTINS *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2005). De acordo com estudos anteriores realizados no estado do Rio de Janeiro, foram analisadas 140 amostras de leite em que 85,07% (171/201) dos isolados eram pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp., sendo 24,28% (17/70) da espécie *S. aureus* (ALENCAR *et al.*, 2014).

S. aureus possui elevado potencial genético para desenvolver resistência à maioria dos agentes antimicrobianos (BARKEMA *et al.*, 2009). A resistência antimicrobiana de *S. aureus* é amplamente dispersa acompanhado a extensiva utilização de agentes antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina. Esta resistência antimicrobiana é uma das razões para a baixa taxa de cura da mastite (GAO *et al.*, 2012; BARKEMA *et al.*, 2006;).

2.3. MRSA- *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

Staphylococcus aureus é conhecido por ser potencialmente adaptável a pressão seletiva vinda dos antibióticos. Em 1948 foi relatada a primeira cepa de *S. aureus* resistente à penicilina, isto ocorreu logo depois da introdução da penicilina na prática clínica. Em 1950, a meticilina foi introduzida no tratamento de infecções como uma forma de contornar a resistência a penicilina, porém em 1961, uma cepa de *S. aureus* resistente a meticilina foi detectada no Reino Unido (OTTO, 2012; DELEO *et al.*, 2010;).

Infecções causadas por MRSA são atualmente uma preocupação da saúde pública, desde da variedade de hospedeiro deste patógeno até ao aumento da rota de transmissão nos últimos anos. Na década de 70, as infecções causadas por MRSA eram localizadas em ambientes hospitalares (HA-MRSA) (WENDLANDT *et al.*, 2013). Posteriormente ocorreu a dispersão do MRSA na comunidade (CA-MRSA) entre pessoas com fatores de risco para infecções por MRSA (DOYLE *et al.*, 2012). Nos últimos anos, foi detectado um tipo de MRSA associado ao ambiente de produção animal (LA-MRSA), cuja ocorrência tem sido reportada em diferentes países do mundo (KÖCK *et al.*, 2013). O LA-MRSA (genotipicamente classificado com complexo clonal 398, CC398) é encontrado colonizando animais, principalmente porcos, bovinos e cavalos, além de ter a capacidade de colonizar e causar sérias infecções em humanos que tiveram contato direto com estes animais (LOZANO *et al.*, 2011; VAN CLEEF *et al.*, 2010; SOAVI *et al.*, 2010), porém também foi detectado em pessoas que não estavam expostas ao ambiente de produção animal (LARSEN *et al.*, 2015). Além disso, tem sido demonstrado que a manipulação/consumo de alimentos de origem animal contaminado por MRSA pode ser um potencial veículo para a transmissão de LA-MRSA para humanos (FEINGOLD *et al.*, 2012). De fato, os clones de MRSA têm sido isolados de carne, peixe, leite, produtos lácteos e sorvete em todo o mundo, e estes produtos eram considerados próprios para consumo (KAMAL *et al.*, 2013; AGERSO *et al.*, 2012; O'BRIEN *et al.*, 2012; HAMMAD *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2010; NORMANNO *et al.*, 2007). Cepas MRSA têm sido frequentemente relacionadas como agentes responsáveis por ocasionar

mastite bovina subclínica. Estas podem ser eliminadas no leite, sem causar alterações nas características sensoriais do produto, e desse modo, se disseminar na cadeia alimentar (HARAN *et al.*, 2012). Além disso, a emergência de cepas LA-MRSA representa um aumento potencial de risco zoonótico (OTTER & FRENCH, 2010), uma vez que cepas MRSA de produção animal podem ser agentes casuais em infecções de MRSA em humanos, como também existem relatos de cepas MRSA de origem humana albergadas por animais (VERKADE & KLUYTMANS, 2014).

2.4. Fatores de colonização e virulência

A mastite causada por *S. aureus* é resultado da produção de diversos fatores de virulência, que podem contribuir em diferentes formas para a patogênese. As diferenças de patogenicidade de cepas de *S. aureus* podem ser resultado da distribuição geográfica, do hospedeiro, e do tipo de tecido (VAN LEEUWEN *et al.*, 2005). O número e a combinação dos genes de virulência podem dar importantes contribuições ao potencial patogênico de cepas de *S. aureus* (ZECCONI *et al.*, 2006). Um elevado número de genótipos de *S. aureus* oriundos de rebanho bovino no mundo tem sido estudado para desenvolver melhores estratégias para o tratamento de mastite (KOT *et al.*, 2016).

Uma vez que *S. aureus* penetra no interior da glândula mamária, a bactéria se adere ao revestimento epitelial e induz a defesa imune inata do hospedeiro através de uma variedade de fatores de virulência tais como cápsula e proteína A, os quais interferem no processo de fagocitose (NANRA *et al.*, 2013). Uma vez a infecção estabelecida, o dano ao revestimento epitelial da glândula mamária é iniciado pela ulceração e obstrução dos ductos lactíferos e alvéolos, e pela infiltração das células inflamatórias do parênquima (PAAPE *et al.*, 2002). *S. aureus* produz uma variedade de fatores de virulência que mantém a infecção. Dentre estes fatores de virulência estão incluídos a cápsula polissacarídea, citotoxinas, enterotoxinas superantígenos e MSCRAMM (Componentes da superfície microbianas que reconhecem moléculas de matriz adesiva). Um grande número de citotoxinas é produzido por *S. aureus* os quais podem formar poros na membrana celular, causando turgor osmótico e levando à morte da célula. O primeiro passo para o estabelecimento da infecção é o afixamento inicial de *S. aureus* na membrana eucariota, o qual é seguido pela colonização e subsequente infecção (BROUILLETTE *et al.*, 2003). A colonização é comumente associada com uma variedade de fatores de aderência ou adesinas as quais são conhecidas como MSCRAMM. Existem mais de 20 diferentes MSCRAMMs identificadas, que podem ser expressas por *S. aureus* (WALSH *et al.*, 2008). Em humanos, é estimado que cerca de 80% das infecções são associadas com produção de biofilme bacteriano (DAVIES, 2003). O biofilme reduz a opsonização dos anticorpos e fagócitos e as bactérias que são capazes de produzir biofilme são menos suscetíveis a antibióticos (OTTO *et al.*, 2013).

Em bovinos, a formação de biofilme por *S. aureus* é considerado um importante fator de virulência, que pode influenciar a persistência da mastite (MELCHIOR *et al.*, 2006). *S. aureus* pode se aderir e se internalizar as células epiteliais da glândula mamária, além disso, também é capaz de driblar a fagocitose, persistindo na forma metabólica inativa. A melhor compreensão do mecanismo de internalização de *S. aureus* é através da proteína ligante a fibronectina (FNBNPs) (ATALLA *et al.*, 2008).

O circuito regulatório que controla a virulência e a adaptação ao meio é complexo. Este sistema regulatório pode receber sinais do meio externo para modular a formação do biofilme e produzir diversos exoprodutos de uma maneira apropriada para o local da infecção (STER *et al.*, 2005). Um dos sistemas regulatórios, *agr*, codifica um componente constituinte do *quorum sensing* que é ativado pela densidade bacteriana através da secreção de peptídeo auto induzido. A ativação do *agr* segue a produção da molécula RNIII, o qual é uma

molécula efetora do sistema *agr*. O RNA III segue a redução das proteínas de superfície, tais como, as adesinas requeridas pela colonização. Ao mesmo tempo, RNA III permite a produção das proteínas secretada, tais como, nucleases e proteases, ambas participam da liberação de bactérias de biofilme (OTTO *et al.*, 2013; NOVICK & GEISINGER, 2008).

A relativa importância de vários fatores de virulência de *S. aureus* e o potencial genético de cepas oriundas de mastite bovina não é completamente investigada. Estudos ao redor do mundo têm relatado a diversidade de genótipos de *S. aureus* associados à mastite bovina (MITRA *et al.*, 2013; KLEIN *et al.*, 2012; WOLF *et al.*, 2011). Além disso, cepas de *S. aureus* envolvidas com mastite bovina têm apresentado uma variedade de genótipos e fenótipos que influenciam a gravidade da doença e a persistência e a capacidade de produzir específicas toxinas, biofilme ou ambos (BARDIAU *et al.*, 2014; OTE *et al.*, 2011).

2.5. Diversidade genética do *Staphylococcus aureus*

O tamanho do genoma de *S. aureus* varia entre 2.5 e 2.9 megabases (MB). Estudos anteriores, que compararam a diversidade de cepas de *S. aureus*, identificaram genes comuns a todas as cepas, os quais compreendem o genoma essencial (LINDSAY, 2010). O restante do genoma, denominado genoma variável, é composto por genes acessórios específicos frequentemente envolvidos com a virulência e a capacidade de colonizar hospedeiros específicos ou ambientes (SUNG *et al.*, 2008). O genoma de *S. aureus* é composto aproximadamente por 80% de genes essenciais e 20% de genes acessórios, entre os quais estão inseridos os elementos genéticos móveis (GILL, 2009). O genoma essencial é conservado entre diferentes linhagens e compreende os genes que codificam proteínas associados com metabolismo, regulação, manutenção e funções adesivas (LINDSAY & HOLDEN, 2004). O genoma essencial variável é a parte do genoma essencial que contém genes que codificam proteínas de superfície e seus reguladores, assim como genes de virulência. Este compõe cerca de 10 a 12% do genoma de *S. aureus* (LINDSAY, 2010). A presença de genes acessórios como parte do genoma variável, pode promover ou suprimir o potencial patogênico de determinada cepa de *S. aureus* (MELLES *et al.*, 2004). Os elementos genéticos móveis (EGM) consistem de, por exemplo, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade de *S. aureus* (*Staphylococcus aureus* pathogenicity islands- SaPIs), plasmídeos, transposons e cassette cromossomal estáfilocócico (scc). Os EGMs codificam aproximadamente 50% dos fatores de virulência conhecidos e contribuem ativamente com a transferência horizontal de DNA entre as cepas de *S. aureus* (LINDSAY, 2010). A transferência horizontal dos genes pode induzir combinações diferentes dos fatores de virulência, os quais podem promover adaptações específicas de hospedeiro (HIRSCHHAUSEN *et al.*, 2010).

A capacidade de *S. aureus* de adaptação a hospedeiros específicos é influenciada pela aquisição de elementos genéticos móveis, pela diversificação dos genes e pelo declínio no número de genes potenciais (LOWDER *et al.*, 2009). A compreensão da combinação de genes que são responsáveis pelo sucesso da dominância da linhagem clonal de *S. aureus* e o conhecimento dos fatores necessários para especificidade do hospedeiro e virulência são importantes para o entendimento da patogênese, prevenção e tratamento da mastite causada por *S. aureus* (BUDD *et al.*, 2015). Os principais mecanismos de diversificação de *S. aureus* são mutações aleatórias em nucleotídeos e a transferência horizontal de genes (HOLMES & ZADOKS, 2011).

Zadoks e colaboradores (2002) concluíram que a maioria dos casos de mastite é causada por cepas de *S. aureus* altamente adaptadas a glândula mamária e que diferem de cepas isoladas da pele. Entretanto, Haveri e colaboradores (2008) sugerem que a maioria dos isolados de *S. aureus* da pele do teto e do canal do teto são geneticamente indistinguíveis dos

isolados que infectam a glândula mamária. Em estudos anteriores, estes pesquisadores detectaram associação entre os genótipos de *S. aureus* e a severidade dos sinais clínicos da mastite (HAVERI *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que os genótipos de *S. aureus* oriundos da mastite bovina são altamente relacionados com seu padrão de genes de virulência (PICCININI *et al.*, 2012). Além disso, alguns subtipos estão altamente associados com características epidemiológicas selecionadas, como prevalência e persistência dentro do rebanho, embora, a relação entre as propriedades patogênicas seja menos evidente (GRABER *et al.*, 2009).

2.6. Técnicas de tipagem molecular

A identificação de diferentes tipos de organismos dentro de uma espécie é denominada de tipagem. O papel principal da tipagem microbiana é avaliar as relações genéticas entre os isolados. A compreensão do parentesco clonal entre as cepas é essencial para determinar a fonte e as rotas de infecção, identificar um surto, traçar rotas de transmissão, reconhecer cepas particularmente virulentas e avaliar a eficácia das medidas de controle (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2013).

Métodos tradicionais de tipagem baseado no fenótipo tais como sorotipagem, biotipagem, fagotipagem ou antibiotipagem foram utilizadas por muitos anos. O desenvolvimento de métodos que permitem a análise da relação dos isolados em nível molecular tem revolucionado a capacidade de diferenciar entre os tipos e subtipos de espécies bacterianas (SABAT *et al.*, 2013).

A escolha do método molecular de tipagem apropriado depende significativamente do problema a se resolver e do contexto epidemiológico no qual o método vai ser utilizado, assim como a escala geográfica e a escala de tempo da investigação (SABAT *et al.*, 2013). Em investigações de surto, um método de tipagem deve ter um poder discriminatório capaz de distinguir todos isolados epidemiologicamente relacionados. Idealmente, tais métodos devem ser capazes de discriminar isolados intimamente relacionados para revelar uma possível transmissão hospedeiro-hospedeiro, o que é importante para se desenvolver estratégias para prevenir a propagação. Ao mesmo tempo, esta estratégia deve ser rápida, barata, altamente reprodutível e fácil de realizar e interpretar (SABAT *et al.*, 2013; VAN BELKUM *et al.*, 2007). Quando a tipagem é aplicada para a vigilância contínua, o respectivo método deve produzir resultados com estabilidade adequada ao longo do tempo para permitir a implementação de medidas eficientes de controle de infecção. Além disso, um método de tipagem que vai ser usado em redes internacionais deve produzir dados portáteis, ou seja, facilmente transferíveis entre sistemas diferentes e que podem ser facilmente acessados através de uma fonte aberta de banco de dados baseado na *web*, ou em um banco de dados cliente-servidor conectado via Internet. Além disso, um método de tipagem usado para vigilância deve contar com uma nomenclatura internacionalmente padronizada, e deve ser aplicável a uma ampla gama de espécies bacterianas. Também deve haver procedimentos para verificar e validar, usando controles internos e externos quantificáveis, para que os dados de tipagem sejam de alta qualidade. Uma clara vantagem do método de tipagem molecular é a disponibilidade de um software que: (i) permite o controle automatizado de qualidade de dados de tipagem, (ii) permite a atribuição padrão / Tipo, (iii) implementa um algoritmo para agrupamento dos isolados com base nos dados obtidos, (iv) presta assistência na detecção de focos de infecção e (v) facilita a gestão e armazenamento de dados (SABAT *et al.*, 2013).

Muitos métodos foram desenvolvidos para a caracterização molecular epidemiológica de isolados bacterianos. No entanto, nenhum deles é ideal para todas as formas de investigação. Assim, um entendimento completo das vantagens e limitações dos métodos de

tipagem disponíveis é imprescindível para a seleção das abordagens apropriadas para definir de forma não ambígua cepas de surtos (SABAT *et al.*, 2013).

Uma variedade de métodos tem sido utilizada para caracterizar e determinar geneticamente os tipos ou subtipos de cepas de *S. aureus*, seguido da identificação predominante da cepa contagiosa. Cada método tem suas vantagens e limitações, e nenhum método utilizado de forma isolada combina elevado poder discriminatório, completa portabilidade interlaboratorial, fácil execução e baixo custo. Desse modo, devido à especificidade variável e diferentes estruturas alvo, a escolha dos métodos de tipagem deve obedecer ao objetivo do estudo (FESSLER *et al.* 2011).

Os métodos comumente utilizados para detectar a cepa tipo *S. aureus* incluem o PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado - Pulsed Field Gel Electrophoresis) (MIDDLETON *et al.*, 2002), tipagem do gene *spa* (SHOPSIN *et al.*, 1999) e MLST (Tipagem da Sequência Multilocus - Multilocus Sequence Typing) (SMITH *et al.*, 2005). Embora laborioso, o PFGE é considerado padrão ouro como método de tipagem de cepa para este gênero e espécie, pois este método possui maior poder discriminatório em relação as demais técnicas (ADKINS *et al.*, 2016).

2.6.2. Tipagem pelo sistema agr

A expressão da maioria dos fatores de virulência em *S. aureus* é controlada pelo gene regulatório acessório (*agr*). O *operon agr* codifica um sistema de sinalização de dois componentes, o qual é acionado por um peptídeo auto indutor de *quorum sensing* (AIP), codificado pelo gene *agrD*. A expressão do gene *agr* varia em resposta a alterações na densidade celular. *S. aureus* pode ser classificado em quatro grandes grupos de *agr* com base na especificidade do AIP para o seu receptor de sinal (*agrC*). Estes grupos são nomeados de *agr* I, II, III e IV. Os *agrs* dos grupos I e II são mais frequentes em cepas de *S. aureus* originados de mastite bovina (Mitra *et al.*, 2013; Ayed *et al.*, 2006).

2.6.3 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE)

A técnica de PFGE foi desenvolvida em 1984 por SCHWARTZ & CANTOR (1984) e é baseada na análise dos perfis gerados pela atuação da enzima de restrição no DNA bacteriano. A enzima de restrição utilizada para *Staphylococcus* spp. é a *SmaI* que reconhece e cliva na sequência CCC-GGG moléculas DNA. A digestão do DNA ocorre em aproximadamente 10-30 fragmentos com intervalos de aproximadamente 10- 1000 kb cada. Para evitar a quebra em grandes moléculas do DNA, a célula intacta é embebida na agarose, e então são lisadas e desproteinizadas *in situ*. Um dos modelos mais comumente utilizado no PFGE é sistema de campo elétrico homogêneo (CHEF), em que a carga negativa do DNA é corrida através de um plano de uma matriz de gel de agarose em direção ao polo positivo. Em contraste a eletroforese convencional, no qual a corrente elétrica é aplicada no gel em uma única direção, a corrente no PFGE, é fornecida em pulsos que se alternam entre três conjuntos de eletrodos, resultando em um alto nível de resolução dos fragmentos (ANDREI *et al.*, 2006; TENOVER *et al.*, 1997).

O resultado dos padrões de fragmentos de DNA pode ser comparado para determinar suas relações genéticas. De acordo com o critério proposto por Tenover e colaboradores (1995), os isolados são designados como clones no PFGE, caso as cepas apresentem o mesmo padrão de fragmentação com a devida correspondência de tamanho entre as bandas. Mutações pontuais, deleções, inserções e perda ou aquisição de plasmídeos poderiam acarretar em menores diferenças nos perfis sem produzir novos subtipos. Isolados que diferem em duas ou três bandas (consistente em um evento genético) são considerados intimamente relacionados,

enquanto se a diferença for de quatro a seis bandas (dois eventos genéticos) resulta num possível parentesco. Os isolados são considerados sem parentesco caso o padrão no PFGE difere de sete ou mais bandas (três ou mais eventos genéticos).

O sucesso do PFGE resulta de seu excelente poder discriminatório e de sua alta concordância epidemiológica. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso em investigações epidemiológicas de curto prazo, provando ser um método bastante preciso e reprodutível (RANJBAR *et al.*, 2014). Uma comparação visual dos perfis com apenas 10 a 20 bandas é geralmente fácil e através da análise computacional é possível disponibilizar uma biblioteca com a base de dados. Uma desvantagem do PFGE é o intensivo trabalho laboratorial, necessitando múltiplos dias para realização do procedimento, pessoal qualificado para interpretar os resultados e o auxílio de um computador para análise do padrão de bandas (GOERING, 2010). Além disso, esta técnica tem baixa portabilidade interlaboratorial. Eles podem incluir a intensidade fraca de padrões de bandas devido à baixa concentração de células, artefatos devido a digestão incompleta de DNA, colunas distorcidas devido a eletrodos com defeito ou espessura gel irregular e/ou altura do tampão devido a superfícies irregulares usados para a fundição de gel ou eletroforese (RANJBAR *et al.*, 2014).

2.6.3. Tipagem da Sequência Multilocus (*Multilocus Sequence Typing- MLST*)

A fim de superar a ausente/insuficiente portabilidade das abordagens tradicionais, o método MLST foi desenvolvido. A técnica de MLST baseia-se nos princípios da técnica de Eletroforese de isoenzimas em gel de agarose (MLEE) (SELANDER *et al.*, 1986), que se apoia sobre as diferenças na mobilidade eletroforética de diferentes enzimas presentes numa bactéria. O primeiro esquema MLST foi desenvolvido para *Neisseria meningitidis* em 1998 (MAIDEN *et al.*, 1998). Pouco tempo depois, o método foi estendido a outras espécies de bactérias e, ao longo do tempo, tornou-se uma ferramenta muito popular para estudos epidemiológicos mundiais, e para estudos sobre a evolução molecular de patógenos (ENRIGHT *et al.*, 2000). O MLST é um método baseado fragmentos internos múltiplos na sequência de DNA de (normalmente sete: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*) genes de manutenção. Fragmentos internos de cada gene com aproximadamente 450-500 pb são amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR), e subsequente sequenciamento do DNA de ambas as fitas. No MLST, a relação genética entre as cepas é determinada pela análise das sequências dos múltiplos genes os quais são comparados pela substituição de nucleotídeo na sequência. Uma vez que os genes possuem graus variáveis de deriva genética, os genes de manutenção são os mais frequentemente sequenciados devido a estarem presentes em todos os isolados da mesma espécie. Uma vez que eles não estão sob forte pressão seletiva, a sua variabilidade genética é baixa e pode não fornecer uma discriminação adequada entre os isolados não relacionados. Para o MLST ser uma ferramenta epidemiológica eficaz, a seleção e o número de genes deve ser adequada para diferenciar os isolados que apresentem mais recente divergência genética (RANJBAR *et al.*, 2014). Os alelos definem a linhagem de *S. aureus*, resultando em um perfil alélico denominado de tipo de sequência (ST) (SABAT *et al.*, 2013; DEURENBERG *et al.*, 2008). As cepas são agrupadas no mesmo complexo clonal (CC) caso possuam de cinco a sete genes de manutenção com sequências idênticas (DEURENBERG *et al.*, 2008). Parentesco entre STs pode ser revelado usando o método de agrupamento com base em tipos relacionados ao algoritmo de sequência, (eBURST ou a mais recente versão otimizada global, goeBURST) inferindo padrões de descendência evolutiva entre isolados por um modelo de expansão clonal e diversificação e atribuindo isolados aos complexos clonais (FRANCISCO *et al.*, 2012).

A grande vantagem do MLST é que todos os dados produzidos por este método não são ambíguos devido a uma nomenclatura internacionalmente padronizada e altamente

reprodutível. Além disso, as sequências de alelos e perfis ST estão disponíveis em grandes bases de dados centrais (<http://pubmlst.org> e www.mlst.net) que podem ser consultadas através da Internet. A grande desvantagem de MLST é o seu elevado custo, e baixo poder discriminatório para investigações de surto ou em estudo epidemiológicos locais. Os custos totais de todos os consumíveis e reagentes para MLST dependem muito do número de loci investigados e do país em que este procedimento de tipagem é conduzido. Além disso, MLST é trabalhoso, demorado e para alguns patógenos, demasiadamente exigente para uso rotineiro em investigações de surtos e vigilância local (SABAT *et al.*, 2013).

2.6.4. Tipagem do *spa*

O gene *spa* está localizado no genoma essencial (KOREEN *et al.*, 2004). A tipagem do gene *spa* é baseada no sequenciamento do gene da proteína A na região polimórfica X, que contém um número variável de 24-27 pb regiões repetidas flanqueadas por regiões bem conservadas. A proteína A estafilocócica é uma proteína estável da parede celular presente em *S. aureus*, e é composta de três regiões: (a) sequência C terminal; (b) região X; e (c) sequência N-terminal. A região X é a única região polimórfica e sua função não é conhecida. A tipagem é baseada em: (a) exata sequência DNA com repetições únicas; (b) o número de repetições; e (c) a ordem das diferentes repetições (SABAT *et al.*, 2013; SHOPSIN *et al.* 1999). No método de tipagem do *spa*, cada repetição identificada está associada a um código e um *spa*-tipo é deduzido a partir de repetições específicas (MELLMANN *et al.*, 2007; HARMSEN *et al.*, 2003). Embora a tipagem do *spa* tenha uma menor capacidade discriminatória que PFGE, a sua relação custo-eficácia, a facilidade de utilização, rapidez, excelente reprodutibilidade, estabilidade, nomenclatura internacional padronizada, alto rendimento, a utilização de um software, e portabilidade completa de dados através do banco de torna este método uma ferramenta útil para a caracterização de isolados de *S. aureus* em níveis local, nacional e internacional. A principal desvantagem deste método baseado na tipagem de um único locus e que ele pode classificar erroneamente tipos particulares devido à recombinação e/ou homoplasia (SABAT *et al.*, 2013; HALLIN *et al.* 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a diversidade das bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* circulantes em ambiente de produção leiteira em municípios do Vale do Paraíba e região Sul-Fluminense do Estado do Rio de Janeiro.

3.2. Objetivos específicos

- Detectar o perfil fenotípico e genotípico de fatores de virulência em cepas da espécie *Staphylococcus aureus* isoladas a partir de amostras de leite de vacas com mastite subclínica;
- Avaliar fenotipicamente a suscetibilidade a antimicrobianos através da técnica de difusão em disco e da técnica de CIM automatizada (Sensititre- Thermo Scientific®);
- Detectar genotipicamente a presença de cepas MRSA;
- Formar perfis genéticos através da detecção de fatores de virulência, tipagem do *agr*, tipagem do *spa*, PFGE e MLST.
- Determinar os clones circulantes de *S. aureus* causadores de mastite bovina dentro das regiões estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Um total de 120 amostras de leite foi coletado no período de outubro a novembro de 2012, originado de sete fazendas de gado leiteiro localizadas nos municípios do estado do Rio de Janeiro, Barra do Piraí Vassouras, Passa Três, Paraíba do Sul, Rio das Flores e Carmo. Estas propriedades foram selecionadas por apresentarem alta prevalência de mastite subclínica (superior a 50%) testadas através do Califórnia Mastitis Test (CMT) e contagem de células somáticas (CCS). Foram isolados 71 *S. aureus*. Para a realização da presente tese foram selecionados 53 isolados considerando o CMT, o teto de origem e o perfil de suscetibilidade (ceftiofur, cefalexina, cefoxitina, oxacilina, neomicina, enrofloxacina, penicilina, ampicilina e eritromicina). A amostragem utilizada nos estudos de análise preliminar foi submetida a detecção dos perfis de virulência, tipagem do gene *agr* e tipagem do *spa*. Do total de 53 cepas de *S.* foram selecionadas inicialmente 33 cepas de *S. aureus* de modo a considerar a representatividade de todos os perfis de virulência previamente estabelecidos. Após análises dos perfis gerados pelo PFGE, a amostragem final foi estabelecida em 17 isolados que foram utilizados para os ensaios de MLST, detecção da produção fenotípica de biofilme, detecção da suscetibilidade antimicrobiana e detecção genotípica de cepas MRSA.

Todos os isolados foram previamente identificados como cocos Gram-positivos e submetidos a testes de rotina, incluindo inoculação em meio seletivo para análise de suas características coloniais e produção de catalase e coagulase. As amostras coagulase-positiva foram avaliadas para fermentação de maltose, D-manitol e produção de acetoína (KONEMAN *et al.*, 2012). A confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* foi realizada pela amplificação dos genes *coa* (HOOKEY *et al.*, 1998) e *nuc* (CIFTCI *et al.*, 2009) por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Quadro 1). A cepa padrão *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle.

A confirmação da identificação fenogenotípica dos isolados foi feita pela análise proteômica por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF), realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como descrito por Motta e colaboradores (2014).

Quadro 1. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação de *Staphylococcus aureus*.

Gene	Sequência do Iniciador (5' -3')	Ciclo	Referência
<i>coa</i> (Variável)	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	94°C 4 min (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 72°C 5 min	HOOKEY <i>et al.</i> , 1998
<i>nuc</i> (279 pb)	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	94°C 5 min (94°C 45 s, 68°C 45 s, 72°C 90 s) x 30 72°C 10 min.	CIFTCI <i>et al.</i> , 2009

4.2. Extração do DNA bacteriano

Para a extração do DNA bacteriano, foi realizada metodologia padronizada e estabelecida pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ (TITO *et al.*, 2015). Cada isolado foi cultivado em 5 mL de Caldo BHI à temperatura ambiente por 12-16 horas a 100 x g. Em seguida 1,5 mL da cultura foi transferido para microtubos de 1,5 mL, centrifugados por 5 minutos a 8.000 x g e o sobrenadante descartado, esta etapa foi repetida três vezes. As células foram resuspendidas em 600 µL de solução de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em Vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e foram adicionados 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 minutos, adição de igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 8.000 x g por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e foram adicionados 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a 20°C por 2 ou 12h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 8.000 x g por 30 min, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco à temperatura ambiente em uma capela de exaustão, os sedimentos foram então suspensos em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM).

A qualidade e a quantidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelado com SYBR *Green* I (Invitrogen®) pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). A determinação da concentração e da pureza do DNA também foi avaliada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA).

4.3. Detecção dos genes de colonização e virulência de *Staphylococcus aureus*

Para a caracterização do perfil de virulência de *S. aureus* foram investigados os genes relacionados aos seguintes fatores: hemolisinas (*hla* e *hlb*), capsula (*cap5* e *cap8*), fibronectina (*fbnA* e *fbnB*) e biofilme (*icaA* e *icaD*) (Quadro 2). As concentrações utilizadas para amplificação dos genes foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl₂ - Fermentas®), 0,3 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Thermo Scientific®), 1 U de *Taq* polimerase (Fermentas®), água ultrapura para completar um volume total de reação (18 µL) e 2 µL do DNA total extraído. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 60 min.) e revelados com corante SYBR *Green* I (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

Quadro 2. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus aureus*

Gene/ Tamanho do fragmento	Sequência do Iniciador (5' -3')	Ciclo	Referência
<i>icaA</i> (1315bp)	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C	(92°C 45s, 49°C 45s, 72°C 1 min) x 30 and 72°C 7min	VASUDEVAN <i>et al.</i> (2003)
<i>icaD</i> (381bp)	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	(92°C 45s, 49°C 45s, 72°C 1 min) x 30 and 72°C 7min	VASUDEVAN <i>et al.</i> (2003)
<i>fbnA</i> (1279pb)	GCG GAG ATC AAA GAC AA CCA TCT ATA GCT GTG TGG	(94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1min) x 30	EL-SAYED <i>et al.</i> , 2006
<i>fbnB</i> (812pb)	GGA GAA GGA ATT AAG GCG GCC GTC GCC TTG AGC GT	(94°C 30s, 50°C 30s, 72°C 1min)	EL-SAYED <i>et al.</i> , 2006
<i>cap5</i> (880pb)	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CTC GGA TAA CAC CTG TTG C	(94°C 15s, 57°C 15s, 72°C 30s) x 20	EL-SAYED <i>et al.</i> , 2006
<i>cap8</i> (1174pb)	ATG ACG ATG AGG ATA GCG CAC CTA ACA TAA GGC AAG	(94°C 15s, 52°C 15s, 72°C 30s) x 20	EL-SAYED <i>et al.</i> , 2006
<i>hla</i> (210pb)	CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T	94°C 5min. (94°C 1min, 50°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 and 72°C 7min ;	NILSSON <i>et al.</i> , 1999
<i>hlB</i> (300pb)	GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT	94°C 5min. (94°C 1min, 50°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 and 72°C 7min ;	NILSSON <i>et al.</i> , 1999

4.4 Técnicas de tipagem

4.4.1 Tipagem de *Staphylococcus aureus* através do sistema *agr*

Para a tipagem de grupos do sistema *agr* foram utilizados iniciadores específicos para cada grupo com base no domínio hipervariável do locus *agr*, segundo Shopsisin e colaboradores (2003). Um iniciador sensu, *pan-agr*, correspondendo a sequências conservadas do gene *agrB*, foi utilizado em todas as reações. Quatro iniciadores anti-sensu, cada um específico para a amplificação de um único grupo de *agr* com base no polimorfismo do locus *agr* foram utilizados (Quadro 3).

As concentrações utilizadas para amplificação dos genes foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl₂ - Invitrogen®), 0,3 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), água ultrapura para completar um volume total de reação (20 µL) e 2 µL do DNA total.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 60 min.) e revelados com corante SYBR *Green* I (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

4.4.2. Tipagem do *spa*

A técnica de tipagem do gene *spa* foi realizada conforme protocolo descrito por Robinson & Enright (2003) (Quadro 3). As concentrações utilizadas para amplificação dos genes foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl₂ - Invitrogen®), 0,3 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), água ultrapura para completar um volume total de reação (20 µL) e 2 µl do DNA total.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 50 min.) e revelados com corante SYBR Green I (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e, em seguida, submetido ao sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems do Laboratório de Biotecnologia da Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. As sequências foram editadas utilizando o programa Bioedit (HALL *et al.*, 1999) e Mega versão 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016) e posteriormente foram analisadas no programa DNAGear (FAROQ *et al.*, 2012) para designação do tipo de *spa*.

4.4.3. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE)

A técnica de tipagem PFGE foi realizada durante o período de Doutorado Sanduiche no laboratório de Veterinary Microbiology and Preventive Medicine sob a orientação da professora Catherine Logue na Iowa State University, e executada de acordo com o protocolo estabelecido pelo CDC para *S. aureus* resistente a oxacilina (CDC, 2013). Os isolados foram semeados em ágar TSA e incubados a 37°C por 24hrs. Após o crescimento uma pequena alíquota das colônias foi colocada em tubos contendo 2 ml de *cell buffer*. Os tubos foram colocados no Vortex e um volume de 800 µl foi transferido para uma cubeta para verificação da concentração da amostra através do aparelho de espectrofotometria (0.9-1.1/ 610 nm). Para o preparo dos plugs foi preparado 100 ml de agarose SeaKem Gold na concentração de 1.8%. Em um tubo de 1,5ml foram colocados 3µl de lisostafina, 300µl da suspensão bacteriana e 300 µl da agarose. Todo o conteúdo foi distribuído em duplicata para os moldes. Em um tubo falcon de 20 ml, foram colocado 4 ml de tampão de lise EC e os plugs e posteriormente foram incubados em um banho maria a 37°C por 4 hrs. Os plugs então foram lavados 4 vezes com TE por 30 minutos a 37°C. Os plugs foram armazenados em tubos de 1,5ml contendo 1 ml de TE. Para cada isolado foi cortado 2 mm do respectivo plug, e este foi transferido para um tubo de 1,5ml contendo a solução com a enzima *SmaI* e foram incubados a 30°C por 3 hrs. Com o auxílio de uma pipeta foi retirado 100 µl da solução do tubo e foi adicionado ao tubo 200 µl de 0,5X TBE. Os blocos foram transferidos para poços do gel de agarose 1% (Bio-Rad), preparado com 0,5 x de TBE e separados por eletroforese em um equipamento CHEF-DR III system (Bio-Rad). As condições de corrida foram realizadas segundo critérios estabelecidos pelo CDC. Como marcador de corrida foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Braenderup H9812. O gel foi analisado no programa Bionumerics (Applied Maths®) para a determinação das bandas e o cálculo da similaridade entre os isolados utilizou-se o complemento do índice de Dice para posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA.

4.4.4. Tipagem da Sequência Multilocus (*Multilocus Sequence Typing- MLST*)

A técnica de tipagem MLST foi realizada de acordo com o proposto por Enright e colaboradores (2000). No qual foi realizado um PCR simples para cada um dos sete genes de manutenção (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*) (Quadro 3). Foram selecionados 17 isolados de *S.aureus* para a realização desta técnica após a análise dos resultados obtidos pela técnica de PFGE. As concentrações utilizadas para amplificação dos genes foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl₂ - Invitrogen®), 0,3 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), água ultrapura para completar um volume total de reação (18 µL) e 2 µL do DNA total.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 50 min.) e revelados com corante SYBR Green I (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e, em seguida, submetido ao sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems pela empresa Helixxa, Campinas (São Paulo). As sequências foram editadas utilizando o programa Bioedit (HALL *et al.*, 1999) e Mega versão 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016) e posteriormente foram determinados os alelos e formado o tipo de sequência (ST) utilizando o site MLST (www.mlst.Net).

Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de tipagem de *Staphylococcus aureus*

Gene/ Tamanho de fragmento	Sequência do Iniciador (5' -3')	Ciclo	Referência
<i>pan-agr</i>	ATG CAC ATG GTG CAC ATG C	(94°C 1 min, 55°C 1min, 72°C 1min)x 25	SHOPSIN <i>et al.</i> (2003)
<i>agr I</i>	GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT	(94°C 1 min, 55°C 1min, 72°C 1min)x 25	SHOPSIN <i>et al.</i> (2003)
<i>agrII</i>	GTA TTA CTA ATT GAA AAG TGC CAT AGC	(94°C 1 min, 55°C 1min, 72°C 1min)x 25	SHOPSIN <i>et al.</i> (2003)
<i>agrIII</i>	CTG TTG AAA AAG TCA ACT AAA AGC TC	(94°C 1 min, 55°C 1min, 72°C 1min)x 25	SHOPSIN <i>et al.</i> (2003)
<i>agrIV</i>	CGA TAA TGC CGTA ATA CCC G	(94°C 1 min, 55°C 1min, 72°C 1min)x 25	SHOPSIN <i>et al.</i> (2003)
<i>arc</i>	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG	95°C 5min (95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min) 30X 72°C 5min	ENRIGHT <i>et al.</i> , 2000
<i>aro</i>	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC	95°C 5min (95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min) 30X 72°C 5min	ENRIGHT <i>et al.</i> , 2000
<i>glp</i>	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC	95°C 5min (95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min) 30X 72°C 5min	ENRIGHT <i>et al.</i> , 2000
<i>gmk</i>	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA	95°C 5min (95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min) 30X 72°C 5min	ENRIGHT <i>et al.</i> , 2000
<i>pta</i>	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA	95°C 5min (95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min) 30X 72°C 5min	ENRIGHT <i>et al.</i> , 2000
<i>tip</i>	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC	95°C 5min (95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min) 30X 72°C 5min	ENRIGHT <i>et al.</i> , 2000
<i>yqi</i>	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC	95°C 5min (95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min) 30X 72°C 5min	ENRIGHT <i>et al.</i> , 2000
<i>spa</i>	AGA CGA TCC TTC GGT GAG C GCT TTT GCA ATG TCA TTT ACT G	95°C 10 min (95°C 30s, 60°C 30 s, 72° 45s) 30X 72° 10 min.	SHOPSIN <i>et al.</i> , 1999

4.5. Detecção da suscetibilidade antimicrobiana

Todos os isolados utilizados na presente tese foram previamente submetidos a detecção da resistência a oxacilina por Motta (2013) e classificados como MSSA. Frente a isto, os 17 isolados selecionados após a realização da técnica de tipagem PFGE foram

submetidos à detecção da suscetibilidade a outras classes de antimicrobianos pelas técnicas de difusão em disco e pela técnica de CIM automatizada (Sensititre- Thermo Scientific®).

O teste de difusão em disco foi realizado através da semeadura dos isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície de placas contendo ágar Müeller-Hinton (MH-Himedia), seguido da deposição dos discos de clorafenicol, ciprofloxacina, eritromicina, linezolda, nitrofurantonina, penicilina, tetraciclina e eritromicina. Após incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 h, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados (CLSI VET01-S2, 2013).

Para a detecção da suscetibilidade antimicrobiana através técnica de CIM automatizada (Sensititre- Thermo Scientific®), os isolados foram semeados no ágar TSA, e incubados por 24 horas a 37°C . Posteriormente foi adicionado em um tubo de ensaio contendo água peptonada suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland. Os tubos de ensaio contendo os isolados foram colocados no aparelho Sensititre- Thermo Scientific® para a distribuição nos poços da placa contendo antibióticos direcionados para detecção de suscetibilidade para cepas de *S. aureus* (clorafenicol, ciprofloxacina, eritromicina, linezolda, nitrofurantonina, penicilina, eritromicina, daptomicina, tetraciclina, quinopristina e vancomicina). Após o preenchimento da placa esta foi incubada por 24 horas a 37°C . A leitura da placa foi realizada através do Sensititre- Thermo Scientific®.

4.6. Detecção genotípica de cepas MRSA

Apesar dos isolados serem classificados como MSSA através da técnica fenotípica, estes foram submetidos à detecção das variantes do gene *mec* (A, C e bovino) foi executada através da técnica de PCR simples nos 17 isolados selecionados após a realização da técnica de tipagem PFGE (quadro 4).

As concentrações utilizadas para amplificação dos genes foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl_2 - Invitrogen®), 0,3 μM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), água ultrapura para completar um volume total de reação (20 μL) e 2 μL do DNA total.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 50 min.) e revelados com corante SYBR *Green* I (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência a meticilina de *Staphylococcus aureus*

Gene	Sequência do Iniciador (5' -3')	Ciclo	Referência
<i>mecA</i> (533 pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	94 °C 4 min (94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 4 min.	MURAKA MI <i>et al.</i> 1991
<i>mecC</i> (718pb)	GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC CCT GAA TC[W] GCT AAT AAT ATT TC	94°C 15 min (94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 1 min.) 30x72°C 10 min.	STEGGER <i>et al.</i> , 2011
<i>mec</i> bovino (<i>mecsciuri</i> interno) (809pb)	CAG GCA TGC AGA AAA ATC AA TTG AGT CGA ACC AGG TGA TG	(94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min	MELO <i>et al.</i> , 2013

4.7. Detecção fenotípica da produção de biofilme

Os 17 isolados selecionados após a realização da técnica de tipagem PFGE foram submetidos à detecção fenotípica da produção de biofilme. A formação do biofilme em microplaca foi avaliada qualitativamente e quantitativamente através de metodologia descrita por Marques *et al.* (2013). Todos os 17 isolados foram repicados em ágar sangue de carneiro (AS) por 24 h a 35°C e as colônias crescidas foram inoculadas em ágar BHI e também incubadas a 35°C por 24 h. As culturas bacterianas foram ajustadas a escala 0,5 de McFarland e diluídas 1:10 em caldo TSA com adição de 0,24% de glicose. Alíquotas de 200µL desta suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços e incubadas por 24 h à 35°C sem agitação. Após incubação, este material foi desprezado e os poços foram lavados 2 vezes com 200µL de solução salina estéril, secos em estufa à 65°C por 1h e corado com 200µL de safranina 1% por 15 min. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 490 nm em leitor de ELISA (BIO RAD MODEL 680). Poços não inoculados contendo caldo TSA com 0,24% de glicose serviram como branco. Os testes foram realizados em triplicata. As cepas foram classificadas quanto à intensidade de formação de biofilme de acordo com os seguintes valores médios de OD obtidos: forte ≥ 0.3 ; moderado ≥ 0.2 e <0.3 e fraco ≥ 0.1 e <0.2 .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Os 53 isolados identificados pelas análises fenotípicas e confirmados pela técnica de MALDI-TOF como *Staphylococcus aureus* amplificaram fragmentos de tamanho compatíveis com o esperado para o gene *coa* e fragmentos de 279 pb compatível com a presença do gene *nuc*, confirmando a sua identificação (Figura 1).

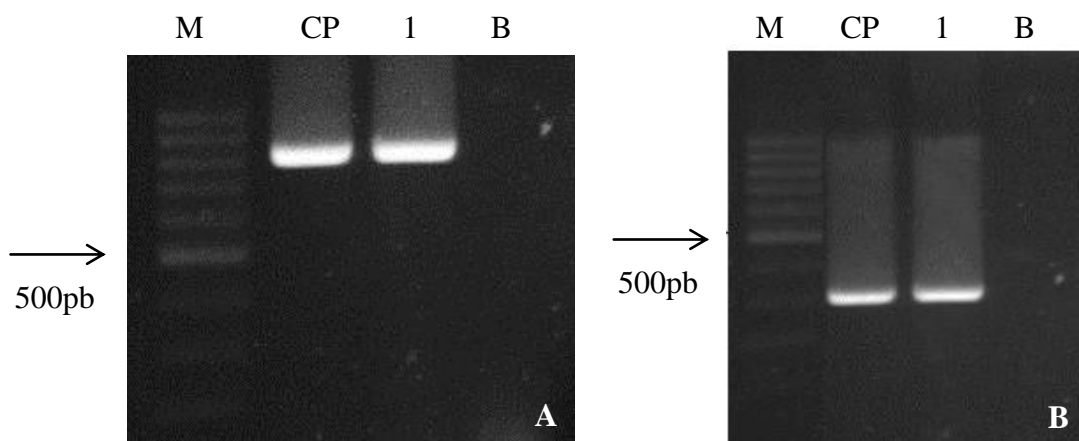


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do produto de amplificação do gene *coa* e *nuc* para identificação do *Staphylococcus aureus*. (A) *coa* (variável pb) M: marcador de peso molecular (100pb), CP: controle positivo (600pb), B: branco e 1: Isolado positivo (800pb); (B) *nuc* de *S. aureus* (279 pb) M: marcador de tamanho molecular (100pb), CP: controle positivo, B: branco e 1: Isolado positivo.

5.2 Análise dos fatores de colonização e virulência de *Staphylococcus aureus*

Todas as 53 cepas foram submetidas à avaliação genotípica para a detecção do perfil de virulência (Tabela 1).

A capacidade de *S. aureus* de produzir biofilme é considerada como um importante fator de virulência capaz de influenciar a patogênese da mastite. O biofilme auxilia na adesão e na colonização do organismo no epitélio da glândula mamária. A implicação do biofilme em infecções e resistência às drogas tem levado a um crescente interesse na caracterização dos genes envolvidos na formação de biofilme. Um único locus tem sido detectado na maioria dos isolados de *S. aureus* de origem mastítico, indicando o seu papel potencial como um fator de virulência na patogênese da mastite em ruminantes (CUCARELLA *et al.*, 2004). Através do resultado obtido neste estudo foi possível detectar que a maioria dos isolados de *S. aureus* possuem a capacidade genética para produzir biofilme, visto que a maioria das cepas testadas foram positivas para o gene *icaD* (83% - 44/53) e 58,5% (31/53) das cepas testadas foram positivas para o gene *icaA*. Melo e colaboradores (2013) ressaltam que a presença do gene *icaA* está ligada com a secreção do polissacarídeo extracelular (PIA), adicionalmente afirmam que a presença de ambos os genes expressam a produção do biofilme. Esse resultado é corroborado por estudos de Ote e colaboradores na Bélgica (2011), em que 229 isolados de *S. aureus*, 86,9 % tinha o gene *icaA* e 95% dos isolados testados eram positivos para o locus *icaD*. Estes dados ressaltam a importância do biofilme na patogênese da mastite. Além disso, 13,2% (7/53) dos isolados foram negativos para ambos os genes, o que pode ocasionar numa forma de mastite de fácil tratamento. No entanto, segundo Cucarella e colaboradores (2004), a

ausência dos genes *icaA* e *icaD* não implica necessariamente em ausência de produção do biofilme, que pode ser expressa também através do gene *bap*, não avaliado neste estudo.

Proteínas ligantes a fibronectina (FBN) A e B de *S. aureus* são multifuncionais MSCRAMMs que reconhecem fibronectina, elastina e fibrinogênio. A FBN promove a internalização de *S. aureus* em células epiteliais e endoteliais que não são normalmente fagocíticas. Isto pode promover a disseminação de bactérias a partir da corrente sanguínea para órgãos internos e a evasão da resposta imune e da ação dos antibióticos. FBNA e FBNB são codificados por dois genes estreitamente ligados, mas transcritos separadamente, *fbnA* e *fbnB* (BURKE *et al.*, 2010). Quanto à detecção dos genes responsáveis pela produção da proteína ligante ao fibrinogênio, 66% (35/53) dos isolados foram positivos para o gene *fbnA* e 26,4% (14/53) dos isolados foram positivos para o gene *fbnB*. Além disso, 18,8% (10/55) foram negativos para ambos os genes. Estudos anteriores demonstram que a distribuição de *fbnA* e *fbnB* variam amplamente (SALASIA *et al.*, 2004).

O polissacarídeo capsular auxilia na camuflagem da bactéria à opsonina adquirida naturalmente do soro bovino, o que resulta num aumento da resistência à fagocitose por leucócitos polimorfonucleares (O'RIORDAN & LEE, 2004). Quanto à detecção dos genes responsáveis pela formação da cápsula bacteriana 0% das cepas foram positivas para o gene *cap5* e apenas 3,7% (2/53) das cepas foram positivas para o gene *cap8*. A maioria das cepas (96,2% - 51/53) foi negativa para ambos os genes. A ocorrência dos genes *cap5* ou *cap8* varia em cada região geográfica. Além disso, as cepas de *S. aureus* podem não exibir cápsula ou podem produzir um tipo heterólogo de cápsula (COCCHIARO *et al.*, 2006).

A maioria das cepas de *S. aureus* produzem α - e β -hemolisinas. Estas exotoxinas formadoras de poros podem induzir mudanças inflamatórias em células de mamíferos, inativando o sistema imunológico, seu efeito citotóxico direto degrada os tecidos, proporcionando as bactérias nutrientes e facilitando sua dispersão para novos locais (HAVERI *et al.*, 2007). Quanto à detecção dos genes responsáveis pela produção das hemolisinas α e β , 92,4% (49/53) das cepas foram positivas para o gene *hla* e 84,9% (45/53) dos isolados foram positivas para o gene *hlb*. Apenas 5,7% (3/53) das cepas foram negativas para ambos os genes.

Tabela 1. Origens, perfis de amplificação de genes de virulência das 53 cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.

Cepas	Animal	Fazenda	Município	<i>fbn</i> <i>B</i>	<i>fbnA</i>	<i>cap</i> <i>5</i>	<i>cap</i> <i>8</i>	<i>hIA</i>	<i>hIB</i>	<i>ica</i> <i>A</i>	<i>ica</i> <i>D</i>	Perfil
32	654	A	Barra do Pirai	+	-	-	-	-	-	-	-	6
36	564	A	Barra do Pirai	-	-	-	-	+	+	-	+	18
37	564	A	Barra do Pirai	-	+	-	-	+	+	+	+	9
47	363	A	Barra do Pirai	-	-	-	-	+	+	-	-	17
54	369	A	Barra do Pirai	-	-	-	-	+	+	-	-	17
76	614	A	Barra do Pirai	-	-	-	-	+	-	-	-	15
106	3	B	Seropedica	-	-	-	-	+	+	-	-	17
348	Estiva	C	Passa tres	-	+	-	-	+	+	+	+	9
352	Estiva	C	Passa tres	-	+	-	-	+	+	+	+	9
360	Serena	C	Passa tres	-	+	-	-	+	+	+	+	9
370	Sereia	C	Passa tres	-	-	-	-	+	+	-	-	17
153	Cerveja	D	Rio das Flores	-	-	-	-	-	+	-	+	13
157	Cerveja	D	Rio das Flores	-	+	-	-	+	+	-	-	10
160	77	D	Rio das Flores	+	+	-	-	+	+	-	+	3
162	77	D	Rio das Flores	-	+	-	-	+	+	-	+	11
172	Dinamarca	D	Rio das Flores	-	+	-	-	+	+	-	+	11
183	Betuna	D	Rio das Flores	-	+	-	-	+	+	+	+	9
189	Betuna	D	Rio das Flores	-	+	-	+	+	+	+	-	8
192	9052	D	Rio das Flores	-	+	-	-	+	+	+	+	9
208	1110 (39933)	E	Carmo	+	+	-	-	+	+	+	+	1
225	57	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
235	551	E	Carmo	+	-	-	-	-	-	-	+	7
237	551	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
240	551	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
241	551	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
247	883	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
253	883	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
255	883	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
261	518	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
262	518	E	Carmo	+	-	-	-	+	+	-	+	5
264	518	E	Carmo	+	+	-	-	+	+	+	+	1
265	518	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
281	219	E	Carmo	+	-	-	-	+	+	-	+	5

295	858 (30976)	E	Carmo	-	-	-	-	+	-	-	+	14
300	391	E	Carmo	+	-	-	-	-	-	-	+	7
310	872	E	Carmo	+	+	-	-	+	+	+	+	1
311	683	E	Carmo	+	-	-	-	+	+	+	+	4
322	Abeia	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	9
323	Abeia	E	Carmo	+	+	-	-	+	+	+	+	1
325	Abeia	E	Carmo	-	+	-	-	+	-	-	+	12
327	Abeia	E	Carmo	+	-	-	-	+	+	+	+	4
331	Pintura	F	Vassouras	-	+	-	-	+	-	-	+	12
333	Pintura	F	Vassouras	-	-	-	-	+	+	+	+	16
336	Pintura	F	Vassouras	+	+	-	-	+	-	-	+	2
337	Pintura	F	Vassouras	-	+	-	-	+	+	+	+	9
338	Germana	F	Vassouras	+	-	-	-	+	+	+	+	4
339	Germana	F	Vassouras	-	-	-	-	+	+	+	+	16
340	Germana	F	Vassouras	-	+	-	-	+	+	-	+	11
341	Germana	F	Vassouras	-	+	-	-	+	+	+	+	9
345	Defesa	F	Vassouras	-	+	-	-	+	+	-	+	11
115	Querida	G	Paraíba do Sul	-	+	-	-	+	+	+	+	9
126	Olivia	G	Paraíba do Sul	-	+	-	-	+	+	+	+	9
137	Olivia	G	Paraíba do Sul	-	+	-	+	+	+	+	-	8

A partir dos resultados obtidos nos testes genotípicos dos fatores de virulência foi possível estabelecer 18 diferentes perfis (Tabela 2). O perfil prevalente foi o perfil 9 (37,7%- 20/53) encontrado em seis propriedades diferentes, sendo prevalente (18,8%- 10/53) na fazenda E. O perfil de maior potencial virulento foi o perfil 8 (3,7%- 2/53) o qual foi positivo para pelo menos um de cada gene, tendo sido encontrado nas fazendas D e G.

Tabela 2. Perfil de virulência formado através da detecção dos genes de virulência das 53 cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.

<i>fbnB</i>	<i>fbnA</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>hla</i>	<i>hIb</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	Perfil	Prevalência
+	+	-	-	+	+	+	+	1	7,5% (4/53)
+	+	-	-	+	-	-	+	2	1,9% (1/53)
+	+	-	-	+	+	-	+	3	1,9% (1/53)
+	-	-	-	+	+	+	+	4	5,6% (3/53)
+	-	-	-	+	+	-	+	5	3,8%(2/53)
+	-	-	-	-	-	-	-	6	1,9% (1/53)
+	-	-	-	-	-	-	+	7	3,8%(2/53)
-	+	-	+	+	+	+	-	8	3,8%(2/53)
-	+	-	-	+	+	+	+	9	37,7% (20/53)
-	+	-	-	+	+	-	-	10	1,9% (1/53)
-	+	-	-	+	+	-	+	11	7,5% (4/53)
-	+	-	-	+	-	-	+	12	3,8%(2/53)
-	-	-	-	-	+	-	+	13	1,9% (1/53)
-	-	-	-	+	-	-	+	14	1,9% (1/53)
-	-	-	-	+	-	-	-	15	1,9% (1/53)
-	-	-	-	+	+	+	+	16	3,8%(2/53)
-	-	-	-	+	+	-	-	17	7,5% (4/53)
-	-	-	-	+	+	-	+	18	1,9% (1/53)

5.2.1. Detecção fenotípica e genotípica da formação de biofilme

A capacidade das cepas de *S. aureus* em formar biofilme auxilia a bactéria a sobreviver em ambientes adversos no hospedeiro e está implicada nas infecções crônicas e persistentes como a mastite bovina subclínica (SALIMENA *et al.*, 2016)

Apesar da maioria das cepas estudadas ser considerada fenotipicamente como fraca formador de biofilme, foi possível detectar genes relacionados a sua produção (Tabela 3). De acordo com Vasudevan e colaboradores (2003) os genes *icaA* e *D* estão bastante presentes isolados de mastite bovina e sua presença nem sempre está acompanhada da expressão fenotípica *in vitro*. A técnica de detecção de biofilme em microplaca é considerada a melhor técnica para a detecção fenotípica e possui a melhor correlação com a detecção genotípica (RAZA *et al.*, 2013).

Tabela 3. Detecção da produção de biofilme fenotípica e genotípica das 17 cepas de *Staphylococcus aureus* selecionadas de acordo com o perfil obtido através da técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado).

Cepas	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	Placa
47	-	-	Fraca
54	-	-	Fraca
76	-	-	Fraca
208	+	+	Fraca
225	+	+	Fraca
241	+	+	Fraca
262	-	+	Fraca
281	-	+	Forte
295	-	+	Fraca
300	-	-	Fraca
310	+	+	Moderada
311	+	+	Fraca
325	-	+	Moderada
336	-	+	Moderada
338	+	+	Moderada
339	+	+	Fraca
360	+	+	Fraca

5.3 Técnicas de Tipagem

5.3.1 Tipagem de *S. aureus* através do sistema *agr*

Todos as 53 cepas foram tipificados através do sistema *agr* (Tabela 4). De acordo com a literatura, o *agr* grupo I é o grupo prevalente em cepas oriundas de mastite bovina e é associado com a persistência ou com características que auxiliam as bactérias a persistir no úbere, além de estar associado com a resistência a penicilina (MELCHIOR *et al.*, 2011). Porém, no presente estudo, a maioria das cepas (67,9%- 36/53) foi classificada como pertencentes ao grupo II. Este resultado foi similar ao encontrado por Fabres-Klein e colaboradores (2015) que também detectaram prevalência do *agr* do grupo II ao analisar *S. aureus* oriundos de mastite bovina no Brasil. Melchior e colaboradores (2009) relatam que cepas *agr* do grupo II produzem mais biofilme em soro de leite do que as cepas *agr* do grupo I e sugeriram implicações clínicas para essas observações, tais como a adaptação de *agr* do grupo II ao nicho extracelular. Cabe ressaltar que 32,1% (17/53) das cepas foram classificadas como não tipáveis. Estes dados corroboram com estudos de Marques e colaboradores (2017).

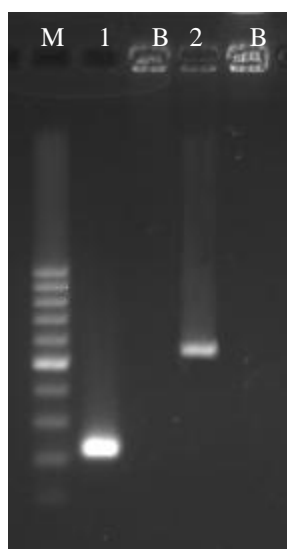


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR dos genes *agr* (*RNA III*) (200 pb) e *agr II* (572 pb). M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Thermo Scientific), B: branco, 1: produto de amplificação do gene *agr* (*RNA III*), 2: produto de amplificação do gene *agr II*.

Tabela 4. Origens e tipagem pelo *agr* das 53 cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.

Cepas	Animal	Fazenda	Município	agr
32	654	A	Barra do Pirai	NT
36	564	A	Barra do Pirai	NT
37	564	A	Barra do Pirai	2
47	363	A	Barra do Pirai	NT
54	369	A	Barra do Pirai	NT
76	614	A	Barra do Pirai	NT
106	3	B	Seropedica	NT
348	Estiva	C	Passa tres	2
352	Estiva	C	Passa tres	2
360	Serena	C	Passa tres	2
370	Sereia	C	Passa tres	2
153	Cerveja	D	Rio das Flores	NT
157	Cerveja	D	Rio das Flores	NT
160	77	D	Rio das Flores	2
162	77	D	Rio das Flores	NT
172	Dinamarca	D	Rio das Flores	NT
183	Betuna	D	Rio das Flores	2
189	Betuna	D	Rio das Flores	2
192	9052	D	Rio das Flores	NT
208	1110 (39933)	E	Carmo	2
225	57	E	Carmo	2
235	551	E	Carmo	2
237	551	E	Carmo	2
240	551	E	Carmo	2
241	551	E	Carmo	2
247	883	E	Carmo	NT
253	883	E	Carmo	2
255	883	E	Carmo	2
261	518	E	Carmo	2
262	518	E	Carmo	2
264	518	E	Carmo	2
265	518	E	Carmo	2
281	219	E	Carmo	NT

295	858 (30976)	E	Carmo	NT
300	391	E	Carmo	NT
310	872	E	Carmo	2
311	683	E	Carmo	NT
322	Abeia	E	Carmo	2
323	Abeia	E	Carmo	2
325	Abeia	E	Carmo	2
327	Abeia	E	Carmo	2
331	Pintura	F	Vassouras	NT
333	Pintura	F	Vassouras	2
336	Pintura	F	Vassouras	2
337	Pintura	F	Vassouras	2
338	Germana	F	Vassouras	2
339	Germana	F	Vassouras	2
340	Germana	F	Vassouras	2
341	Germana	F	Vassouras	2
345	Defesa	F	Vassouras	2
115	Querida	G	Paraíba do Sul	2
126	Olivia	G	Paraíba do Sul	2
137	Olivia	G	Paraíba do Sul	2

5.3.3 Tipagem do *spa*

Através da tipagem do gene *spa* foi possível detectar 12 diferentes tipos de *spa* nos 53 isolados testados (Tabela 5 e Tabela 6). O *spa* tipo 605 foi o mais prevalente (54,8%- 29/53), sendo encontrado em quatro fazendas diferentes. Em seguida o *spa* tipo 693 (20,8%- 11/53) foi encontrado em todas as fazendas.

O *spa* tipo 605 já foi relacionado em diversos estudos com a mastite bovina (SAKWINSKA *et al.*, 2011; GUINANE *et al.*, 2010). Este tipo de *spa* já foi relatado como cepa causadora de mastite bovina no estado do Rio de Janeiro, além disso, este tipo de *spa* é frequentemente relacionado com o ST126 (AIRES-DE-SOUSA *et al.*, 2007; RABELLO *et al.*, 2007).

O *spa* tipo 693 não está relacionado com nenhum ST específico (LARSEN *et al.*, 2008). Este tipo de *spa* é encontrado com frequência em humanos e em suínos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015; PORRERO *et al.*, 2012). Podemos considerar que a ampla disseminação observada está relacionada a falhas no manejo higiênico-sanitário dos ordenhadores e tratadores.

Tabela 5. Origens e tipagem através da amplificação e seqüenciamento do gene *spa* das 53 cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro.

Cepas	Animal	Fazenda	Município	<i>spa</i>
32	654	A	Barra do Pirai	t693
36	564	A	Barra do Pirai	t693
37	564	A	Barra do Pirai	t605
47	363	A	Barra do Pirai	693
54	369	A	Barra do Pirai	t605
76	614	A	Barra do Pirai	t359
106	3	B	Seropédica	t127
348	Estiva	C	Passa tres	t693
352	Estiva	C	Passa tres	t283
360	Serena	C	Passa tres	t432
370	Sereia	C	Passa tres	t693
153	Cerveja	D	Rio das Flores	t693
157	Cerveja	D	Rio das Flores	t605
160	77	D	Rio das Flores	t605
162	77	D	Rio das Flores	t605
172	Dinamarca	D	Rio das Flores	t605
183	Betuna	D	Rio das Flores	t605
189	Betuna	D	Rio das Flores	t342
192	9052	D	Rio das Flores	t605
208	1110 (39933)	E	Carmo	t605
225	57	E	Carmo	t605
235	551	E	Carmo	t605
237	551	E	Carmo	t605
240	551	E	Carmo	t693
241	551	E	Carmo	t605
247	883	E	Carmo	t605
253	883	E	Carmo	t693
255	883	E	Carmo	t23
261	518	E	Carmo	t605
262	518	E	Carmo	t605
264	518	E	Carmo	t605
265	518	E	Carmo	t605

281	219	E	Carmo	t23
295	858 (30976)	E	Carmo	t17
300	391	E	Carmo	t10
310	872	E	Carmo	t359
311	683	E	Carmo	t23
322	Abeia	E	Carmo	t605
323	Abeia	E	Carmo	t605
325	Abeia	E	Carmo	t605
327	Abeia	E	Carmo	t605
331	Pintura	F	Vassouras	t605
333	Pintura	F	Vassouras	t605
336	Pintura	F	Vassouras	t605
337	Pintura	F	Vassouras	t605
338	Germana	F	Vassouras	t605
339	Germana	F	Vassouras	t605
340	Germana	F	Vassouras	t693
341	Germana	F	Vassouras	t187
345	Defesa	F	Vassouras	t605
115	Querida	G	Paraíba do Sul	t693
126	Olivia	G	Paraíba do Sul	t693
137	Olivia	G	Paraíba do Sul	t189

Tabela 6. Detecção e distribuição de *spa*- tipo das 53 cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro. *Staphylococcus aureus*.

<i>spa</i> Tipo	Frequência	Fazendas
t10	1,9% (1/53)	E
t17	1,9% (1/53)	E
t23	5,7% (3/53)	E
t127	1,9% (1/53)	B
t187	1,9% (1/53)	F
t189	1,9% (1/53)	G
t283	1,9% (1/53)	C
t342	1,9% (1/53)	D
t359	3,8% (2/53)	A/E
t432	1,9% (1/53)	C
t605	54,8% (29/53)	A/D/E/F
t693	20,8% (11/53)	A/C/D/E/F/G

5.3.4 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE)

Todas as 33 cepas foram submetidas a tipagem através da técnica de PFGE, destas 4 cepas não cortaram com a enzima *Sma*I e 12 cepas apresentaram baixa intensidade de bandas

e por este motivo não foram incluídas para análise. Através da técnica de PFGE foi possível observar grande heterogeneidade genética dos isolados selecionados (Tabela 7; Figura 4).

As cepas 208 e 225 são intimamente relacionadas já que diferem em apenas um fragmento o que poderia ser ocasionado por uma pequena mutação ou pela presença de elementos móveis genéticos. Além disso, ambas as cepas são da fazenda E, e compartilham o mesmo ST 126, tipo de spa 605 e classificação do grupo 2 agr, porém foram isolados de animais diferentes e possuem diferentes perfis de virulência e suscetibilidade.

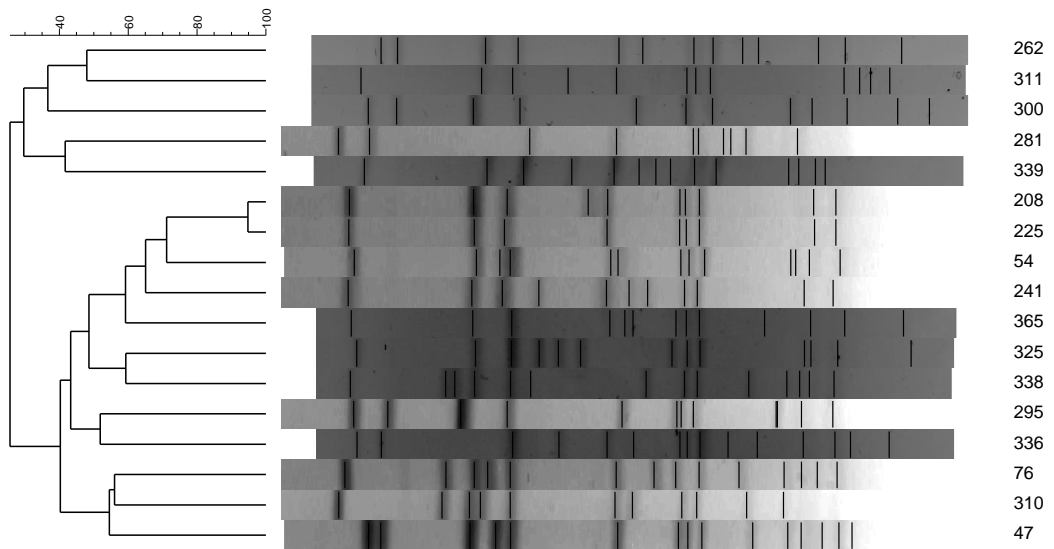


Figura 4. Dendrograma de similaridade gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) através do método de agrupamento Dice, Bionumerics.

Tabela 7. Origens e agrupamentos das 17 cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro, gerados a partir da utilização da técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado).

Cepas	Animal	Fazenda	Município	Grupos
262	518	E	Carmo	I
311	683	E	Carmo	II
300	391	E	Carmo	III
281	219	E	Carmo	IV
339	Germana	F	Vassouras	V
	1110			
208	(39933)	E	Carmo	VI
225	57	E	Carmo	VII
			Barra do	
54	369	A	Pirai	VIII
241	551	E	Carmo	IX
365	Serena	C	Passa três	X
325	Abeia	E	Carmo	XI
338	Germana	F	Vassouras	XII
	858			
295	(30976)	E	Carmo	XIII
336	Pintura	F	Vassouras	XIV
			Barra do	
76	614	A	Pirai	XV
310	872	E	Carmo	XVI
			Barra do	
47	363	A	Pirai	XII

Estudos anteriores realizados por nosso laboratório em propriedades diferentes do presente estudo apresentaram resultados similares, elevada heterogeneidade genética e ausência de cepas clonais (MARQUES *et al.*, 2013). Rabello e colaboradores (2007) também detectaram resultados similares ao utilizar a mesma técnica em isolados de *S. aureus* também do estado do Rio de Janeiro. Uma possível explicação para a elevada heterogeneidade genética das cepas de *S. aureus* em propriedades do estado do Rio de Janeiro pode ser explicada pelo fato de que a produção é realizada em pequenas propriedades com características distintas como tipo de ordenha e raça dos animais. Esta elevada heterogeneidade também implicaria na dificuldade de se obter medidas profiláticas efetivas.

5.3.5 Tipagem da Sequência Multilocus (*Multilocus Sequence Typing*- MLST)

Através da tipagem pela técnica MLST foi possível detectar cinco tipos diferentes de ST/CC (Tabela 8). Também pode-se observar que a maioria das cepas (64,7%- 11/17) são pertencente ao ST/CC 126 e este se encontra distribuído em três diferentes propriedades, com maior frequência na fazenda E.

O ST 126 já foi relacionado em diversos estudos com a mastite bovina (SAKWINSKA *et al.*, 2011; GUINANE *et al.*, 2010). Este tipo de ST já foi relatado como cepa causadora de mastite bovina no estado do Rio de Janeiro (AIRES-DE-SOUSA *et al.*, 2007; RABELLO *et al.*, 2007). Em um estudo realizado por Smyth e colaboradores (2009) mostrou que cepas

relacionadas ao ST 126 normalmente são associadas ao *agr* grupo 2 e ao *spa* tipo t605 esse mesmo resultado foi apresentado na maioria dos isolados relacionados ao ST126.

O ST 97 também já foi detectado em estudos anteriores com mastite bovina no estado do Rio de Janeiro (RABELLO *et al.*, 2007). Este tipo de ST 97 está amplamente distribuído em vários países do mundo, além de ser relacionado com cepas LA-MRSA e também já ter sido detectado como agente causador de mastite bovina (MEEMKEN *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2005)

Tabela 8. Origens e perfil alélico gerado através da técnica de MLST (Tipagem da Sequência Multilocus) das 17 cepas de *Staphylococcus aureus* selecionadas de acordo com o perfil obtido através da técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado).

Cepa	Animal	Fazenda	Município	<i>arc</i>	<i>aro</i>	<i>glp</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqi</i>	ST/CC
47	363	A	Barra do Pirai	159	1	1	1	1	8	3	CC97
54	369	A	Barra do Pirai	346	1	1	1	1	5	3	ST3087
76	614	A	Barra do Pirai	3	68	1	4	1	5	40	ST126
208	1110 (39933)	E	Carmo	3	68	1	4	1	5	40	ST126
225	57	E	Carmo	240	68	1	4	1	5	40	CC126
241	551	E	Carmo	3	68	1	4	1	5	40	ST126
262	518	E	Carmo	217	68	1	4	1	5	40	CC126
281	219	E	Carmo	3	3	1	1	1	5	96	ST747
295	858 (30976)	E	Carmo	1	4	1	4	12	1	10	ST5
300	391	E	Carmo	1	4	1	4	12	1	10	ST 5
310	872	E	Carmo	3	68	1	4	1	5	40	ST126
311	683	E	Carmo	3	68	1	4	1	5	40	ST126
325	ABEIA	E	Carmo	3	68	1	4	1	5	40	ST126
336	PINTURA	F	Vassouras	3	68	1	4	1	5	40	ST126
338	GERMANA	F	Vassouras	3	68	1	4	1	5	40	ST126
339	GERMANA	F	Vassouras	3	68	1	4	1	5	40	ST126
365	SERENA	C	Passa três	3	68	1	4	34	5	40	CC126

Vale à pena destacar a presença do ST5 que normalmente está relacionado com cepas de origem em humanos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014; GONZALEZ *et al.*, 2006). Porém este ST também já foi detectado como cepa causadora de mastite bovina no estado do Rio de Janeiro em estudos anteriores (AIRES-DE-SOUSA *et al.*, 2007; RABELLO *et al.*, 2007). A presença desta cepa levanta a questão da transmissão de cepas entre homem-animal o que mais uma vez aponta para falhas no manejo higiênico-sanitário do ordenhador (LOWDER *et al.*, 2009).

5.3.7 Análise comparativa dos perfis genéticos gerados pelas diferentes técnicas de tipagem molecular

Para a análise comparativa das técnicas, foram selecionadas as 17 cepas utilizadas nas técnicas de MLST e PFGE (Tabela 9).

O agrupamento das cepas de acordo com o perfil de distribuição dos genes de virulência produziu 11 perfis distintos. O perfil 1 foi detectado em duas fazendas diferentes e são pertencentes a diferentes grupos do PFGE (2.1 e 2.2), diferentes tipos de *spa* e diferentes suscetibilidades a eritromicina e a penicilina, porém compartilham o mesmo grupo do *agr* (*agr* grupo II) e ao mesmo ST (126). O perfil 3 foi detectado em duas fazendas diferentes e são pertencentes a diferentes grupos do PFGE (1 e 2.1), diferentes grupos do *agr*, diferentes tipos de *spa* e diferente suscetibilidade a penicilina, porém compartilham mesmo ST (126). O perfil 4 foi detectado em uma fazenda e são pertencentes a diferentes grupos do *agr*, diferentes tipos de *spa*, diferentes STs e diferentes suscetibilidades a ciprofloxacina e eritromicina, porém compartilham o mesmo grupo do PFGE (1). O perfil 6 foi detectado em duas fazendas diferentes e são pertencentes a diferentes tipos de *spa* e a diferentes STs porém compartilham o mesmo grupo do PFGE (2.1), o mesmo grupo do *agr* (*agr* grupo II), e a mesmo perfil de suscetibilidade antimicrobiano. O perfil 11 foi detectado em uma fazenda e são pertencentes a diferentes grupos do PFGE, diferentes tipos de *spa*, diferentes STs e diferentes suscetibilidades a eritromicina e penicilina, porém compartilham o mesmo grupo do *agr* (*agr* grupo II). Vale a pena destacar que o fato de que a maioria das cepas que compartilham o mesmo perfil de virulência e não compartilham o mesmo “tipo” através das outras técnicas já foi relatado por Melles e colaboradores (2004) em um estudo sobre dinâmica populacional e expansão de clones patogênicos de *S. aureus* no qual sugeriram que nem todas as cepas clonais de *S. aureus* compartilham os mesmos fatores de virulência devido ao fato que as cepas podem estar sobre diferentes pressão ambiental.

Quanto ao agrupamento pelo *agr*, o *agr* grupo II foi encontrado em três fazendas, este grupo compartilha o mesmo CC (126), porém difere no perfil de virulência, no grupo do PFGE, no tipo de *spa*, e na suscetibilidade a eritromicina e penicilina. As cepas que foram classificadas como NT foi detectado em duas fazendas e apresentaram diferenças em todas as análises, a saber, diferentes perfis de virulência, diferentes tipos de *spa*, diferentes STs e diferente suscetibilidade a ciprofloxacina, eritromicina e penicilina.

Quanto a tipagem do *spa* foram detectados 7 diferentes tipos. O tipo de *spa* t23 foi encontrado em uma fazenda, e compartilha o mesmo grupo do *agr* (NT) estes diferem em perfil de virulência, STs, suscetibilidade a ciprofloxacina e eritromicina. O tipo de *spa* t359 foi encontrado em duas fazendas, e compartilha o mesmo ST(126) e o mesmo grupo do PFGE (2.2) estes diferem em perfil de virulência, grupo do *agr*, suscetibilidade a eritromicina e penicilina. O tipo de *spa* t605 foi encontrado em três fazendas, e diferem no perfil de virulência, grupo do *agr*, grupo do PFGE, STs e suscetibilidade a eritromicina e penicilina. A caracterização genotípica baseada na investigação de um locus da região de repetição tandem altamente variável do gene *spa* é outra ferramenta bem-sucedida para a caracterização genotípica de *S. aureus*. A tipagem do gene *spa* também leva em conta a recombinação de eventos da região X. Uma vez que a recombinação ocorre com mais frequência dentro desta região, este método de tipagem fornece mais tipos (*spa*) do que MLST. Embora a tipagem do *spa* e o MLST são normalmente concordantes e permitem uma classificação semelhante para genótipos distintos, também existem vários casos de erros de classificação pela técnica de tipagem do *spa* o qual muito provavelmente são causados por eventos de recombinação. Assim, tipagem do *spa* é um método útil para obter informações sobre o genótipo das cepas porém não deve substituir a técnica de MLST (STROMMINGER *et al.*, 2008).

Quanto à detecção de STs pela técnica do MLST, foram detectados cinco tipos diferentes de STs (CC). O CC126 foi encontrado em três fazendas e diferem no perfil de virulência, grupo do *agr*, grupo do PFGE, tipo de *spa* e suscetibilidade a eritromicina e penicilina. O CC97 foi encontrado em duas fazendas e diferem no perfil de virulência, grupo do *agr*, grupo do PFGE, tipo de *spa* e suscetibilidade a eritromicina. O ST5 foi encontrado em uma fazenda e compartilham o mesmo grupo do *agr* (NT) e o mesmo perfil de suscetibilidade e diferem no perfil de virulência, grupo do PFGE e tipo de *spa*. De acordo com a técnica de MLST, um clone é definido com base no tipo de sequência, portanto um isolado é definido como clone caso compartilhe o mesmo ST. Esta definição de clones através da técnica de MLST é muito útil para investigar a história evolutiva das bactérias, porém pode levar ao pensamento errôneo em relação ao termo "clone" uma vez que clone é definido como isolados bacterianos com genótipos indistinguíveis. No entanto, no caso das bactérias não é possível definir clones com base nessa definição, uma vez que as taxas elevadas de mutação e recombinação, assim como o ganho ou a perda de elementos móveis genéticos podem levar (dependendo da espécie) a um genoma bacteriano altamente variável. A diversificação permanente do genoma ancestral resulta em um conjunto de genótipos cada vez mais diverso.

No entanto, a técnica de tipagem MLST, fornece um método eficiente para identificar linhagens genéticas que compartilham o mesmo antepassado. Com base nesta definição, os clones (MLST) incluem isolados com o mesmo tipo de sequência, mas não são necessariamente geneticamente idênticos (SPRAT, 2004).

A técnica de PFGE gerou perfis bastantes distintos evidenciando a heterogenicidade das cepas estudadas. Com isso não foi possível formar agrupamentos de cepas idênticas através desta técnica, no entanto, a técnica demonstrou que as cepas 208(VI) e 225 (VII) eram intimamente relacionadas. Este fato foi corroborado pelas outras técnicas de tipagem, já que estas cepas apresentaram o mesmo grupo de *agr* (*agr* grupo II), o mesmo CC (CC126) e o mesmo tipo de *spa* (t605), tendo sido apresentada diferença apenas em uma análise genética de virulência (*fbnB*) e na suscetibilidade a penicilina. Características que podem ser adquiridas ou perdidas de acordo com a pressão de seleção do ambiente em que a bactéria se encontra. Em comparação com os resultados do MLST, esta técnica permite detectar alterações genômicas mais frequentes. Assim, através da técnica de PFGE é possível mostrar a diversidade das cepas de *S. aureus* que partilham o mesmo tipo de sequência e, portanto, provar que os clones com base na definição de acordo com a técnica de MLST não são necessariamente geneticamente idênticos (MURCHAN *et al.*, 2003)

As técnicas PFGE e MLST consideradas como os melhores métodos para a tipagem molecular de *S. aureus* não tiveram uma boa correlação, porém quando combinadas pode-se obter uma visão global da população de *S.aureus* presentes nos rebanhos. Frente aos resultados apresentados conclui-se que a escolha do método de tipagem depende do tipo de estudo epidemiológico que se deseja realizar, porém deve-se ressaltar que para a realização do estudo deve-se combinar as técnicas de tipagem.

Embora haja muito a se investigar e compreender sobre recombinação em *S. aureus* parece claro que ela ocorre com frequência suficiente para ser detectável, mas não com frequência suficiente para destruir os sinais verticais ou clonais. A compreensão do modo como a mistura de processos horizontais e verticais de evolução clonal contribui para a estruturação e evolução desta espécie é um objetivo a ser alcançado, e técnicas como o Sequenciamento do Genoma Total (WGS) poderão trazer luz sobre estes aspectos. Entretanto, para que estes estudos sejam balizados de modo fidedigno, os vieses epidemiológicos e clínicos precisam ser eliminados. Atualmente, a maioria dos estudos filogenômicos em *S. aureus* foram constituídos por amostragens relacionadas aos complexos clonais de interesse médico, o que dificulta uma visão evolucionária destas transformações (PLANET *et al.* 2016). Com relação a isolados proveniente de produção animal, em especial de origem bovina, estes

estudos ainda são incipientes e apontam para uma estrutura filogenética sobremodo diversificada, possivelmente em decorrência da forte pressão de seleção exercida por uso de antimicrobianos e agentes sanitizantes, grande diversidade de outras espécies bacterianas em competição constante que induz a elaboração de estratégias de sobrevivência e adaptação ao hospedeiro e aos fômites.

Tabela 9. Origens, perfis de amplificação de genes de virulência, tipagem do *spa*, tipagem pelo *agr*, tipagem por PFGE e tipagem por MLST dos 17 cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite bovino mastítico de sete fazendas do estado do Rio de Janeiro selecionadas para análise comparativa.

Cepas	Animal	Fazenda	Município	<i>fbnB</i>	<i>fbnA</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>hla</i>	<i>hlB</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	Perfil de virulência	PFGE	<i>spa</i>	<i>agr</i>	MLST
47	363	A	Barra do Pirai	-	-	-	-	+	+	-	-	11	XII	t693	nt	CC97
54	369	A	Barra do Pirai	-	-	-	-	+	+	-	-	11	VIII	t605	nt	ST3087
76	614	A	Barra do Pirai	-	-	-	-	+	-	-	-	10	XV	t359	nt	ST126
208	1110 (39933)	E	Carmo	+	+	-	-	+	+	+	+	1	VI	t605	2	ST126
225	57	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	6	VII	t605	2	CC126
241	551	E	Carmo	-	+	-	-	+	+	+	+	6	IX	t605	2	ST126
262	518	E	Carmo	+	-	-	-	+	+	-	+	4	I	t605	2	CC126
281	219	E	Carmo	+	-	-	-	+	+	-	+	4	IV	t23	nt	ST747
295	858 (30976)	E	Carmo	-	-	-	-	+	-	-	+	8	XIII	t17	nt	ST5
300	391	E	Carmo	+	-	-	-	-	-	-	+	5	III	t10	nt	ST5
310	872	E	Carmo	+	+	-	-	+	+	+	+	1	XVI	t359	2	ST126
311	683	E	Carmo	+	-	-	-	+	+	+	+	3	II	t23	nt	ST126
325	Abeia	E	Carmo	-	+	-	-	+	-	-	+	7	XI	t605	2	ST126
336	Pintura	F	Vassouras	+	+	-	-	+	-	-	+	2	XIV	t605	2	ST126
338	Germana	F	Vassouras	+	-	-	-	+	+	+	+	3	XII	t605	2	ST126
339	Germana	F	Vassouras	-	-	-	-	+	+	+	+	9	V	t605	2	ST126
360	Serena	C	Passa tres	-	+	-	-	+	+	+	+	6	X	t432	2	ST97

5.4 Comparações de técnicas e detecção da suscetibilidade a antimicrobianos

Como descrito anteriormente, as cepas de *Staphylococcus aureus* estudados apresentaram suscetibilidade prévia a oxacilina e foram avaliados por meio de duas técnicas para outras classes de antimicrobianos. Em ambas as técnicas, as cepas testadas foram sensíveis aos seguintes antibióticos: clorafenicol, daptomicina, linezolida, nitrofuratoína, quinupristina, tetraciclina e vancomicina. Foi possível detectar alguma resistência a ciprofloxacina, eritromicina e penicilina através da técnica de difusão em disco (Gráfico 1).

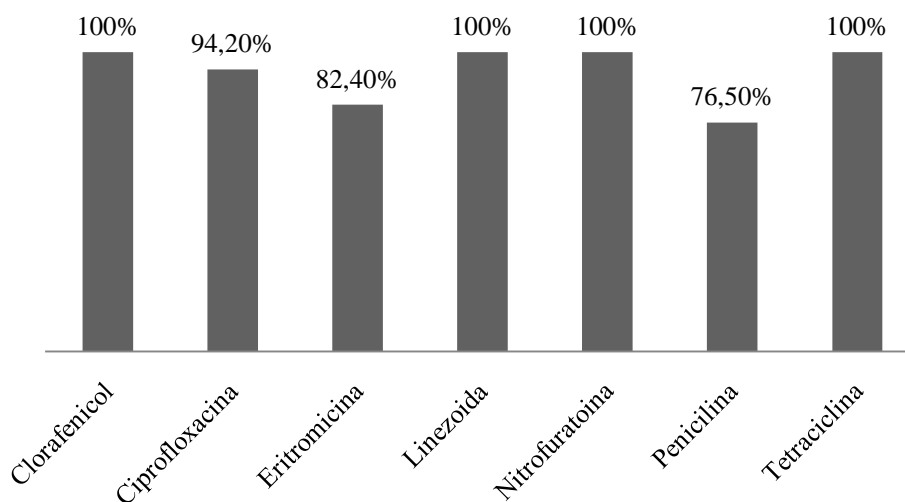


Gráfico 1. Porcentagem de cepas de *Staphylococcus aureus* suscetíveis aos antimicrobianos testados pela técnica de difusão em disco.

Através da técnica automatizada Sensititre- Thermo Scientific® foi possível detectar resistência a eritromicina e penicilina (Gráfico 2).

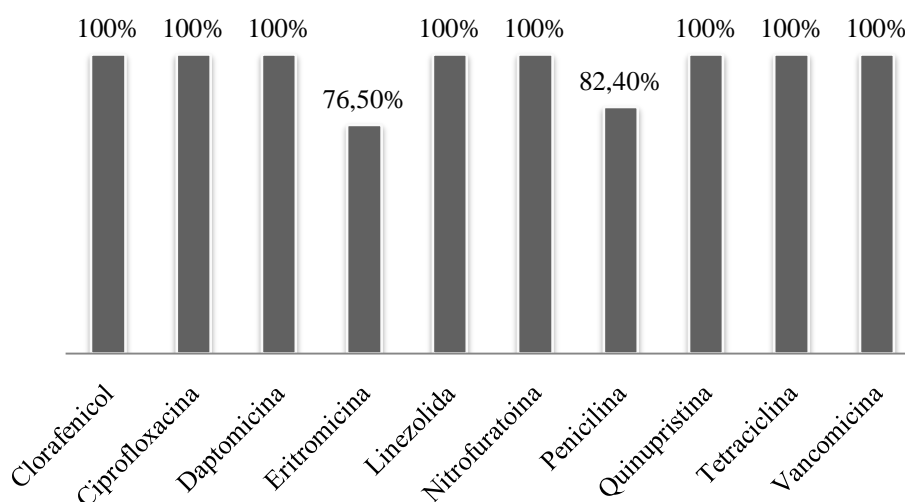


Gráfico 2. Porcentagem de cepas de *Staphylococcus aureus* suscetíveis aos antimicrobianos testados pela técnica de CIM automatizada (Sensititre- Thermo Scientific®).

Quando comparados os resultados de ambas as técnicas, nota-se a resistência aos mesmos antimicrobianos com exceção a ciprofloxacina. No entanto, não houve similaridade entre os perfis de resistência aos antimicrobianos de acordo com as cepas considerando ambas as técnicas. Devido à elevada suscetibilidade das cepas de *S. aureus* a penicilina este não é utilizado rotineiramente no tratamento da mastite bovina (KREWER *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012), Apesar de, no presente estudo, a maioria das cepas apresentar suscetibilidade aos antimicrobianos testados, este fato não elimina a importância de monitorar o perfil de resistência aos antimicrobianos em animais de produção.

5.5 Detecção genotípica de cepas MRSA

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa não detectaram o gene *mecA* em cepas de origem bovina com fenótipo de resistência a oxacilina (MENDONÇA *et al.*, 2012), o que foi esclarecido pelos estudos de Melo e colaboradores (2014) que detectaram mutações pontuais na região de anelamento do iniciador, o que acarretou o desenho de novos iniciadores para a detecção do gene *mec* em isolados bovinos (*mec* bovino) A eficácia deste iniciador foi validada por ampliações do gene *mec* oriundo de isolados bovinos do Brasil e Turquia (BUYUKCANGAZ *et al.*, 2015).

Apesar do perfil de suscetibilidade fenotípico observado, as 17 cepas do presente estudo foram submetidas a detecção da presença do gene *mec* ou variantes, uma vez que a detecção desses genes implicaria em uma potencial resistência a oxacilina. Porém não foi possível detectar o gene *mecA* ou sua variante, o gene *mec* bovino.

Garcia-Alvarez e colaboradores (2011) também detectaram mutações pontuais no gene *mec*, e descreveram um novo alelo denominado *mecC*, este gene foi encontrado em humanos e em animais, porém até a presente data este alelo não foi detectado no continente americano. As cepas selecionadas nesta tese não apresentaram o gene *mecC*.

6.CONCLUSÕES

A maioria das cepas estudadas possui uma variedade de genes de virulência, demonstrando elevada diversidade de cepas circulantes nas propriedades estudadas.

Houve prevalência de cepas com capacidade genética para produção de biofilme.

Ocorreu a prevalência do *agr* grupo II nas cepas estudadas.

Foi possível observar 12 diferentes tipos de *spa*, sendo o *spa* tipo t605 o mais prevalente entre os isolados estudados, como esperado por sua relação com o ST126.

A análise da diversidade pela técnica de PFGE permitiu observar elevada heterogeneidade, porém dois isolados demonstraram ser intimamente relacionados.

Foram detectados cinco tipos diferentes de STs, sendo prevalente o ST 126, como esperado por sua relação com populações bovinas.

Foi observada elevada suscetibilidade dos isolados frente aos diferentes antibióticos testados e a baixa resistência dos isolados aos antibióticos ciprofloxacina, eritromicina e penicilina.

Não foi possível detectar a presença de nenhum dos variantes do gene *mec*.

Através da análise de comparação das técnicas utilizadas podemos concluir que a definição de cepa clonal de *S. aureus* ainda não está totalmente esclarecida visto que não existem muitos estudos de cepas de origem bovina e suscetíveis a meticilina, como é o caso dos isolados de *S. aureus* do presente estudo. A definição de clone detectado através de uma técnica de tipagem molecular depende do poder discriminatório e do número de técnicas utilizadas, vale a pena ressaltar que os atuais métodos de tipagem que são disponíveis para a maioria dos laboratórios não cumprem todas as características para serem caracterizados com uma técnica dita como “padrão ouro”, atualmente se faz necessário a combinação de pelo menos duas técnicas para que se possa obter uma melhor compressão da dinâmica populacional de *S.aureus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, P. R., MIDDLETON, J. R., & FOX, L. K. Comparison of Virulence Gene Identification, Ribosomal Spacer PCR, and Pulsed Field Gel Electrophoresis for Strain-Typing *Staphylococcus aureus* Isolated from Cases of Subclinical Bovine Mastitis in the USA. **Journal of clinical microbiology**, JCM-03282, 2016.
- AGERSØ, Y., HASMAN, H., CAVACO, L. M., PEDERSEN, K., & AARESTRUP, F. M. Study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. **Veterinary microbiology**, n.157,v.1, p.246-250, 2012.
- AIRES-DE-SOUSA, M., PARENTE, C. E., VIEIRA-DA-MOTTA, O., BONNA, I. C., SILVA, D. A., & DE LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and environmental microbiology**, n.73, v.12, p.3845-3849, 2007.
- 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. DE 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, **Rev. Bras. Med. Vet.**, n.36, v.2, p.199-208, abr/jun 2014
- ANDREI, A., & ZERVOS, M. J. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Archives of pathology & laboratory medicine**, n.130, v.5, p.662-668, 2006.
- ARGUDÍN, M. Á., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- ATALLA, H., GYLES, C., JACOB, C. L., MOISAN, H., MALOUIN, F., & MALLARD, B. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. **Foodborne pathogens and disease**, n.5, v.6, p.785-799, 2008.
- AYED, S. B., BOUBAKER, I. B. B., SAMIR, E., & REDJEB, S. B. Prevalence of agr specificity groups among methicilin resistant *Staphylococcus aureus* circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. **Pathologie Biologie**, n.54, v.8, p.435-438, 2006.
- BANDEIRA, F. S., PICOLI, T., ZANI, J. L., SILVA, W. S., & FISCHER, G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região Sul do Rio Grande do Sul. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, n.80, v.1, p.1-6, 2013.
- BARDIAU, M., CAPLIN, J., DETILLEUX, J., GRABER, H., MORONI, P., TAMINIAU, B., & MAINIL, J. G. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. **Veterinary microbiology**, v.185, p. 1-6, 2016

- BARDIAU, M., DETILLEUX, J., FARNIR, F., MAINIL, J. G., & OTE, I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, n.169, v.1, p.74-79, 2014.
- BARHEMA HW, GREEN MJ, BRADLEY AJ, ZADOKS RN Invited review: the role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science** v.92, p.4717-4729, 2009.
- BARHEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., & ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, n.89, v.6, p.1877-1895, 2006.
- BRADY, R. A., GRAEME, A. O., LEID, J. G., PRIOR, M. L., COSTERTON, J. W., & SHIRTLIFF, M. E. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. **Infection and immunity**, n. 79,v.4, p.1797-1803, 2011.
- BROUILLETTE, E., TALBOT, B. G., & MALOUIN, F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. **Infection and immunity**, n.71,v.4, p.2292-2295, 2003.
- BUDD, K. E., MCCOY, F., MONECKE, S., CORMICAN, P., MITCHELL, J., & KEANE, O. M. Extensive Genomic Diversity among Bovine-Adapted *Staphylococcus aureus*: Evidence for a Genomic Rearrangement within CC97. **PloS one**, n.10, v.8, e0134592, 2015.
- BURKE, F. M., MCCORMACK, N., RINDI, S., SPEZIALE, P., & FOSTER, T. J. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. **BMC microbiology**, n.1, v.10, p.1, 2010.
- BUYUKCANGAZ, E.; SOARES, B. S.; MELO, D. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O.; LOGUE, C. M.; SOUZA, M. M. S. Molecular Detection Of mecA And mecA Variant In Bovine *Staphylococcus* Associated Bovine Mastitis From Dairy Farms In Turkey In: 28^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianopolis, 2015.
- CAPURRO, A., ASPÁN, A., UNNERSTAD, H. E., WALLER, K. P., & ARTURSSON, K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of dairy science**, n.1, v.93, p.180-191, 2010.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Oxacillin—resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): Laboratory Protocol for Molecular Typing of *S. aureus* by Pulsed—field gel electrophoresis (pfge) growing cultures: plug preparation . **Natl Mol Subtyping Netw foodborne Dis Surveill.** p.1-24, 2013.
- CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E.E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Braz J Microbiol**, v. 40, p. 254-261, 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards; Second Informational Supplement**, VET01-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 2013.

COCCHIARO, J. L., GOMEZ, M. I., RISLEY, A., SOLINGA, R., SORDELLI, D. O., & LEE, J. C. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. **Molecular microbiology**, n.3, v.59, p.948-960, 2006.

CONCEIÇÃO, T., COELHO, C., SILVA, I. S., DE LENCASTRE, H., & AIRES-DE-SOUSA, M. *Staphylococcus aureus* in former Portuguese colonies from Africa and the Far East: missing data to help fill the world map. **Clinical Microbiology and Infection**, n.9, v.21, p.842, 2015.

CONCEIÇÃO, T., COELHO, C., SANTOS-SILVA, I., DE LENCASTRE, H., & AIRES-DE-SOUSA, M. Epidemiology of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* in Luanda, Angola: first description of the spread of the MRSA ST5-IVa clone in the African continent. **Microbial Drug Resistance**, n.5, v.20, p.441-449, 2014.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; ÚBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, 2004.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, n.2, v.2, p.114-122, 2003.

DELEO, F. R., OTTO, M., KREISWIRTH, B. N., & CHAMBERS, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, n.375, v.9725, p.1557-1568, 2010.

DERAL- Departamento de Economia Rural da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do estado do Paraná. Análise da Conjuntura Agropecuária, *online*, 2014.

DEURENBERG, R., VLAYEN, J., GUILLO, S., OLIVER, T. K., FERVERS, B., & BURGERS, J. Standardization of search methods for guideline development: an international survey of evidence-based guideline development groups. **Health Information & Libraries Journal**, v. 25, n. 1, p. 23-30, 2008.

DOYLE, M. E., HARTMANN, F. A., & WONG, A. C. L. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? **Animal Health Research Reviews**, n.2, v.13, p.157-180, 2012.

DU, X. F., XIAO, M., LIANG, H. Y., SUN, Z., JIANG, Y. H., CHEN, G. Y. & ZHANG, H. An improved MLVA method and its comparison with traditional MLVF, spa typing, MLST/SCCmec and PFGE for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International journal of molecular sciences**, n.1, v.15, p.725-742, 2014.

EL-SAYED, A.; ALBER, J.; LAMMER, C.; JAGER, S.; WOLTER, W.; VÁZQUEZ, H.C. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. **Vet. Méx.**, v.37, n.2, p.165-179, 2006.

EMATER-RIO, **Relatório de atividades** 2015, 2016.

ENRIGHT, M. C., DAY, N. P., DAVIES, C. E., PEACOCK, S. J., & SPRATT, B. G.. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, n.3, v.38, p.1008-1015, 2000.

FABRES-KLEIN, M. H., SANTOS, M. J. C., KLEIN, R. C., DE SOUZA, G. N., & RIBON, A. D. O. B. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC veterinary research**, n.1, v.11, p.1, 2015.

FAGUNDES H. & OLIVEIRA C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, n.4, v.34, p.1315-1320, 2004.

FAROQ, A. T., BRUNEL, A. S., BOUZINBI, N., CORNE, P., BAÑULS, A. L., & SHAHBAZKIA, H. R DNAGear-a free software for spa type identification in *Staphylococcus aureus*. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 642, 2012.

FEINGOLD, B. J., SILBERGELD, E. K., CURRIERO, F. C., VAN CLEEF, B. A., HECK, M. E., & KLUYTMANS, J. A. Livestock density as risk factor for livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, the Netherlands. **Emerg Infect Dis**, n.11, v.18, p.1841-1849, 2012.

FESSLER, A. T., KADLEC, K., HASSEL, M., HAUSCHILD, T., EIDAM, C., EHRLICH, R., & SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. **Applied and environmental microbiology**, n.20, v.77, p.7151-7157, 2011.

FRANCISCO, A. P., VAZ, C., MONTEIRO, P. T., MELO-CRISTINO, J., RAMIREZ, M., & CARRIÇO, J. A. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. **BMC bioinformatics**, n.1, v.13, p.1, 2012.

FREITAS, M.F.L. PINHEIRO JÚNIOR, J. W., STAMFORD, T. L. M., RABELO, S. D. A., SILVA, D. D., SILVEIRA FILHO, V. D. & MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171- 177, 2005.

GAO, J., FERRERI, M., YU, F., LIU, X., CHEN, L., SU, J., & HAN, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. **The Veterinary Journal**, n.3, v.192, p.550-552, 2012.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L., HOLDEN, M. T., LINDSAY, H., WEBB, C. R., BROWN, D. F., CURRAN, M. D., PARKHILL, J. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet infectious diseases**, n.8, v.11, p.595-603, 2011.

GILL SA Genomics of staphylococci. In: Crossley KBJ, K. K.; Archer, G. L.; Fowler Jr, V. G. (ed) *Staphylococci in human disease*. **Wiley-Blackwell**, Chichester, UK, p19-30, 2009.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, n.7, v.10, p.866-875, 2010.

GONZALEZ, B. E., RUEDA, A. M., SHELBURNE, S. A., MUSER, D. M., HAMILL, R. J., & HULTÉN, K. G. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. **Infection Control**, n.10, v.27, p.1051-1056, 2006.

GRABER, H. U., NASKOVA, J., STUDER, E., KAUFMANN, T., KIRCHHOFER, M., BRECHBÜHL, M., FOURNIER, C. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. **Journal of dairy science**, n.4, v.92, p.1442-1451, 2009.

GUINANE, C. M., ZAKOUR, N. L. B., TORMO-MAS, M. A., WEINERT, L. A., LOWDER, B. V., CARTWRIGHT, R. A., WITNEY, A. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. **Genome Biology and Evolution**, v.2, p.454-466, 2010.

HALASA, T., HUIJPS, K., ØSTERÅS, O., & HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary quarterly**, n.1, v.29, p.18-31, 2007.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser**, v.41, p.95-98, 1999.

HALLIN, M., DEPLANO, A., DENIS, O., DE MENDONÇA, R., DE RYCK, R., & STRUELENS, M. J. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. **Journal of clinical microbiology**, n.1, v.45, p.127-133, 2007.

HAMMAD, A. M., WATANABE, W., FUJII, T., & SHIMAMOTO, T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **International journal of food microbiology**, n.3, v.156, p.286-289, 2012.

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

HARMSSEN, D., CLAUS, H., WITTE, W., ROTHGÄNGER, J., CLAUS, H., TURNWALD, D., & VOGEL, U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. **Journal of clinical microbiology**, n.12, v.41, p.5442-5448, 2003.

HAVERI, M., HOVINEN, M., ROSLÖF, A., & PYÖRÄLÄ, S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. **Journal of clinical microbiology**, n.11, v.46, p.3728-3735, 2008.

HAVERI, M., ROSLÖF, A., RANTALA, L., & PYÖRÄLÄ, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of applied Microbiology**, n.4, v.103, p.993-1000, 2007.

HEBERT, A., SAYASITH, K., SÉNÉCHAL, S., DUBREUIL, P., & LAGACÉ, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS microbiology letters**, n.1, v.193, p.57-62, 2000.

HIRSCHHAUSEN N, SCHLESIER T, SCHMIDT MA, GOTZ F, PETERS G, HEILMANN C. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. **Cellular microbiology**, v.12, p.1746-1764, 2010.

HOLMES, M. A., & ZADOKS, R. N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, n.4, v.16, p.373-382, 2011.

HOLMES, A., EDWARDS, G. F., GIRVAN, E. K., HANNANT, W., DANIAL, J., FITZGERALD, J. R., & TEMPLETON, K. E. Comparison of two multilocus variable-number tandem-repeat methods and pulsed-field gel electrophoresis for differentiating highly clonal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of clinical microbiology**, n.10, v.48, p.3600-3607, 2010.

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. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 4, p. 1083–1089, 1998.

KAMAL, R. M., BAYOUMI, M. A., & EL AAL, S. F. A. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. **Food Control**, n.1, v.33, p.49-53, 2013.

KENAR, B., KUYUCUOĞLU, Y., & ŞEKER, E. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis in Turkey. **Pakistan Veterinary Journal**, n.3, v.32, p.390-393, 2012.

KLEIN, R. C., FABRES-KLEIN, M. H., BRITO, M. A. V. P., FIETTO, L. G., & RIBON, A. D. O. B. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary microbiology**, n.1, v.160, p.183-188, 2012.

KÖCK, R., SCHAUMBURG, F., MELLMANN, A., KÖKSAL, M., JURKE, A., BECKER, K., & FRIEDRICH, A. W. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. **PloS one**, n.2, v.8, e55040, 2013.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C. ; WINN JR. **Diagnóstico Microbiológico**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2012.

KOREEN, L., RAMASWAMY, S. V., GRAVISS, E. A., NAIDICH, S., MUSSER, J. M., & KREISWIRTH, B. N. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro-and macrovariation. **Journal of Clinical Microbiology**, n.2, v.42, p.792-799, 2004.

KOT, B., SZWEDA, P., FRANKOWSKA-MACIEJEWSKA, A., PIECHOTA, M., & WOLSKA, K. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **The Journal of dairy research**, n.2, v.83, p.228-235, 2016.

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, p. 601-606, 2013.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, 2016.

LARSEN, J., PETERSEN, A., SØRUM, M., STEGGER, M., VAN ALPHEN, L., VALENTINER-BRANTH, P., ANDERSEN, P. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. **Euro Surveill**, v.20, 30021, 2015.

LARSEN, A. R., STEGGER, M., & SØRUM, M. spa typing directly from a mecA, spa and pvl multiplex PCR assay—a cost-effective improvement for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surveillance. **Clinical Microbiology and Infection**, n.6, v.14, p.611-614, 2008.

LIM, S.K., NAM, H.M., PARK, H.J., LEE, H.S., CHOI, M.J., JUNG, S.C., LEE, J.Y., KIM, Y.C., LONCARIC, I., KÜNZEL, F., LICKA, T., SIMHOFER, H., SPERGSER, J., & ROSENGARTEN, R. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Austrian companion animals and horses. **Veterinary microbiology**, n.2, v.168, p.381-387, 2014.

LINDSAY J.A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. **Int J Med Microbiol** v.300, p.98-103, 2010.

LINDSAY J.A. & HOLDEN M.T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in microbiology**, v.12, p.378-385, 2004.

LOZANO, C., ASPIROZ, C., CHARLEZ, L., GÓMEZ-SANZ, E., TOLEDO, M., ZARAZAGA, M., & TORRES, C. Skin lesion by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398-t1451 in a Spanish pig farmer: possible transmission from animals to humans. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, n.6, v.11, p.605-607, 2011.

LOWDER, B. V., GUINANE, C. M., ZAKOUR, N. L. B., WEINERT, L. A., CONWAY-MORRIS, A., CARTWRIGHT, R. A., FITZGERALD, J. R. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n.46, v.106, p.19545-19550, 2009.

MAIA, G. B. D. S., PINTO, A. D. R., MARQUES, C. Y. T., ROITMAN, F. B., & LYRA, D. D. Produção leiteira no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 37, mar. 2013, p. 371-398, 2013.

MAIDEN MC, BYGRAVES JA, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE, URWIN R, Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, n.6, v.95, p.3140-5, 1998.

MARQUES, V. F., DA MOTTA, C. C., DA SILVA SOARES, B., DE MELO, D. A., DE OLIVEIRA COELHO, S. D. M., DA SILVA COELHO, I., & DE SOUZA, M. M. S. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 118-124, 2017.

MARQUES VF, SOUZA MMS, MENDONÇA ECL, ALENCAR TA, PRIBUL BR, COELHO SMO, LASAGNO M, REINOSO EB. Análise fenotípica e genotípica da virulência em *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina em regiões do Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 161-170, 2013.

MARTINS R.P., SILVA J.A.G., NAKAZATO L., DUTRA V. & ALMEIDA FILHO E.S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciênc. Anim. Bras.** n.1, v.1, p.181-187, 2010.

MEEMKEN, D., BLAHA, T., TEGELER, R., TENHAGEN, B. A., GUERRA, B., HAMMERL, J. A., FETSCH, A. Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LaMRSA) Isolated from Lesions of Pigs at Necropsy in Northwest Germany Between 2004 and 2007. **Zoonoses and public health**, v.57, p.143-148, 2010.

MELCHIOR, M. B., FINK-GREMMELS, J., & GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, n.7, v.53, p.326-332, 2006.

MELCHIOR, M. B., VAN OSCH, M. H. J., LAM, T. J. G. M., VERNOOIJ, J. C. M., GAASTRA, W., & FINK-GREMMELS, J. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. **Journal of dairy science**, n.12, v.94, p.5926-5937, 2011.

MELCHIOR, M.B.; VAN OSCH, M.H.J.; GRAAT, R.M.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.J.; NIELEN, M.; GAASTRA, W.; FINK-GREMMELS, J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Vet Microbiol**, v. 137, p. 83–89, 2009

MELCHIOR, M.B., VAN OSCH, M.H.J., LAM, T.J.G.M., VERNOOIJ, J.C.M., GAASTRA, W., FINK- MITRA, S. D., VELU, D., BHUVANA, M., KRITHIGA, N., BANERJEE, A., SHOME, R., SHOME, B. R. *Staphylococcus aureus* spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India. **Journal of applied microbiology**, n.6, v.114, p.1604-1615, 2013.

MELLES DC, GORKINK RFJ, BOELEN HAM, SNIJDERS SV, PEETERS JK, MOORHOUSE MJ, VAN DER SPEK PJ, VAN LEEUWEN WB, SIMONS G, VERBRUGH HA, VAN BELKUM A. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.1732-1740, 2004.

MELLMANN, A., WENIGER, T., BERSSENBRÜGGE, C., ROTHGÄNGER, J., SAMMETH, M., STOYE, J., & HARMSEN, D. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms. **BMC microbiology**, n.1, v.7, p.98, 2007.

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, p. 1075-1082, 2014.

MELO, P. D. C., FERREIRA, L. M., NADER FILHO, A., ZAFALON, L. F., VICENTE, H. I. G., & SOUZA, V. D. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.1, v. 44, p.119-124, 2013.

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

MIDDLETON, J. R., FOX, L. K., GAY, J. M., TYLER, J. W., & BESSER, T. E. Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. **Epidemiology and Infection**, n.2, v.129, p.387-395, 2002.

MITRA, S. D., VELU, D., BHUVANA, M., KRITHIGA, N., BANERJEE, A., SHOME, R., SHOME, B. R. *Staphylococcus aureus* spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India. **Journal of applied microbiology**, n.6, v.114, p.1604-1615, 2013.

MOTTA, C.C.; ROJAS, A.C.M.; DUBENCZUK, F.C.; BOTELHO, L.A.B.; MOREIRA, B.M.; COELHO, S.M.O.; COELHO, I.S.; SOUZA, M.M.S. Verification of molecular characterization of coagulase positive *Staphylococcus* from bovine mastitis with matrix-assisted laser desorption ionization, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) mass spectrometry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 48, p. 3861-3866, 2014.

MULLER, E. E.; HUMMING NETO, O.; SOUZA, J. M.; MARQUES, F.A.C.; MACUCO, A.L.; GIACOMETTI, W. D. Estudo da prevalência da mastite bovina. **Semina**, Porto Alegre, v. 2, n. 1, p.47-48, abr. 1978.

MURCHAN, S., KAUFMANN, M. E., DEPLANO, A., DE RYCK, R., STRUELENS, M., ZINN, C. E., & CUNY, C. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. **Journal of clinical microbiology**, n.41, v.4, p.1574-1585, 2003.

NILSSON, I.-M., HARTFORD, O., FOSTER, T., TARKOWSKI, A. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. **Infection and Immunity**, v.67, p.1045–1049, 1999.

NANRA, J. S., BUITRAGO, S. M., CRAWFORD, S., NG, J., FINK, P. S., HAWKINS, J., JANSEN, K. U. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. **Human vaccines & immunotherapeutics**, n.3, v.9, p.480-487, 2013.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C., PARISI, A., CELANO, G. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International journal of food microbiology**, n.2, v.117, p.219-222, 2007.

NOVICK, R. P., & GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annual review of genetics**, v.42, p.541-564, 2008.

O'BRIEN, A. M., HANSON, B. M., FARINA, S. A., WU, J. Y., SIMMERING, J. E., WARDYN, S. E., SMITH, T. C. MRSA in conventional and alternative retail pork products. **PLoS One**, n.1 v.7, e30092, 2012.

O'RIORDAN, K., & LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clinical microbiology reviews**, n.1, v.17, p.218-234, 2004.

OTE, I., TAMINIAU, B., DUPREZ, J. N., DIZIER, I., & MAINIL, J. G. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, n.3, v.153, p.285-292, 2011.

OTTER, J. A., & FRENCH, G. L. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **The Lancet infectious diseases**, n.4, v.10, p.227-239, 2010.

OTTO, M. MRSA virulence and spread. **Cellular microbiology**, n.10, v.14, p.1513-1521, 2012.

OTTO, M. P., MARTIN, E., BADIOU, C., LEBRUN, S., BES, M., VANDENESCH, F., DUMITRESCU, O. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, dkt073, 2013

PAAPE, M., MEHRZAD, J., ZHAO, X., DETILLEUX, J., & BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, n.2, v.7, p.109-121, 2002.

PEREYRA, E. A., PICECH, F., RENNA, M. S., BARAVALLE, C., ANDREOTTI, C. S., RUSSI, R. & DALLARD, B. E. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. **Veterinary microbiology**, v.183, p.69-77,2016.

PÉREZ-LOSADA, M., CABEZAS, P., CASTRO-NALLAR, E., & CRANDALL, K. A. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v.16, p.38-53, 2013.

PICCININI, R., TASSI, R., DAPRÀ, V., PILLA, R., FENNER, J., CARTER, B., & ANJUM, M. F. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. **Journal of dairy research**, n.2, v.79, p.249-255, 2012.

PLANET, P. J., NARECHANIA, A., CHEN, L., MATHEMA, B., BOUNDY, S., ARCHER, G., & KREISWIRTH, B. Architecture of a Species: Phylogenomics of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, 2016.

PORRERO, M. C., WASSENAAR, T. M., GÓMEZ-BARRERO, S., GARCÍA, M., BÁRCENA, C., ALVAREZ, J., & DOMÍNGUEZ, L. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iberian pigs. **Letters in applied microbiology**, n.4, v.54, p.280-285, 2012.

RABELLO, R. F., MOREIRA, B. M., LOPES, R. M., TEIXEIRA, L. M., RILEY, L. W., & CASTRO, A. C. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. **Journal of medical microbiology**, n.11, v.56, p.1505-1511, 2007.

RANJBAR, R., KARAMI, A., FARSHAD, S., GIAMMANCO, G. M., & MAMMINA, C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **The new microbiologica**, v.1, n.37, p.1-15, 2014.

RAZA, A., MUHAMMAD, G., SHARIF, S., & ATTA, A. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: a review. **Molecular Microbiology Research**, n.3, v.1, 2013.

RINALDI, M., LI, R. W., & CAPUCO, A. V. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. **Veterinary immunology and immunopathology**, n.4, v.138, p.267-279, 2010.

ROBINSON, D. A., & ENRIGHT, M. C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, n.12, v.47, p.3926-3934, 2003.

SABAT, A. J., BUDIMIR, A., NASHEV, D., SÁ-LEÃO, R., VAN DIJL, J. M., LAURENT, F., ESCMID STUDY GROUP OF EPIDEMIOLOGICAL MARKERS (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **European Surveillance**, n.4, v.18, 20380, 2013.

SABAT, A., KRZYSZTON-RUSSJAN, J., STRZALKA, W., FILIPEK, R., KOSOWSKA, K., HRYNIEWICZ, W., POTEMPA, J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. **Journal of clinical microbiology**, n.4, v.41, p.1801-1804, 2003.

SALASIA, S. I.; KHUSNAN, Z.; LAMMLER, C.; ZSCHOCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical

mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, n.5, p.103–109, 2004.

SAKWINSKA, O., GIDDEY, M., MOREILLON, M., MORISSET, D., WALDVOGEL, A., & MOREILLON, P. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. **Applied and environmental microbiology**, n.17, v.77, p.5908-5915, 2011.

SALIMENA, A. P., LANGE, C. C., CAMUSSONE, C., SIGNORINI, M., CALVINHO, L. F., BRITO, M. A., PICCOLI, R. H. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. **Veterinary research communications**, p.1-10, 2016.

SCHWARTZ, D. C., & CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, n.1, v.37, p.67-75, 1984.

SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N. & WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied Environmental Microbiology**, v.51, p.873–884, 1986.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B.; ALCABES, P.; SAID-SALIM, B.; LINA, G.; MATSUKA, A.; MARTINEZ, J.; KREISWIRTH, B.N. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 456–459, 2003.

SHOPSIN, B., GOMEZ, M., MONTGOMERY, S. O., SMITH, D. H., WADDINGTON, M., DODGE, D. E., KREISWIRTH, B. N. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of clinical microbiology**, n.11, v.37, p. 3556-3563, 1999.

SILVA, E. R. da; PEREIRA; A. . G.; MORAES, W. da; SANTORO, K. R.; SILVA, T. R. M. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n.3, p. 701-711, 2012.

SMITH, E. M., GREEN, L. E., MEDLEY, G. F., BIRD, H. E., FOX, L. K., SCHUKKEN, Y. H., DOWSON, C. G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of clinical microbiology**, n.9, v.43, p.4737-4743, 2005.

SOAVI L, STELLINI R, SIGNORINI L, ANTONINI B, PEDRONI P, ZANETTI L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398, Italy. **Emerging Infectious Diseases journal.**, v.16, p.346–8, 2010

SPRATT, B. G. Exploring the concept of clonality in bacteria. **Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews**, p. 323-352, 2004.

STER, C., GILBERT, F. B., COCHARD, T., & POUTREL, B. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. **Molecular and cellular probes**, n.4, v.19, p.227-235, 2005.

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

SUNG, J. M. L., LLOYD, D. H., & LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Microbiology**, n.7, v.154, p.1949-1959, 2008.

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

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., & GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, n.6, v.18, p.426-439, 1997.

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**, n.9, v.33, p.2233, 1995.

TITO, T.M.; RODRIGUES, N.M.B.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S.; ZONTA, E.; COELHO, I.S. Choice of DNA extraction protocols from Gram negative and positive bacteria and directly from the soil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 12, p. 863-871, 2015.

USDA, Brazil Dairy and Products Annual Dairy Report, **BR0979**, 2015.

VAN BELKUM, A., TASSIOS, P. T., DIJKSHOORN, L., HAEGGMAN, S., COOKSON, B., FRY, N. K., BRISSE, S. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p.1-46, 2007.

VAN CLEEF, B. A. G. L., BROENS, E. M., VOSS, A., HUIJSDENS, X. W., ZÜCHNER, L., VAN BENTHEM, B. H. B., VAN DE GIESSEN, A. W. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. **Epidemiology and infection**, n.5, v.138, p.756-763, 2010.

VAN LEEUWEN WB, MELLES DC, ALAIDAN A, AL-AHDAL M, BOELEN HA, SNIJDERS SV, WERTHEIM H, VAN DUIJKEREN E, PEETERS JK, VAN DER SPEK PJ, GORKINK R, SIMONS G, VERBRUGH HA & VAN BELKUM A. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, n.187, p.4584-4591, 2005.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANA, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.179-185, 2003.

- VERKADE, E., & KLUYTMANS, J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. **Infection, genetics and evolution**, v.21, p.523-530, 2014.
- WALSH, E. J., MIAJLOVIC, H., GORKUN, O. V., & FOSTER, T. J. Identification of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the α C-domain of human fibrinogen. **Microbiology**, n.2, v.154, p.550-558, 2008.
- WENDLANDT, S., KADLEC, K., FEßLER, A. T., MONECKE, S., EHRLICH, R., VAN DE GIESSEN, A. W., & VAN DUIJKEREN, E. Resistance phenotypes and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from broiler chickens at slaughter and abattoir workers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.11, v.68, p.2458-2463, 2013.
- WOLF, C., KUSCH, H., MONECKE, S., ALBRECHT, D., HOLTFRETER, S., VON EIFF, C., ENGELMANN, S. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. **Proteomics**, n.12, v.11, p.2491-2502, 2011.
- ZADOKS, R. N., VAN LEEUWEN, W. B., KREFT, D., FOX, L. K., BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., & VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of clinical microbiology**, n.11, v.40, p.3894-3902, 2002.
- ZECCONI, A. Can we eradicate *Staphylococcus aureus* mastitis. In **Proceedings of the 24th World Buiatrics Congress**, October, p. 15-19, 2006.

