

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE**  
***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE FOSSA**  
**NASAL E GLÂNDULA MAMÁRIA DE VACAS**  
**LEITEIRAS POR DIFERENTES MÉTODOS**

Renata De Paoli Santos

**MINAS GERAIS**  
**Belo Horizonte**

Renata De Paoli Santos

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS* ISOLADOS DE FOSSA NASAL E GLÂNDULA MAMÁRIA DE  
VACAS LEITEIRAS POR DIFERENTES MÉTODOS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de produtos de Origem Animal.

Orientadora: Profa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Co-orientador: Fernando Nogueira de Souza

**BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG  
2017**

S231i Santos, Renata De Paoli, 1981-  
Identificação e caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados de fossa nasal e glândula mamária de vacas leiteiras por diferentes métodos / Renata De Paoli Santos. – 2017.

75 p. : il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Co-orientador: Fernando Nogueira de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Mastite – Controle – Teses. 3. *Staphylococcus aureus* – Isolamento – Teses. 4. Testes de sensibilidade bacteriana – Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Souza, Fernando Nogueira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.214 089 69

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### RENATA DE PAOLI SANTOS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Profª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Presidente - Orientador

Prof. Adriano França da Cunha  
União de Ensino Superior de Viçosa- UNIVIÇOSA

Profª. Claudia Freire de Andrade Morais Penna  
Escola de Veterinária - UFMG

Drª. Soráia de Araújo Diniz  
Doutorado - UFMG

*Dedico esse trabalho ao meu filho,  
razão da minha vida, meu maior  
tesouro. Espero que seja fonte  
incentivadora na construção do seu  
saber!*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado, iluminando meus dias, indicando os caminhos, me enchendo de força para superar adversidades e principalmente, me cobrindo de esperança, serenidade, fé e amor!

Aos homens da minha vida. Meu filho Pedro, amor maior, por estar sempre ao meu lado, mesmo se privando de momentos de lazer. Tão pequeno e já tão maduro, compreensivo e parceiro! Te amo infinito!! Ao Cassi, por ser o melhor marido do mundo! Obrigada por me fortalecer, por me fazer tão bem, pelo companheirismo e amor!

Aos meus pais, Eloisa e Milton, por terem me transmitido a essência de quem eu sou. Por me mostrarem que é preciso sonhar alto e batalhar para realizar. Obrigada pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e pelos exemplos.

Aos meus irmãos - Fred de sangue e aos de coração, especialmente Aninha, Laurinha e Dan - agradeço por sempre estarem ao meu lado incentivando minhas escolhas. Por mais loucas que pareçam! Sem os risos, sem os colos, sem as verdades, sem a cumplicidade e a amizade não seria quem eu sou! À Dan gratidão também por me socorrer com a estatística, fundamental para finalizar esse estudo!

Aos meus avós por me mostrarem o verdadeiro significado de amor e essência familiar.

A todos os familiares e amigos queridos! São tantos, tão especiais e essenciais na minha vida. Sou grata por tê-los na minha convivência. Obrigada pelas vibrações positivas, pela torcida, pelos encontros e por tornar a trajetória mais alegre e leve!

Ao Felipe por ser um pai sensacional e me socorrer sempre que preciso! Sua dedicação e presença são admiráveis.

Aos amigos, funcionários e professores do DTIPOA, em especial a Ana Cláudia e Sarah pelos dias e noites de labuta, pela dedicação. Sem dúvida a ajuda de vocês foi essencial para o andamento e finalização deste experimento. Quero vocês para sempre do meu lado!

Ao Fernando Nogueira, por ser muito mais que um co-orientador. Um incentivador e amigo. Obrigada pelas ideias, pelo apoio e carinho constantes.

À minha orientadora, Professora Mônica Pinho pelo exemplo de caráter, seriedade, talento. Por ter tanta paciência e compreensão comigo, por me ensinar a ser uma pessoa e profissional muito melhor.

Ao prof. Marcos Bryan Heinemann e colegas da USP, principalmente a Juliana Aizawa pela ajuda fundamental para a realização desse projeto.

À Maurinha, Cosme e Marco Antônio, pelo auxílio e disponibilidade no laboratório, vocês foram essenciais.

À FAPEMIG (Processo n. APQ-02210-13) e à FAPESP (Processo n. 2015/10332-6) pelo apoio financeiro do projeto e ao CNPq pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho, ou meu mais sincero obrigada!!! Sem vocês definitivamente nada disso seria possível!

---

## SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>14</b>
3.1	Produção e qualidade de leite	14
3.2	Mastite e <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.3	Resistência a antimicrobianos	17
3.4	<i>S. aureus</i> resistente à meticilina - MRSA	18
3.5	Caracterização Fenotípica de <i>S. aureus</i>	18
3.6	Caracterização Automatizada de <i>S. aureus</i>	20
3.7	Caracterização Genotípica de <i>S. aureus</i>	21
3.8	Diversidade Genética de <i>S. aureus</i>	23
3.9	Sítios extra mamários de <i>S. aureus</i>	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
4.1	Animais	26
4.2	Coleta das amostras	26
4.3	Determinação da Contagem de células Somáticas (CCS)	27
4.4	Análise Bacteriológica – Leite	27
4.5	Análise bacteriológica - <i>swab</i> nasal (SN)	27
4.6	Identificação automatizada: proteômica – MALDI-TOF	28
4.7	Identificação automatizada: colorimétrica – VITEK® 2	29
4.8	Extração de DNA	29
4.9	Identificação Genotípica	30
4.10	SPA Typing	31
4.11	Sensibilidade aos antimicrobianos	34
4.12	Análises Estatísticas	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>

---

## TABELAS

---

<b>Tabela 1</b> – Relação entre CCS de leite de tanque, quartos mamários infectados e porcentagem na perda de produção de leite -----	15
<b>Tabela 2</b> - <i>Primers</i> utilizados para a identificação do gene da termonuclease <i>nuc</i> de <i>S. aureus</i> isolados de leite bovino -----	30
<b>Tabela 3</b> – <i>Primers</i> usados no <i>SPA Typing</i> -----	31
<b>Tabela 4</b> - <i>Primers</i> utilizados para a identificação do gene de resistência a metilina <i>mecA</i> -	36
<b>Tabela 5</b> - Número de amostras de leite de vaca positivas para a identificação de <i>S. aureus</i> e seus valores percentuais, por diferentes métodos diagnósticos -----	38
<b>Tabela 6</b> - Análise estatística teste Kappa para as amostras de leite entre os diferentes métodos -----	38
<b>Tabela 7</b> - Número de amostras de swab nasal, positivas para a identificação de <i>S. aureus</i> e seus valores percentuais, por diferentes métodos diagnósticos -----	38
<b>Tabela 8</b> - Análise estatística teste Kappa para as amostras de swab nasal os diferentes métodos -----	39
<b>Tabela 9</b> - Susceptibilidade de <i>S. aureus</i> isolados de leite e de swab nasal aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina pelos métodos antibiograma e MIC- <i>VITEK</i> ® 2 -----	48
<b>Tabela 10</b> - Resultados da análise de susceptibilidade dos antimicrobianos pelos métodos <i>VITEK</i> ® 2. – MIC (cartão AST-GP69) -----	51
<b>Tabela 11</b> - Média $\pm$ desvio padrão de CCS log células mL <sup>-1</sup> e CCS para as variáveis -----	55



---

## FIGURAS

---

- Figura 1:** Gel com as bandas específicas compatíveis com a amplificação da região da proteína A de *Staphylococcus aureus*. Resultados em vermelho: negativos ----- 41
- Figura 2:** *Minimal spanning tree* (MST) dos tipos de *S. aureus* predominantes por rebanho --- 43
- Figura 3:** *Minimal spanning tree* (MST) dos tipos de *S. aureus* predominantes em leite e SN-- 44
- Figura 4:** Gel sem as bandas específicas compatíveis com a padrão do gene de resistência à meticilina *mecA* (163pb), CP: controle positivo, CN: controle negativo ----- 49

---

## ANEXOS

---

- Anexo 1:** Dendrograma interpretado pelo Bionumerics com os resultados da tipagem empregando o *SPA typing*, com os respectivos dados de ano de isolamento, fazenda, município e estado ----- 72
- Anexo 2:** Isolados com perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados ----- 73

## RESUMO

SANTOS, R. P. **Identificação e caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados de fossa nasal e glândula mamária de vacas leiteiras por diferentes métodos** [Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from the nasal cavity and mammary gland of dairy cows by diferente methods].

*Staphylococcus aureus* é considerado o patógeno de maior importância na mastite bovina devido à dificuldade de seu controle em rebanhos leiteiros associados principalmente a baixa resposta à antimicrobiano terapia e aos diversos fatores de patogenicidade que possuem. Representa também importante problema de saúde pública, relacionado principalmente às amostras de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) de origem animal. O úbere da vaca é a mais importante fonte de *S. aureus*. No entanto, este patógeno pode ser isolado de vários locais extra mamários (ex. fossas nasais e pele) no animal, sendo provável que essas fontes sejam fômites importantes, muitas vezes não devidamente consideradas na epidemiologia das infecções intramamárias por este patógeno. Diante desse contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os isolados de *S. aureus* provenientes de glândula mamária e fossas nasais. Para tal, foram utilizadas 379 amostras bacterianas oriundas de casos de mastite subclínica persistente e transiente, e swab nasal de vacas de duas fazendas comerciais nos municípios de Quartel Geral (Rebanho 1) e Juiz de Fora (Rebanho 2), localizados no estado de Minas Gerais, Brasil. A identificação dos isolados de *S. aureus* foi realizada conforme preconizado pelo *National Mastitis Council* e confirmadas posteriormente por métodos automatizados (MALDI-TOF) e moleculares (como 16 srRna, aur-nuc e *Spa-typing*). A concentração inibitória mínima (MIC) a antimicrobianos comumente empregados na medicina veterinária utilizados foi determinada pelo aparelho VITEK® 2 compacto. Ademais, o perfil fenotípico de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) deu-se por teste de difusão em ágar utilizando discos de oxaciclina e cefaloxitina e no aparelho automatizado VITEK® 2 compacto, e confirmados pela detecção dos genes *mecA*, por PCR. Das 379 amostras totais, 126 foram selecionadas para a realização das análises moleculares, levando-se em consideração os casos de mastite subclínica persistente e transiente e amostras de swab nasal. Das 126, 116 foram identificadas como *S. aureus* nos testes moleculares e dessas, apenas 94 foram possíveis de serem identificadas pelo *spa-typing*. Foram encontrados quatro tipos *spa*, t605, t198, t127 e t089 representando 94,68% (89/94), 1,06% (1/94), 1,06% (1/94) e 3,19% (3/94), respectivamente. Os dois primeiros tipos, referentes a amostras de leite e os dois últimos, de amostras de swab nasal. Para as análises de sensibilidade aos antimicrobianos e CIM, os resultados encontrados foram a alta ocorrência de multirresistência e a ausência de resistência à metilicina detectados pelos genes para a tipificação *mecA*. No estudo não foi estabelecida relação entre a colonização nasal de *S. aureus* e a infecção intramamária nos animais estudados. Além disso, os isolados de *S. aureus* das infecções intramamárias transitórias e persistentes não diferiram pela tipificação do *spa*, sugerindo que a persistência da infecção tenha sido determinada principalmente por fatores individuais de cada animal. De acordo com o que se tem conhecimento, este foi o primeiro trabalho, até o momento realizado no Brasil, de perfil de resistência por tipagem pelo método *spa typing*, em isolados de *S. aureus* de casos de mastite persistente e transiente e nicho extra mamário (swab nasal).

Palavra Chave: Mastites, *Staphylococcus aureus*, antibiograma, *spa-typing*, MRSA.

## ABSTRACT

SANTOS, R. P. **Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from the nasal cavity and mammary gland of dairy cows by diferente methods.** [Identificação e caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados de fossa nasal e glândula mamária de vacas leiteiras por diferentes métodos]

*Staphylococcus aureus* is regarded as one of the most important pathogens in bovine mastitis due to the difficulty of its control in dairy herds associated mainly with the low response to antimicrobial therapy and the various virulence factors. It should be noted that *S. aureus* represents an important public health problem, mainly related to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) of animal origin. The cow's udder is the most important source of *S. aureus*. However, this pathogen may be isolated from several extra mammary sites (i.e. nasal cavities and skin) in the animal, and these sites are likely to be important sources, often not adequately considered in the epidemiology of intramammary infections by this pathogen. In this context, the objective of the present study was characterize *S. aureus* isolates from mammary gland and extra mammary site (nasal carriage). For this purpose, 379 bacterial samples from cases of subclinical mastitis and nasal swab from two commercial farms were used in the municipalities of Quartel Geral (Herd 1) and Juiz de Fora (Herd 2) both located in Minas Gerais State, Brazil. From those bacteria samples, for *spa* typing, we selected 116 *S. aureus* strains from of persistent and transient intramammary infections and nasal swab. The identification of *S. aureus* isolates was performed as recommended by the National Mastitis Council, which were later confirmed by automated methods (such as MALDI-TOF) and molecular biology (such as 16 srRNA, *aur-nuc* and *spa*-typing). The minimum inhibitory concentration (MIC) to antimicrobials commonly used in veterinary medicine used was determined by the VITEK<sup>®</sup> 2 device. In addition, the phenotypic profile of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) was determined by agar diffusion test using discs of oxacilin and cephaloxitin, besides the automated VITEK<sup>®</sup> 2 automated apparatus, and confirmed by detection of *mecA* genes by PCR. Here, we found four *spa* types, t605, t198, t127 and t089 representing 94.68% (89/94), 1.06% (1/94), 1.06% (1/94), 3.19% (3/94), respectively. The first two *spa*-typing become from milk samples and the last two *spa*-typing are from nasal carriage. For antimicrobial susceptibility and MIC analyzes, the results were the high occurrence of multiresistance and absence of methicillin resistance detected by the genes for *mecA* gene. Also in the study, no relationship between the *S. aureus* nasal carriage and the the intramammary infections in dairy cattle was found. Furthermore, the *S. aureus* isolates from transient and persistent intramammary infections did not differ by *spa*-typing, suggesting that the persistence of infection was mainly determined by cow factors. To the best of our knowledge, this is the first study carried out in Brazil that determine the resistance profile and the *spa*-typing method performed in *S. aureus* isolates from cases of persistent and transient mastitis and extra mammary niche (nasal swab).

Key words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, antibiogram, *spa*-typing, MRSA

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil se distingue como o detentor de um dos maiores rebanhos leiteiros do mundo e ocupa lugar de destaque na produção. Porém, ser grande produtor de leite não basta e parâmetros de sanidade, segurança e qualidade devem ser também priorizados. Para garantir a segurança e qualidade do leite, medidas importantes incluem adoção de práticas de higiene, controle sanitário do rebanho, resfriamento do leite nas propriedades e condições adequadas de transporte.

Dentre os fatores que impactam no processo produtivo do leite, destaca-se a mastite bovina, por sua relevância. Não apenas pela redução expressiva da produção, mas também pelo descarte e perda de qualidade do leite e dos derivados lácteos, e sobretudo, pela dificuldade de controle nos rebanhos, associados principalmente a tratamentos inadequados, com uso indiscriminado de antimicrobianos.

Neste contexto, a mastite é considerada a enfermidade de maior impacto na pecuária leiteira mundial. Entre os patógenos causadores da mastite bovina, *Staphylococcus aureus* se destaca. A principal fonte de *S. aureus* nas infecções intramamárias (IIM) é o úbere da vaca, no entanto pode também ser isolado de sítios extra mamários, como fossas nasais, levando a acreditar que os animais poderiam atuar como possíveis portadores e por isso, terem relevância na epidemiologia da mastite.

Adoção de tratamentos inadequados pode favorecer o aparecimento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, a permanência desses patógenos nos rebanhos.

*S. aureus* pode adquirir resistência à meticilina (MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) devido à aquisição do gene *mecA*. Vários estudos, direcionados para a caracterização desses isolados, consideram que tanto MRSA de origem humana, como de origem animal, estão associados a problemas terapêuticos em infecções. Na Europa, MRSA de origem animal é um problema de saúde pública. Entretanto, estudos no Brasil relacionados com a caracterização e perfil de resistência de MRSA de origem animal são escassos.

O desenvolvimento de sistemas de tipagem tem contribuído de maneira importante para o rastreamento e compreensão da disseminação de vários patógenos. Ademais, o uso de análises automatizadas, bem como o uso de estudos proteômicos estão sendo cada vez mais utilizados para diagnóstico rápido na etiologia de infecções bacterianas em humanos e animais.

Estratégias de controle de mastites causadas pelo *S. aureus* têm tido pouco sucesso, possivelmente em virtude de conhecimento insuficiente sobre características e especificidades das amostras, fatores de patogenicidade relacionados ao processo de infecção e sobre a importância dos diferentes reservatórios, vetores e mecanismos de dispersão.

Desse modo, o objetivo do atual estudo ao caracterizar amostras do patógeno foi fomentar informações que subsidiem a melhor compreensão da epidemiologia das

mastites causadas por *S. aureus* no Brasil. Nesse sentido, o diagnóstico rápido e eficaz, o conhecimento mais detalhado sobre a dinâmica das IIM por *S. aureus*, o conhecimento da distribuição de agrupamentos de *S. aureus* dentro e entre rebanhos leiteiros e sua relação filogenética no espaço e no tempo e o perfil de resistência aos antimicrobianos são considerações fundamentais que podem auxiliar na formulação de estratégias para reduzir a propagação da infecção.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar por diferentes métodos e realizar a caracterização molecular de tipos de *S. aureus* isolados de glândula mamária e de fossas nasais de vacas leiteiras.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar, por biologia molecular, tipos de *S. aureus* de fossas nasais e de leite de vacas com mastite subclínica persistente e transiente;
- Associar a CCS, cura bacteriológica e persistência da infecção intramamária, perfil de resistência aos antimicrobianos, inclusive metilina (MRSA) aos diferentes tipos de *S. aureus*;
- Avaliar a dinâmica de infecção intramamária causada por *S. aureus* associados a bovinos e sítio extra mamário (fossas nasais).
- Avaliar diferentes métodos para detecção e confirmação de *S. aureus* de amostras de leite e de *swabs* nasais de vacas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Produção e qualidade do leite

Segundo Brasil (2011), entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. É considerado um alimento acessível, rico em nutrientes, indispensável para o recém-nascido e fundamental em muitas dietas. Seu consumo, assim como de qualquer produto lácteo, varia consideravelmente entre as diferentes regiões do planeta, podendo chegar a 180 Kg de leite anual *per capita* na Finlândia e menos que 60 Kg em países como Brasil e Japão (FIL, 2011).

O leite de vaca possui aproximadamente 87% de água, 4,7% de lactose, 4% de lipídeos, 3,5% de proteína e 0,8% de minerais. Sua composição pode ser alterada por diversos fatores. Dentre eles, destacam-se: raça, idade, estágio de lactação, nutrição, estado fisiológico do animal e estado de saúde do úbere.

Por se tratar de uma fonte rica de nutrientes e possuir um valor de pH próximo da neutralidade, favorece a multiplicação de diferentes espécies de micro-organismos. A microbiota presente no leite cru pode variar muito e abranger diversos gêneros. Estes micro-organismos são primariamente bactérias, mas fungos filamentosos e leveduras podem se multiplicar igualmente no leite (Walstra, et al., 2001).

Dentre as bactérias presentes no leite, incluem-se as de interesse alimentar, tecnológico, deteriorantes e patogênicas. Essas duas últimas têm efeito negativo na qualidade do leite e de seus derivados e representam muitas vezes, um problema de saúde pública.

A produção de leite de boa qualidade é um desafio que pode ser alcançado desde que algumas medidas sejam tomadas; começando pela obtenção do leite cru até a chegada à indústria. A qualidade deve ser priorizada e práticas de higiene, bom manejo nutricional, controle sanitário e resfriamento do leite nas propriedades e no transporte devem sempre ser observadas e padronizadas pelos produtores (Cerqueira et al., 1999).

Nessa perspectiva, a legislação brasileira estabelece requisitos mínimos de qualidade do leite cru refrigerado nas propriedades rurais brasileiras. Dentre alguns procedimentos específicos utilizados para o controle de qualidade da matéria-prima está a contagem de células somáticas (CCS).

No Brasil, a CCS do leite de tanque de rebanhos bovinos passou a ser avaliada e monitorada do ponto de vista legal a partir de 2002 por meio da Instrução Normativa 51 (IN 51) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2002), que regulamentou o padrão de identidade e qualidade do leite cru refrigerado.

No final de 2011, foi publicada a Instrução Normativa 62 (IN62) (Brasil, 2011), que veio complementar a IN 51. Em 2016, entrou em vigor a Instrução Normativa 7 (Brasil, 2016) que suplementa a IN 62, prorrogando os prazos e os limites máximos para CCS. Para

as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste ficou estabelecido valores de CCS máximo de 500.000 células mL<sup>-1</sup> a partir de 01/07/2014 até 30/06/2018. Já para as regiões Norte e Nordeste, a partir de 01/07/2015 até 30/06/2019.

A CCS do leite do tanque de expansão é usada em todo mundo como um indicador para avaliar e monitorar a saúde da glândula mamária (Barkema et al., 2009). Serve de instrumento para tomada de decisões na abordagem da mastite, auxiliando em programas de controle e prevenção à mastite.

A variação da CCS de vacas em lactação pode ser influenciada por fatores como idade, parto, período de lactação, sazonalidade. No entanto, os principais fatores de variação da CCS estão associados às infecções da glândula mamária causadas por micro-organismos (Lopes Júnior et al. 2012).

Existe diferença na intensidade do processo inflamatório de acordo com o patógeno envolvido. Assim, agentes mais patogênicos contribuem com maior aumento da CCS. Estudos demonstram que uma glândula mamária saudável apresenta valores de CCS abaixo de 100.000 células mL<sup>-1</sup> e que valores superiores a 200.000 células mL<sup>-1</sup> são indicativos de infecção bacteriana intramamária. No entanto, não há um valor exato que pode ser usado como referência para diferenciar vacas infectadas das não infectadas (Schukken et al., 2003).

Philpot e Nickerson (1991) demonstraram relação inversa entre a produção de leite e a CCS (Tabela 1). Quando os valores de CCS extrapolam 200.000 células.mL<sup>-1</sup> observa-se aproximadamente uma redução de 2,5% na produção a cada 100.000 células mL<sup>-1</sup> a mais, chegando a uma perda de até 29% na produção.

Tabela 1 – Relação entre CCS de leite de tanque, quartos mamários infectados e porcentagem na perda de produção de leite

<b>CCS de leite de Tanque (x 1.000 células mL<sup>-1</sup> )</b>	<b>Quartos Mamários Infectados (%)</b>	<b>Perda na produção de Leite (%)</b>
200	6	0
500	16	6
1.000	32	28
1.500	48	29

Fonte: Philpot e Nickerson (1991)

A alta CCS de leite de tanque é associada com maior prevalência de mastite subclínica e patógenos contagiosos da mastite têm relação direta com o aumento da CCS. Bradley (2002) mostrou em seu estudo a variação da CCS do rebanho em relação a presença de patógenos contagiosos da mastite, como *S. aureus*. Verificou que em rebanhos com alta CCS (> 700.000 células mL<sup>-1</sup>) a presença de *S. aureus* era maior (18,3%) do que em rebanhos com CCS baixa (< 150.000 células mL<sup>-1</sup>), onde sua ocorrência não chegou a 3% (2,2%).

Portanto, o uso da CCS para monitorar a saúde da glândula mamária é uma ferramenta valiosa para estimar a presença de IIM, como por exemplo as IIM por *S. aureus*.



### 3.2 Mastite e *Staphylococcus aureus*

O conhecimento de doenças contagiosas que acometem o rebanho e o seu consequente controle dentro das fazendas é crucial para evitar perdas, tanto dentro da fazenda, como nas indústrias de laticínio. Uma das doenças infecciosas que compromete a saúde do úbere mais comuns e dispendiosas na bovinocultura leiteira em todo o mundo é a mastite (Barkema et al., 2009). Constitui um grave problema em gado leiteiro com consequências econômicas consideráveis (Sousa et al., 2007; Buzzola et al., 2001).

As causas de sua ocorrência são principalmente micro-organismos patogênicos. Um dos patógenos causadores da mastite bovina mais relevante é o *S. aureus*. Esse, uma vez estabelecido no rebanho leiteiro, é de muito difícil erradicação (Buzzola et al., 2001; Barkema et al., 2006; Osteras et al., 2006; Sousa et al., 2007; Langoni et al., 2011; Dufour et al., 2012; Castañeda Vasquez et al., 2013; Krewer et al., 2013). No entanto, muitos rebanhos têm alcançado sucesso por meio da implementação de programas de prevenção à mastite (Zadoks et al., 2002; Barkema et al., 2006).

A frequência de *S. aureus* como agente causador da mastite em explorações leiteiras brasileiras é elevada, variando entre 17 a 50% (Lee et al. 2012). A prevalência de infecção da glândula mamária com *S. aureus* pode ser reduzida por meio de práticas eficazes de gestão da saúde do úbere, que abrangem a implementação de programas de controle da mastite. Procedimentos de ordenha; correta escolha e uso de desinfetantes de tetos pós-ordenha; biossegurança para prevenir a introdução de patógenos; segregação e descarte dos animais cronicamente infectados; são aspectos relevantes desses programas. O sucesso depende ainda da identificação precoce de vacas infectadas por *S. aureus* e da rápida e adequada intervenção (Barkema et al., 2006).

Embora o conhecimento esteja disponível, o insucesso está associado a falhas na implementação do programa, não conformidade com suas estratégias, atitudes do produtor, falhas no treinamento de pessoal e baixo nível de encorajamento para a aplicação das medidas recomendadas (Barkema et al., 2009).

A transmissão do patógeno ocorre principalmente durante a ordenha. Os principais reservatórios desta bactéria são os quartos mamários infectados, a pele do úbere e tetos e as máquinas de ordenha representam importantes fontes. Podem ser isolados da pele e membranas mucosas de vacas e novilhas, mas podem ser encontrados também nos alimentos, solo, ar e água. Fossas nasais, casco, ordenhadores, sala e equipamentos de ordenha, meio ambiente, pele do úbere, fômites, entre outros fatores são possíveis fontes de contaminação do leite (Larsen et. al., 2000; Asperger, & Zangerl, 2001).

Casos subclínicos crônicos de mastite causada por *S. aureus* resultam em atrofia do alvéolo mamário, fibrose e micro abscessos, o que limita a ação fagocítica de células e a ação de antimicrobianos, causando infecções profundas no tecido mamário, com episódios de liberação de bactérias dos quartos mamários infectados acompanhados de altas CCS (Pyörälä, et al., 1995; Quinn et al., 2002). Como consequência, há redução significativa no potencial produtivo da glândula mamária, levando à diminuição da produtividade do animal.

Vários fatores de patogenicidade são produzidos por *S. aureus*, incluindo enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Embora a pasteurização elimine as células de *S. aureus*, enterotoxinas termoestáveis geralmente conservam sua atividade biológica em leite e produtos lácteos, fato que pode causar intoxicações alimentares estafilocócicas no consumidor (Lee et al., 2012).

As taxas de cura de mastite causadas por *S. aureus* podem variar consideravelmente. A probabilidade de cura vai depender de fatores individuais da vaca, patógenos e tratamento (Barkema, et al., 2006; Souza, 2007).

### **3.3 Resistência a antimicrobianos**

A terapia antimicrobiana é uma das principais ferramentas para o controle da mastite provocado por *S. aureus*, e a aplicação de testes de susceptibilidade podem direcionar a escolha do melhor tratamento. (Barkema, et al., 2006)

Embora haja vários agentes antimicrobianos disponíveis no comércio, a antimicrobianoterapia muitas vezes se mostra ineficaz, principalmente devido à administração incorreta, como por períodos menores que os recomendados, fato que contribui para uma seleção de amostras mais patogênicas, com conseqüentemente aumento da resistência a antimicrobianos, representando riscos à saúde humana (Buzzola et al., 2001; Lee et al., 2012).

O aumento de prevalência de *S. aureus* multirresistentes causadores de mastite bovina é grave, principalmente devido à redução da efetividade dos antimicrobianos, aumento da morbidade, e dos custos para combater a doença. Além disso, o seu uso indiscriminado pode favorecer a seleção de amostras bacterianas resistentes aos antimicrobianos e levar presença de resíduos nos alimentos, representando riscos à saúde pública (Souza et al., 2012)

Rabello et al. (2005) constataram que a susceptibilidade a várias classes de antimicrobianos é geralmente observada entre os isolados de bovinos. Observaram-se 44,9% de amostras de *S. aureus* sensíveis a todos os agentes antimicrobianos testados. Os isolados de algumas amostras de *S. aureus* revelaram alta taxa de resistência à penicilina /ampicilina (55,1%).

Resultado semelhante foi encontrado por Lange et al. (1999) que notaram taxa de 43,9% de amostras de *S. aureus* resistentes a estas duas drogas. A predominância de resistência a estes fármacos pode ser relacionada com a sua ampla utilização. Eles estão entre os antimicrobianos mais utilizados em medicina veterinária em todo o mundo (Lange, et al., 1999; Buzzola et al., 2001; Barkema, et al., 2006; Lee et al., 2012).

O monitoramento da resistência em *S. aureus* é importante, pois o uso incorreto de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no aumento da resistência. Tal conduta minimiza falhas terapêuticas e os riscos de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, problemas bastante atuais nos campos da saúde humana e animal.

### **3.4 *S. aureus* resistente à meticilina - MRSA**

Atualmente, MRSA de origem animal é um importante problema de saúde pública (Barkema *et al.*, 2009). O isolamento de MRSA a partir de animais de companhia tem sido relatado com certa frequência. Essa tendência está associada ao aumento de MRSA em seres humanos. Seu potencial de causar zoonose pode ser confirmado pela similaridade genética entre isolados de MRSA de humanos e animais e a partir de relatos de transmissões entre animais e seres humanos (Peterson *et al.*, 2012).

A resistência fenotípica à oxacilina é extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heteroresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que toda população bacteriana heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência. No entanto, nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma. MRSA são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (Lee *et al.*, 2012).

Sabe-se que a via de transmissão mais comum do *S. aureus* é o contato direto durante a ordenha. No entanto, sua transmissão pode ocorrer também por contato indireto de ambientes contaminados, sugerindo a utilidade de se coletar amostras ambientais para a vigilância do MRSA (Peterson *et al.*, 2012).

Peterson *et al.* (2012) estudaram a correlação entre a positividade de animais MRSA e o ambiente. Para desenvolver um método de amostragem ambiental e para determinar a correlação entre o animal e positividade MRSA ambiental no ajuste da fazenda, foram coletadas amostras de cavalos, de vacas e amostras ambientais de várias fazendas dos Estados Unidos. Os isolados foram identificados por métodos fenotípicos e genotípicos. Os autores observaram em seu estudo, correlações positivas significativas entre as amostras de MRSA em animais, fossas nasais e em isolados ambientais. Verificaram ainda que os isolados encontrados eram indistinguíveis pelo método genotípico, indicando o potencial para uso de amostragem ambiental em substituição de amostragem animal na vigilância em fazenda. Segundo os autores, devido a confiabilidade dos resultados encontrados, o método apresentado pode auxiliar no diagnóstico de MRSA animal.

Animais portadores de MRSA podem representar grande risco, sendo potencial reservatório e fonte ambiental de MRSA. Portanto, métodos eficazes de diagnóstico, prevenção e controle são essenciais para evitar sua disseminação. Caracterizações fenotípicas, automatizadas e moleculares são ferramentas importantes para estudar melhor as diferenças e especificidades de amostras bacterianas, seu relacionamento clonal e sua patogenicidade.

### **3.5 Caracterização Fenotípica de *S. aureus***

A caracterização de amostras pode ser utilizada para identificar as fontes de MRSA, para avaliar o papel de portadores, para diferenciar linhagens epidêmicas das endêmicas. Estudos de cultura com base na multiplicação de micro-organismos em

meio seletivo e sua posterior identificação em nível de gênero/espécie usando a caracterização fenotípica, representa a base do conhecimento da diversidade bacteriana em determinado ecossistema. Embora estes métodos sejam razoavelmente sensíveis, eles nem sempre permitem a discriminação de espécies ou amostras, nem a detecção das relações filogenéticas entre certos grupos de bactérias (Randazzo et al., 2009).

Após prévia identificação da bactéria, a partir de seu isolamento e enumeração, é possível estabelecer um perfil fenotípico do *S. aureus* bovino: bactéria pertencente à família *Staphylococcaceae*, do gênero *Staphylococcus*. São organismos anaeróbios facultativos, catalase-positivos, podendo ser oxidase-negativo. Diferenciam-se das outras espécies de estafilococos por produzirem enzima coagulase, e utilizarem os açúcares manitol e trealose, com produção de ácido após a fermentação. Em meios de cultura não seletivos, produzem colônias com crescimento satisfatório, e em meios seletivos (por exemplo em ágar contendo 5% de sangue de ovino desfibrinado) a bactéria se prolifera rapidamente (normalmente próximo de 24 h), produzindo colônias de 1 a 3 mm de diâmetro, convexas, com superfícies lisas, bordas circulares, opacas ou brilhantes, e hemólise. À microscopia, as células apresentam coloração Gram-positivo e formato esférico, que o designa cocos, e que apresenta morfologia de cocos isolados, aos pares ou agrupados em forma de cachos de uva, com 0,5 a 1,0 µm de diâmetro (Quinn et. al., 2011).

O teste mais importante na identificação de *S. aureus* é a prova da coagulase, que é a capacidade do micro-organismo, coagular o sangue de ovino, bovino, etc., característica que o distingue de estafilococos coagulase-negativos (SCN). Além do teste da coagulase, exames complementares são indicados a título de confirmação, como os testes de catalase, e o teste de Voges Proskauer (VP), entre outros (Bennet & Lancette, 2001).

O Conselho Nacional de Mastite dos Estados Unidos recomenda o teste de VP como um meio adicional para a diferenciação de *S. aureus* das outras amostras positivas à prova da coagulase. A reação de Voges Proskauer (VP) ou teste de produção de acetoina testa a formação do acetilmetilcarbinol, também conhecido como acetoina, a partir da glicose. Em presença de oxigênio atmosférico e hidróxido de potássio a 40%, a acetoina é convertida à diacetila e o alfa-naftol atua como catalisador para produzir um complexo de cor vermelha. Os isolados de *S. aureus* apresentam elevada (90%) produção de acetoina, quando comparadas aos isolados de *S. intermedius* e *S. hyicus* (Koneman et al., 2001; Cunha Neto et al., 2002). Dada a possibilidade de resultados atípicos com as provas diagnósticas em função da origem das cepas, o teste VP é importante para diferenciar amostras bacterianas.

O teste de antibiograma é também essencial nessa etapa de caracterização fenotípica para verificar a resistência /sensibilidade do microrganismo e seguir com a seleção do antimicrobiano mais adequado ao tratamento dos animais infectados.

A grande vantagem do método de identificação fenotípica é o isolamento do patógeno e a realização de antibiograma para seleção da terapêutica. Entretanto, estes são muito demorados, laboriosos, muitas vezes subjetivos e apresentam dificuldade de discriminar espécies intimamente relacionadas. Atualmente, métodos de diagnóstico rápidos automatizados têm se tornado comuns, como os que empregam tecnologia de

proteômica (como o MALDI-TOF- *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*) e os colorimétricos (como o VITEK® 2). Além deles, técnicas moleculares são fundamentais para a identificação precisa de genes de resistência.

### 3.6 Caracterização Automatizada de *S. aureus*

#### 3.6.1 MALDI-TOF

A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*. Trata-se de uma aplicação da espectrometria de massa, que é uma técnica analítica poderosa, utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e elucidar a estrutura e as propriedades químicas das moléculas. Basicamente, esta técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas (quebrar os átomos ou moléculas para que fiquem carregadas com mais ou menos elétrons do que o original) de uma amostra, na separação destes átomos ou moléculas em função da sua relação massa/carga ( $m/z$ ) e em seguida sua identificação e quantificação (Schulthess et al., 2014; Werner et al., 2012; Dec et al., 2016).

Diferentes abordagens desta técnica, baseadas em vários sistemas de ionização e detecção, têm sido desenvolvidas. Atualmente, um dos métodos mais amplamente utilizados para a análise de biomoléculas é o de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, cuja sigla em inglês é MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (do inglês *Time of flight*) (TanaKa, 2003; Wieser et al., 2012).

Resumidamente, a técnica da MALDI-TOF consiste na deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons ou  $H^+$  para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. Dessorção é um fenômeno pelo qual uma substância é liberada através de uma superfície. Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados para o analisador TOF, onde são acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo (sem qualquer gás ou molécula presente, como o espaço sideral), até que atinja o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com suas  $m/z$ , chegando ao detector em diferentes tempos (Croxatto et al, 2012)

Por se tratar de uma técnica de alta sensibilidade, mesmo em reduzida quantidade de amostra, e de alto rendimento de análises, esta tem sido amplamente utilizada para a caracterização de micro-organismos, atendendo a necessidade de diagnósticos rápidos e precisos para diversas doenças. Além disso, a mesma tem capacidade de analisar moléculas de massas elevadas e misturas complexas de biomoléculas (Paim et al., 2013). Considerando todas as vantagens mencionadas, atualmente esta técnica vem sendo avaliada como método potencial para análises de amostras de leite de vacas com mastite.

### 3.6.2 VITEK® 2

Vários são os métodos existentes e aplicados na rotina laboratorial. Entre eles estão os métodos automatizados, como o sistema VITEK® 2 compacto (bioMérieux). O sistema permite, pelo uso de cartões específicos, identificar amostras de interesse, bem como avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos a medida que estabelece valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). O cartão VITEK® 2 que permite a identificação de bactérias Gram-positivo é o cart. n. GP ID card (BioMérieux, Inc., Durham, NC, EUA) e o que determina a CIM necessária é o cat. n. AST-GP69 (BioMérieux, Inc., Durham, NC, USA).

Para determinar a resistência microbiana, o sistema utiliza cartões compactos de plástico com reagentes que contêm antimicrobianos e meios de teste em um formato de 64 poços. O VITEK® 2 compacto emprega monitorização turbidimétrica do crescimento microbiano durante o período de incubação, pelo qual o sistema lê os cartões a cada 15 minutos, utilizando três comprimentos de onda diferentes. O cartão é essencialmente uma versão miniaturizada e abreviada da técnica de dupla diluição para as CIM determinadas pelo método de micro diluição relatada por MacLowry & Marsh e Gerlach (1968). A média de tempo para a obtenção dos resultados é de 4-10 h para bactérias (Paim et al., 2014).

O cartão contém poços, sendo que o poço de controle positivo determina a forma como o micro-organismo se desenvolve sem inibição bacteriana. Cada um dos poços restantes contém alíquotas, o equivalente a porções pré-medidas e pesadas individualmente, de um agente antimicrobiano específico combinado com meios de cultura microbiológicos (Carbonnelle et al., 2007).

Embora, vários micro-organismos Gram-positivo tenham sido corretamente identificados pelo sistema VITEK® 2, algumas restrições desta técnica são descritas em outros trabalhos e levam à falha de detecção, principalmente quando as análises se referem a bactérias incomuns. Posteriormente, ferramentas complementares podem ser obrigatórias para detecção precisa de certas amostras em nível de espécie (Carbonnelle et al., 2007).

### 3.7 Caracterização Genotípica de *S. aureus*

O desenvolvimento de sistemas de genotipagem tem contribuído para a compreensão da disseminação de diversos agentes infecciosos e é fundamental para a vigilância epidemiológica de diversas espécies bacterianas (Cooper e Feil, 2004).

A limitação das técnicas microbiológicas tradicionais dificulta o real conhecimento da comunidade microbiana e seu papel na natureza. A classificação baseando-se em características fisiológicas e bioquímicas não se apresenta muito confiável para a avaliação da possível modificação da microbiota autóctone de um produto ou região. Portanto, para melhor entendimento da diversidade microbiana e seu papel na manutenção do ecossistema, outras técnicas complementares à abordagem microbiológica clássica são necessárias. Estudos epidemiológicos moleculares de isolados de *S. aureus* bovino têm mostrado que grande número de amostras está

envolvido na etiologia da mastite bovina mundial e que certos tipos parecem predominar dentro de regiões geográficas (Buzzola et al., 2001).

Métodos de identificação baseados na extração do DNA ou RNA oferecem a possibilidade de conhecer o perfil de membros não cultiváveis de uma comunidade microbiana, bem como a distinção daquelas que são metabolicamente ativas (Ndoye et al., 2011). A escolha dos métodos de tipagem mais adequados estão associados a fatores como viabilidade, custo, rendimento e reprodutibilidade.

Os sistemas baseados em DNA buscaram solucionar problemas das técnicas fenotípicas no que diz respeito aos três principais critérios utilizados para avaliar sistemas de tipagem: a habilidade de tipagem, reprodutibilidade e poder discriminatório (Mulligan; Maslow; Arbeit, 1993). Entre os sistemas de genotipagem existentes, destacam-se o PFGE que é padrão ouro para surtos de MRSA (Strommenger et al., 2006), e o *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) que é o padrão ouro para estudos populacionais (Maiden et al., 1998) e *spa Typing* que é um sistema específico para *S. aureus*, que além de sua simplicidade, rapidez e menor custo, pode ser utilizado tanto para investigações locais de curto prazo quanto para investigações globais de longo prazo (Koreen et al., 2004).

O conhecimento mais detalhado sobre a dinâmica de *S. aureus*, assim como o conhecimento da distribuição de *S. aureus* em rebanhos leiteiros é uma realidade e auxilia na formulação de estratégias para reduzir a propagação da infecção. Atualmente várias técnicas moleculares têm sido usadas com o objetivo de entender melhor a epidemiologia da mastite causada por *S. aureus*. Alguns dos métodos mais usados serão descritos a seguir.

### **3.7.1 PCR - Reação em cadeia pela DNA polimerase**

É uma técnica de amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos por reações de polimerização em cadeia da polimerase que permitem sintetizar em poucas horas *in vitro*, uma grande quantidade de determinado fragmento de DNA. Por essa técnica é possível isolar, caracterizar e identificar uma ampla gama de bactérias, incluindo aquelas para quais métodos de isolamento e cultivo em meios de laboratório ainda não foram desenvolvidos (Madigan et al., 2010).

A técnica de PCR permite a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilita a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma. É uma das mais empregadas nas diversas áreas do diagnóstico molecular e de grande utilidade na identificação rápida dos micro-organismos que dispõem de sequências de DNA específicas. Tem sido utilizada para o diagnóstico de doenças infecciosas e, vem sendo empregada como ferramenta na investigação epidemiológica de vários micro-organismos, como *S. aureus* (Boss et al., 2011; Andrade, 2012).

A técnica de PCR apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais de diagnósticos: é confiável, reprodutível, rápida, sensível, específica na identificação de patógenos e seus genes de enterotoxinas e altamente discriminatória. Permite detectar

micro-organismos tanto em células ativas como em inativas, sendo então capaz de identificar *S. aureus* capazes de produzir toxinas termo resistentes. Entretanto, a desvantagem é o alto investimento em equipamentos e reagentes para implementação na rotina laboratorial e a complexidade da análise (Pereira et al., 2002).

Pensando nessa desvantagem, outras técnicas foram desenvolvidas tendo como base os mecanismos da reação de PCR.

### 3.7.2 Spa-typing

*SPA Typing* é uma metodologia específica para tipagem de *S. aureus* que consiste em analisar o polimorfismo do gene da região X da proteína A de *S. aureus*. Esta região consiste em regiões repetidas de 24 pb que têm sua diversidade atribuída a deleções ou duplicações ou mais recentemente a mutações pontuais (Koreen et al., 2004).

De acordo com cada nova composição de base da repetição polimórfica encontrada numa estirpe é atribuída a um código de repetição único. A sucessão de repetição para uma dada tensão determina seu tipo de *spa*. O comprimento de repetição individual para o *spa* é geralmente de 24 pb, mas existem exceções de 21 a 30. Embora tipagem de *spa* seja uma técnica de digitação de único *locus*, oferece uma resolução *subtyping* comparável a técnicas mais caras e/ou laboriosas como *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) e *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). A técnica é amplamente utilizada para subtipagem de *S. aureus*.

Subsequentemente, para a análise e interpretação dos resultados, o software BioNumerics fornece um fluxo de trabalho totalmente automatizado, desde a importação de arquivos de rastreamento do sequenciador bruto até a atribuição de códigos de repetição e tipos de *spa*. Todos os problemas ou avisos durante o fluxo de trabalho são relatados e podem ser solucionados com um único clique do mouse.

O BioNumerics sincroniza automaticamente assinaturas de tipo de repetição e *spa* com o SeqNet / Ridom *Spa Server* e adquire instantaneamente novos tipos de *spa* do *Spa Server*. Em colaboração com a SeqNet e a Ridom GmbH, a BioNumerics utiliza os protocolos de autenticação e de controle de qualidade exigidos pela base de dados do servidor. Além disso, a BioNumerics oferece uma rica plataforma de banco de dados e análise, onde os dados de digitação de *spa* podem ser agrupados e analisados (Applied Maths®, Inc., Austin, TX, USA).

### 3.8 Diversidade genética de *S. aureus*

Estudos realizados em todo o mundo sobre a diversidade genética de *S. aureus* isolados de vacas com mastite bovina por meio de técnicas moleculares têm revelado que apenas amostras especializadas são responsáveis pela grande maioria dos casos de mastite em uma fazenda e que algumas dessas amostras de *S. aureus* podem ter ampla distribuição geográfica, que podem apresentar diferenças de acordo com a distribuição



e ainda que umas podem ser mais contagiosas, patogênicas ou persistentes que outras (Larsen et al., 2000; Smith et al., 2005).

De acordo com outros autores, algumas poucas amostras são responsáveis pelos casos de mastite em todo o mundo. Esses resultados demonstram que o controle de mastite deve ser focado sobre amostras específicas de *S. aureus* causadoras da mastite em um dado rebanho (Kapur et al., 1995; Larsen et al., 2000; Zadoks et al., 2000; Buzzola et al., 2001; Mork et al., 2005; Rabello et al., 2005; Lundberg et al., 2014).

A hipótese de que *S. aureus* humano não desempenhe papel importante como fonte de IIM bovina, e que *S. aureus* bovino e humano podem constituir subpopulações distintas de espécies de *S. aureus*, foi suportada pelos estudos de Larsen et al. (2000). No entanto, os autores constataram que as mãos dos ordenhadores contaminadas com leite de animais com mastite podem servir de veículos de *S. aureus*, entre os bovinos. Verificaram ainda, que as mesmas amostras prevalecem por anos no rebanho, corroborando com relatos de impactos causados pela ineficiência do tratamento com antimicrobianos usados para controle da mastite causada por *S. aureus*. Enfatizou-se, portanto, a importância da melhoria dos tratamentos e maior controle do uso incorreto e indiscriminado desses medicamentos.

Souza et al. (2007) reforçaram a teoria de um único tipo de amostra principal, e ainda que esta amostra não demonstra especificidade do hospedeiro entre diferentes espécies animais (ovinos, caprinos, bubalinos e avestruzes) indicando capacidade de infecção e colonização de todos. Resultados similares foram encontrados por Buzzola et al. (2001) que verificaram número limitado de amostras na Argentina. Seus estudos indicaram prevalência de apenas duas amostras, variando consecutivamente, dentro de um período de oito anos.

Mork et al. (2005) investigaram IIM estafilocócica em gado leiteiro, com ênfase na persistência e distribuição das espécies de estafilococos e genótipos. Seis espécies de estafilococos que causam IIM persistente foram encontradas; *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. warneri*. Seu estudo verificou que apenas uma, ou poucas, amostras de cada espécie causava IIM persistente em vacas dentro de um mesmo rebanho.

Lee et al. (2007) usaram o método PFGE como ferramenta para identificar a diversidade de amostras de *S. aureus* em diferentes locais no interior das explorações leiteiras e como contribuem para a contaminação do leite a granel. Verificaram alta incidência de amostras de *S. aureus* em leite cru de tanques de expansão, e baixa incidência no leite cru colhido de vacas individuais e superfícies das mãos de ordenhadores. Ainda notaram alta similaridade entre amostras de *S. aureus* isoladas a partir do leite cru de animais individuais e do ambiente de ordenha.

No entanto, de acordo com Haveri et al. (2008), deve-se ter cautela nas interpretações, pois amostras idênticas de diferentes rebanhos podem abrigar diferentes genes de virulência e resistência. Colocar esses tipos na mesma classe de virulência pode ser uma simplificação exagerada. A importância relativa dos diferentes genes é mal compreendida. Há, portanto, a demanda de maiores estudos e melhor entendimento da

dinâmica da mastite estafilocócica, principalmente em populações maiores, tendo como principais focos: seus sítios de ação, fatores de resistência e genes de virulência.

### 3.9 Sítios extra mamários de *S. aureus*

O úbere da vaca é a mais importante fonte de *S. aureus*. No entanto, este patógeno pode ser isolado de vários locais extra mamários (fossas nasais, narinas, focinho, pele, entre outros) no animal, sendo provável que essas fontes sejam importantes na epidemiologia das IIM.

Há mais de duas décadas, estudos realizados por Matos et al. (1991) já evidenciavam a existência de infecções de *S. aureus* em novilhas nulíparas, sugerindo que outras fontes, que não o úbere da vaca em lactação, estivessem envolvidas na epidemiologia da mastite causada por este micro-organismo. Neste estudo, os autores constataram que embora fontes alternativas representem menor papel na propagação da doença, medidas devem ser utilizadas para minimizar a propagação de tais fontes, a fim de controlar ou mesmo erradicar a mastite por *S. aureus*.

Em estudo similar, Anderson et al. (2012) investigaram as possíveis inter-relações dos genótipos de *S. aureus* encontradas nas glândulas mamárias, em moscas do chifre, e em locais extra mamários, no Sudeste dos Estados Unidos. As amostras foram coletadas durante o verão, quando as moscas do chifre (*Haematobia irritans*) tinham maior incidência. Amostras coletadas incluíram amostras de leite de todas as vacas do rebanho em lactação, de colostro de novilhas que pariram durante o período do estudo, locais do corpo da novilha (boca, narinas e focinho), do ambiente onde as novilhas se encontravam (água, alimentos e solo / vegetação / pastagem), moscas do chifre e seres humanos (mãos e narinas). Todas as amostras foram testadas pelo método PFGE. Na totalidade das amostras, 19,9% foram positivas para *S. aureus*. Amostras positivas para *S. aureus* foram identificadas em 13,6% das amostras de leite e em 17,0% das amostras de colostro. Mais da metade das amostras da mosca dos chifres foram positivas para *S. aureus* (55,8%). Os resultados moleculares obtidos demonstraram semelhança de genótipos entre as amostras de mosca do chifre, amostras de colostro de novilha e amostras de leite de vaca. Com base nos resultados encontrados, conclui-se que locais do corpo novilha, amostras de colostro e de moscas podem representar importantes fontes de *S. aureus* para IIM em novilhas.

Congruente a isso, Haveri et al. (2008) sugeriram que, *S. aureus* isolados de locais extra mamários eram indistinguíveis dos isolados que infectam a glândula mamária e que esses locais podem, assim, agir como origens e reservatórios de IIM. Reforçaram ainda, que a contaminação na direção oposta não pode ser excluída. Verificaram que a pele do teto representa importante reservatório de IIM causada por *S. aureus*. Esta informação pode ser útil no planejamento de estratégias de controle de mastite em rebanhos que sofrem de *S. aureus* mastite.

Diante do exposto, confirma-se a necessidade de mais pesquisas para melhor entender a epidemiologia do *S. aureus* em sítios extra mamários, especialmente em novilhas, e propor possíveis medidas para controlar a infecção, principalmente em novilhas leiteiras jovens.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizadas amostras de leite individual de quartos mamários, previamente coletadas e congeladas, oriundas de duas fazendas comerciais nos municípios de Quartel Geral (Rebanho 1) e Juiz de Fora (Rebanho 2), localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.

Ambos os rebanhos possuíam alta CCS do leite de tanque ( $> 500.000$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Todas as vacas da raça Holandesa com produção média de  $16,68 \pm 0,97$  kg de leite/dia (rebanho 1) e  $23,86 \pm 1,30$  kg de leite/dia (rebanho 2) foram ordenhadas duas vezes ao dia.

A ordenha mecânica foi realizada em sistema de fosso, linha baixa, espinha de peixe, duplo 4x4, e as seguintes práticas de controle de mastite foram adotadas: teste de detecção de mastite clínica pelo teste da caneca de fundo escuro; *pré-dipping* e secagem dos tetos com papel toalha descartável. Após a ordenha, também foi realizado o *pós-dipping*.

A terapia de vaca seca e o tratamento de todos os casos de mastite clínica eram realizados rotineiramente em ambas as fazendas. Como ambos os rebanhos apresentam histórico de vacas com mastite por *S. aureus*, as vacas identificadas como infectadas por este patógeno eram segregadas e ordenhadas por último.

Os dados foram coletados entre os meses de janeiro de 2013 a janeiro de 2014 e as amostras foram provenientes de 36 vacas leiteiras, selecionadas de aproximadamente 270 animais de ambos os rebanhos.

As amostras bacterianas foram gentilmente cedidas por Souza (2015) e Cunha (2015).

### 4.2 Coleta das amostras

Para a coleta das amostras de leite, primeiramente os três primeiros jatos de leite foram descartados e logo após foi realizada a assepsia da extremidade dos tetos com um pedaço de algodão umedecido em álcool a 70%. Posteriormente foi realizada a coleta asséptica de amostras de leite, em duplicata de cada quarto mamário, em frascos estéreis (aproximadamente 4 mL), para análise bacteriológica.

As amostras de leite para determinação de CCS foram acondicionadas em frascos de 40 mL contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropane-1,3-diol). Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável e transportadas para o Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LabUFMG), onde foram submetidas às análises laboratoriais.

### **4.3 Determinação da Contagem de células Somáticas (CCS)**

As amostras de leite para determinação CCS foram acondicionadas em frascos de 40 mL contendo micro comprimidos com o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropane-1,3-diol). Imediatamente após a coleta, as amostras foram colocadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável e transportadas para o LabUFMG, onde foram submetidas às análises laboratoriais. As amostras de leite foram analisadas utilizando o equipamento Bentley CombiSystem 2300® (Bentley Instruments Inc. Chasca, EUA), segundo recomendações de *International Dairy Federation* (IDF, 1995).

### **4.4 Análise bacteriológica – leite**

A análise bacteriológica foi realizada por cultura de 0,01 mL de cada amostra de leite em placas de ágar-sangue preparado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha. As placas foram incubadas durante 24-48 horas a 37 °C.

As colônias isoladas no ágar sangue foram observadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise, seguido pelo teste de Gram e testes bioquímicos (Brito et al., 1999; Oliver et al., 2004). Os micro-organismos foram identificados a partir de subculturas em placas de ágar Brain Heart Infusion (BHI).

Os estafilococos Gram-positivos foram subdivididos em estafilococos coagulase-negativos (SCN) e os estafilococos coagulase-positivos (SCP). Entre os SCP, *S. aureus* foram identificados com base em teste de Voges-Proskauer (Brito et al., 2002). A amostra de leite foi considerada cultura-positiva quando o crescimento de  $\geq 1$  colônia de *S. aureus* foi detectado (Piepers et al. 2007). Foram consideradas um total de 218 amostras para análises subsequentes. As análises microbiológicas do leite foram realizadas na EMBRAPA - Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG.

### **4.5 Análise bacteriológica - Swab nasal (SN)**

Inicialmente, realizou-se o cultivo das amostras de SN em ágar seletivo Baird-Parker, que foram incubadas por 24-48 h a 37 °C. De cada amostra, selecionaram-se três colônias típicas e três colônias atípicas, que foram transferidas para caldo BHI isoladamente, e incubadas por 18 h.

Os isolados bacterianos foram congelados a - 80 °C em caldo BHI com 10% de glicerina estéril até a realização das análises bacteriológicas. Posteriormente, os isolados bacterianos foram reativados por cultivo em caldo BHI por 18-24 horas a 37 °C. Em seguida, foram semeados em ágar BHI por 48 horas a 37 °C. As colônias foram posteriormente submetidas à coloração pelo método de Gram e a testes bioquímicos de catalase e coagulase.

Os estafilococos Gram-positivos foram subdivididos em estafilococos coagulase-negativos (SCN) e estafilococos coagulase-positivos (SCP). Um total de 161 amostras,

entre SCP e SCN, foi direcionado para análise subsequente pelo método de identificação automático MALDI-TOF.

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia, no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Escola de Medicina Veterinária da UFMG.

#### **4.6 Identificação automatizada: proteômica – MALDI-TOF**

Foram analisadas 379 amostras, sendo 218 provenientes de amostras de leite, dos quatro quartos mamários, e 161 de SN. As amostras de leite já previamente identificadas em análises bacteriológicas, como *S. aureus*, foram confirmadas e identificadas pelo método MALDI-TOF. Os testes foram realizados no AQUACEN/RENAQUA, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Medicina Veterinária da UFMG.

A partir das amostras de *S. aureus*, congeladas em meio crioprotetor, retirou-se uma alçada, a qual foi reativada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), incubada por 24 h, a 37°C. Após turvação em meio de cultura, procedeu-se a semeadura em ágar BHI, seguida por incubação em estufa por 24h à temperatura de 37°C. As placas de BHI foram analisadas e posteriormente, foram selecionadas as colônias puras para identificação pela técnica de MALDI-TOF.

As medidas foram realizadas com um espectrômetro de massa UltrafarXMTreme MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com um laser Nd-YAG de 1000 Hz (neodymium-doped yttrium aluminium garnet). Em método direto e simples, uma única colônia bacteriana cultivada em ágar BHI foi transferida para uma mancha da placa alvo MALDI de aço inoxidável 384 MTP AnchorChip™ T F (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Subsequentemente, a amostra bacteriana foi coberta com 1 µL de ácido fórmico a 70% e depois com 1 µL de solução de matriz contendo 10 mg mL<sup>-1</sup> de ácido ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich, Poznań, Polônia) ajustado em 50% de acetonitrilo (Aldrich, Polónia) e 2,5% de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, Poznań, Polónia) ajustado em 50% de acetonitrilo (Sigma-Aldrich, Poznań, Polónia) e 2,5% de ácido trifluoroacético e secos ao ar (Schulthess et al., 2014, Werner et al., 2012, Dec et al., 2016).

A placa alvo MALDI foi então introduzida no espectrômetro para medição automatizada e interpretação de dados. Antes das análises, a calibração foi realizada com um padrão de teste bacteriano (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), contendo extrato de *E. coli* DH5-α.

Os espectros de massa foram processados com o pacote de software MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) contendo 3995 espectros de referência. Os resultados foram mostrados como os 10 primeiros jogos de identificação juntamente com valores de confiança variando de 0,00 a 3,00.

De acordo com os critérios recomendados pelo fabricante, 1 log (pontuação) inferior a 1,70 não permite uma identificação confiável; 1 log (pontuação) entre 1,70 e 1,99

permite a identificação ao nível do gênero; 1 log (pontuação) entre 2,00 e 2,29 indica identificação altamente provável ao nível do gênero e uma identificação provável ao nível da espécie; e 1 log (pontuação) superior a 2,30 (2,30 - 3,00) significa identificação altamente provável ao nível da espécie.

A análise de cada amostra foi realizada em triplicata (três pontos para cada amostra). Se as pontuações de log da primeira corrida fossem  $< 2,00$  ou uma amostra produzisse espectro de massa MALDI sem picos, realizava-se uma segunda execução. O resultado da identificação foi considerado confiável quando pelo menos os dois melhores resultados [log (score) 1,70-3,00] com a base de dados MALDI Biotyper indicaram a mesma espécie. Para amostras para as quais as duas primeiras correspondências indicaram espécies diferentes, considerou-se a primeira partida, desde que o log (pontuação) fosse maior que o valor para a segunda partida de  $\geq 0,30$ .

#### **4.7 Identificação automatizada: colorimétrica – VITEK® 2**

Onze isolados de SN preliminares identificados como SCP por testes bioquímicos (catalase e coagulase) foram também submetidos ao teste confirmatório pelo sistema compacto automatizado de identificação bacteriana VITEK® 2 (BioMérieux, Inc., Durham, NC, USA) utilizando cartão para bactérias Gram-positivo (cart. n. GP ID card, BioMérieux, Inc., Durham, NC, EUA). Foram seguidos procedimentos e instruções previstos pela empresa para preparação, inoculação e incubação dos isolados. O cartão foi automaticamente preenchido por um dispositivo a vácuo, inserido no módulo leitor-incubador VITEK® 2 (incubação a 35,5 °C) e submetido à medição de fluorescência cinética a cada 15 min. Os resultados foram interpretados e tabulados automaticamente pela base de dados ID-GPC.

As análises foram realizadas no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

#### **4.8 Extração de DNA**

De um total de 379 amostras, foi realizada a extração de DNA de 126 amostras selecionadas previamente. Dessas, 115 eram provenientes de amostras de leite e 11 de *swab* nasal (SN).

Para a escolha das amostras de leite, levou-se em consideração os casos de mastite subclínica persistente e transiente. Vale ressaltar que foi considerado como caso transiente, a IIM que estava presente em apenas uma amostragem. Quando não foi possível determinar o histórico da infecção intramamária transiente por *S. aureus*, ou seja, o isolamento do patógeno ocorreu apenas na primeira ou última amostragem, o isolado bacteriano não se enquadrou como proveniente de infecção intramamária transiente, por não ser possível determinar o histórico da infecção. As IIM foram consideradas de natureza persistente quando eram detectadas por pelo menos três amostras consecutivas (pelo menos dois meses).

Para a escolha das amostras de SN, selecionaram-se os casos identificados como *S. aureus* em pelo menos um dos testes anteriores.

A extração de DNA foi realizada a partir de culturas em caldo BHI, adaptada da metodologia descrita por Fan et al. (1995), com a substituição de tampão fosfato-salino (PBS pH 7,2) por tampão tris-EDTA (TE pH 8,0) e 1 mL de cultura foi centrifugado a 14.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado com 200 µL de TE (pH 8,0), homogeneizado e centrifugado por 13.000 g por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O botão bacteriano obtido foi ressuspenso em 50 µL de TE (pH 8,0). A suspensão de células foi então submetida à fervura direta, a 95°C por 15 minutos e em seguida congelada totalmente por aproximadamente 30 minutos. Finalmente, foi homogeneizada, centrifugada a 13.000 g por 5 minutos e o sobrenadante contendo o DNA liberado foi estocado a -20°C. As amostras de *S. aureus* ATCC números 25923 e 29213, cedidas pelo professor Bruno Penna do Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, foram utilizadas como padrão na obtenção do DNA dos isolados amostrados.

As análises foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP.

#### 4.9 Identificação Genotípica

As 126 amostras selecionadas de acordo com os critérios acima mencionados, que inicialmente foram identificadas como *S. aureus* por meio do isolamento em ágar sangue, coloração de Gram e por meio dos métodos bioquímicos convencionais, foram posteriormente submetidas a identificação molecular.

Inicialmente foi realizada a identificação do gênero *Staphylococcus* utilizando PCR duplex, tendo como alvo o gene do *16SrRNA* e utilizando os primers F (5'-GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3') e R (3'-CGC ACA TCA GC GTC AG-5'), de acordo com o proposto por Monday & Bohach (1999) para assegurar correta interpretação dos isolados negativos. O tamanho esperado do fragmento amplificado nesse caso foi de 228 pb.

Em seguida, o alvo da reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi uma porção do gene conservado da termonuclease (*nuc*), por meio do anelamento com os *primers* au-F3 e *au-nucR* presentes na tabela 1. Os *primers* e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram descritos previamente por Sasaki et al. (2010).

Tabela 2. *Primers* utilizados para a identificação do gene da termonuclease *nuc* de *S. aureus* isolados de leite bovino

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

Cada reação de amplificação foi realizada com 15 µL de solução contendo 7,0 µL de *GoTaq Green Master Mix*, 2X (cat. n. M7122, Promega®, Madison, EUA); 5,4 µL de água ultrapura; 0,3 µL de *primer* senso e 0,3 µL de *primer* anti senso, à concentração de 10

pmol e 2 µL de DNA da amostra a ser testada. O programa no termociclador (Labnet®, Edson, EUA) seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial à temperatura de 95 °C por 2 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 35 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos de extensão final de 72 °C por 2 minutos. Os amplificadores resultantes foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,5 % com adição de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta. Um controle negativo, sem a adição da amostra de DNA, um controle negativo da extração (TE pH 8,0) e um controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) foram utilizados em todas as reações.

As análises foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP.

#### 4.10 SPA Typing

As 126 amostras, pelos critérios mencionados no item 4.8, foram submetidas ao *spa Typing*. As análises foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP.

##### 4.10.1 Amplificação da região repetida da proteína A do *Staphylococcus*

As amostras foram submetidas à amplificação da região repetida da proteína A do *S. aureus* com os *primers* descritos por Harmsen et al. (2003), apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – *Primers* usados no SPA Typing

Referência GenBank	Gene	Posição Genoma	Primer	Sequência (5'-3')
J01786	Proteína A	1092-1113	<i>Spa1113F</i>	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC
		1534-1514	<i>Spa1514R</i>	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT

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

##### 4.10.2 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA

Na presença de banda única, obtida em gel de agarose, o produto foi purificado diretamente do amplificado, utilizando 2 µL *ExoSap-IT* (Affymetrix, Santa Clara, Califórnia, EUA) e 5 µL do produto da PCR, incubando a 37 °C por 15 minutos e então



80°C por 15 minutos. Já na presença de bandas múltiplas no gel, a banda desejada era cortada e purificada com o *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification kit* (n. cat. GFX, GE Healthcare, Chicago, EUA).

A purificação com o kit seguiu o protocolo de purificação de DNA a partir de gel de agarose de acordo com o fabricante. Iniciou-se adicionando 500 µL do buffer de captura tipo 3 à cada fatia de gel em microtubo DNase e RNase free, que após homogeneização por inversão foi incubado à 60 °C por 15 a 30 minutos até a agarose dissolver completamente. A mistura deve ser amarela ou laranja claro, mas se tornar-se rosa ou vermelha deve ser adicionado pequeno volume de aproximadamente 10 µL de acetato de sódio 3M pH 5.0. Após este procedimento, centrifugou-se a mistura brevemente para o líquido ficar no fundo do microtubo e então transferiu-se todo o conteúdo (no máximo 700 µL) para a coluna *GFX microspin* dentro de um microtubo coletor, fornecidos pelo kit. Incubou-se então à temperatura ambiente por 1 minuto antes de centrifugar a 16.000 x g por 30 segundos. Descartou-se o líquido no tubo coletor e adicionaram-se 500 µL do buffer de lavagem tipo 1 à coluna. Centrifugou-se a 16.000 x g por 30 segundos, descartou-se o líquido no tubo coletor e o procedimento de lavagem com o buffer tipo 1 foi repetido para maior pureza. Descartou-se o tubo coletor com o líquido e transferiu-se a coluna para um novo microtubo de 1,5 mL, DNase e RNase free. A eluição foi realizada com adição de 32 µL do tampão de eluição tipo 6 ao centro da membrana da coluna. Incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se a 16.000 x g por 1 minuto. O DNA purificado foi então armazenado a -20°C até a realização da reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento pelo método de Sanger utilizando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies®, Massachusetts, EUA) teve volume final de 10 µL. No caso da purificação com *ExoSap-IT* (Affymetrix®, Santa Clara, EUA) adicionou-se 1 µL de *Big Dye*, 1,5 µL de *buffer* 5X e 0,5 µL de primer 1095F (5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3') e 1517R (5'-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3'), como descrito por Harmsen et al. (2003) à mistura e no caso da purificação com o kit adicionou-se 7 µL do DNA alvo purificado à mistura de 1 µL de *Big Dye*, 1,5 µL de *buffer* 5X e 0,5 µL de primer 1095F (5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3') e 1517R (5'-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3'), como descrito por Harmsen et al. (2003) O programa no termociclador seguiu temperatura inicial de desnaturação de 96°C por 1 minuto e 40 ciclos de 96°C por 10 segundos; 50°C por 5 segundo; e 60°C por 4 minutos. O produto gerado foi então precipitado.

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

automático ABI-3500 (Applied Bisystems®, Massachusetts, EUA) para leitura das sequências.

#### 4.10.3 Edição de sequências

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

#### 4.10.4 Bionumerics

Para a análise das sequências obtidas e a correlação entre *espaço*, tempo e sequência tipo foi feita por meio do programa computacional BioNumerics 7 Applied Maths®, Inc., Austin, TX, EUA), de acordo com metodologia descrita por Abreu (2017).

A análise das sequências obtidas por *spa Typing* e a correlação entre *espaço*, tempo e sequência tipo foi feita por meio do programa computacional BioNumerics 7 (Applied Maths®). Ao importar as sequências é possível definir os parâmetros de montagem dos contigs, que foram utilizados no *default*, com o número máximo de bases não resolvidas reportado e o número máximo de inconsistências no alinhamento definido como 20.

Também foram utilizadas as configurações *default* para qualidade, montagem e consenso, uma vez que esses são os parâmetros exigidos para submeter novos tipos no *SpaServer*.

Após a montagem dos contigs, foi possível visualizar o relatório gerado, no qual os contigs que foram montados sem nenhum problema aparecem em verde (OK), os que tiveram inconsistências no alinhamento que puderam ser resolvidas quando aplicadas as configurações de consenso aparecem em laranja (Warning) e as que tiveram pelo menos um dos possíveis erros de montagem: o contig não atingiu os critérios de qualidade, mais de um contig foi criado, as posições de trimming - de início e/ou término - não foram encontradas, há bases mal resolvidas no consenso; aparecem em vermelho (Error).

O mínimo possível de edição manual foi realizado, para manter a qualidade das sequências obtidas. Apenas as sequências laranjas e vermelhas no caso de bases mal resolvidas que puderam ser editadas manualmente após clara visualização da base no cromatograma foram editadas manualmente, adquirindo a cor verde e o status Solved.

As sequências com status OK, Warning ou Solved tiveram então seus *spa* tipos definidos a partir de seu Repeat Sucession que é a sequência de repeat codes, ou seja, de repetições conhecidas.

O *spa* typing plugin no software BioNumerics permite a determinação automática das repetições e dos tipos, de maneira sincronizada com maior banco de dados de tipagem de *S. aureus* existente, o SeqNet/Ridom *Spa* Server (<http://www.spaserver.ridom.de/>), imediatamente adquirindo os tipos a partir do *Spa* Server.

Quando a sucessão de repetições está incompleta, o *spa* tipo é representado por “???” e quando a sucessão não está no banco de dados é determinada como “Unknown”. As primeiras foram removidas do presente estudo enquanto as segundas são apresentadas como Unknown, mantendo a nomenclatura automaticamente determinada pelo Bionumerics.

A construção dos dendrogramas e minimum *spanning trees* (MST) também foi realizada com auxílio do *spa* typing plugin do software BioNumerics. Neste é utilizado o modelo DSI (Duplication of tandem repeats, Substitutions and Indels) para alinhamento com base nas 42 repetições, no qual eventos de duplicação, substituição, inserção e deleção de repetições são levados em conta para montar uma matriz de similaridade.

No presente estudo, essa matriz foi montada com as configurações default. Os MST foram criados a partir de uma matriz de distância da similaridade entre as sucessões de repetição, com a menor distância entre os “galhos” possível e com o isolado com o maior número de relações no centro ou node. A distância entre os isolados é convertida para uma unidade chamada *distance bin size*, cujo default é 1%. Isso significa que duas sequências com similaridade de 100%-99% terão distância 0, enquanto duas sequências com similaridade de 99%-98% terão distância de 1. Já os dendrogramas criados também a partir das sucessões de repetição utilizaram a metodologia UPGMA (Unweighted Pair Groups Method Average).

#### **4.11 Sensibilidade aos antimicrobianos**

As análises de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, e no Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

As susceptibilidades aos antimicrobianos foram determinadas pela técnica qualitativa de difusão em disco Kirby Bauer, pelos métodos quantitativos - método automatizado colorimétrico *VITEK*® 2 Compacto (BioMérieux, Inc., Durham, NC, EUA) e E-test®, e por técnica molecular, à saber:

##### **4.11.1 Método Disco-difusão**

O antibiograma foi realizado em 218 amostras de leite e 11 de SN, por meio da técnica de difusão em disco de Kirby Bauer, de acordo com recomendações e critérios interpretativos do documento VET01-S2 do CLSI (2013) para mastite bovina. O controle da qualidade do teste foi realizado com a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Foram testados discos com os seguintes antimicrobianos (Sensifar®, São Paulo, Brasil): 10UI/30 µg cefoxitina (CFO 30 µg) e oxacilina 1 µg. De acordo com as zonas de inibição,

as bactérias foram classificadas em resistentes (R), intermediárias (I) ou sensíveis (S) aos antimicrobianos testados.

A escolha dos discos de cefoxitina e oxacilina deu-se para pesquisa de MRSA, e recomendações específicas para a pesquisa de resistência à meticilina incluem: incubação por 24 horas completas não excedendo a temperatura de 35 °C, em vez das recomendações gerais de incubar por 16 a 18 horas em temperatura de 37 °C. No entanto, a resistência pode ser reportada se houver crescimento depois de um mínimo de 16 horas de incubação.

Para cada amostra foram utilizadas três placas de 100 x 15mm, com dois antimicrobianos cada. Em cada placa, 100 µL do inóculo em meio BHI com turbidez de 0,5 Mcfarland (1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) foram adicionados e espalhados com auxílio de um *swab* estéril.

#### **4.11.2 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)**

##### **4.11.2.1 Método colorimétrico VITEK® 2**

A atividade antimicrobiana foi também avaliada pela mensuração da concentração inibitória mínima (CIM) necessária, pelo método *VITEK*® 2 Compacto (BioMérieux, Inc., Durham, NC, EUA), cartão para bactérias Gram-positivo (cat. n. AST-GP69, BioMérieux, Inc., Durham, NC, USA), para avaliar a inibição do crescimento dos micro-organismos testados. Foram avaliadas 218 amostras de leite e 11 de SN. O método permite fornecer resultados de identificação (ID) e de teste de sensibilidade a antimicrobianos (AST), com a CIM correspondente em apenas 5 a 8 horas. No entanto, para o interesse do estudo, foi apenas testada a sensibilidade aos antimicrobianos.

Após o isolamento do micro-organismo de interesse, os cartões AST-GP69 foram inoculados com uma suspensão do micro-organismo e assinalados com números de amostra. Em seguida, foi colocada a inoculação na cassette *VITEK*® 2 no Smart Carrier Station™. O cartão *VITEK*® 2 AST-GP69 e a amostra foram vinculados através de um código de barras. Após carregado o cassette, o instrumento fez todos os passos subsequentes para a incubação e a leitura. O *VITEK*® 2 obtém o resultado da CIM utilizando os dados do crescimento a partir do cartão *VITEK*® 2 AST-GP69.

O cartão AST-GP69 realizou os testes dos seguintes antimicrobianos: ácido fusídico, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, ampicilina/sulbactam; azitromicina, benzilpenicilina, cefalexina, ciprofloxacina, clindamicina, clorofenicol, doxicilina, enrofloxacina, eritromicina, gentamicina, imipinem, kanamicina, marbofloxacina, mupirocina, nitrofurantoína, oxacilina, norfloxacina, resistência induzida a clindamicina, rifampicina, teste *screening* de cefoxitina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol e vancomicina.

##### **4.11.3 E-test®**

Nove amostras com resultados divergentes nos métodos de análise de disco-difusão e *VITEK*® 2, entre elas oito de leite e uma de SN, foram retestadas pelo método E-test® (biomerieux®, Marcy-l'Étoile, França). A concentração inibitória mínima (CIM) dos

isolados de *S. aureus* foi determinada por tiras de E-test® para os antimicrobianos, oxacilina e cefoxitina, respectivamente.

O E-test® é um método quantitativo usado para avaliar a sensibilidade de micro-organismos aos antimicrobianos. Consiste de uma fita de plástico inerte, transparente, medindo 5,5 mm de largura por 60 mm de comprimento. De um lado da fita está impressa uma escala da CIM em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e do outro lado existe um gradiente exponencial do antimicrobiano, seco e estabilizado. A concentração varia de 0,016 a 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (oxacilina) ou  $\leq 2$  a  $\geq 4$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  (cefoxitina), dependendo do antimicrobiano distribuído ao longo da fita. O preparo dos inóculos, a semeadura e a incubação foram os mesmos descritos para o método de disco-difusão. A leitura foi realizada pela verificação, na escala da parte anterior da fita, do valor correspondente à intersecção da zona de elipse de inibição do crescimento bacteriano. Os resultados do estudo das CIMs dos antimicrobianos foram expressos por meio de: CIM 50% (Concentração de droga necessária para inibição de 50,0% da população bacteriana); CIM 90% (Concentração necessária para inibição de 90,0% da população bacteriana). A faixa de variação das CIM e proporção de amostras sensíveis a cada droga foram determinadas, segundo CLSI VET 2013.

#### 4.11.4 Pesquisa do Gene de Resistência à Meticilina

As nove amostras retestadas no E-test® foram confirmadas a partir da pesquisa da presença do gene de resistência à meticilina *mecA* pelo método descrito por Mehrotra et al. (2000). A pesquisa foi realizada apenas com as amostras consideradas resistentes ou indeterminadas em testes anteriores. Na tabela 4 estão descritos os *primers* que foram utilizados para a identificação dos genes de resistência à meticilina.

Tabela 4. *Primers* utilizados para a identificação do gene de resistência a meticilina *mecA*

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

Cada reação de amplificação foi realizada com 15  $\mu\text{L}$  de solução contendo 7,0  $\mu\text{L}$  de *GoTaq Green Master Mix*, 2X (Promega®, Wisconsin, EUA); 5,4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura; 0,3  $\mu\text{L}$  de *primer* senso e 0,3  $\mu\text{L}$  de *primer* anti senso, à concentração de 10 pmol e 2  $\mu\text{L}$  de DNA da amostra a ser testada.

O programa no termociclador (Labnet®, Edson, NJ, EUA) seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial à temperatura de 94 °C por 5 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 53 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os amplificados resultantes foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,5 % com adição de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta. Um controle negativo sem a adição da amostra de DNA, um controle negativo da extração (TE pH 8,0) e um controle positivo (MRSA1968 cedida pela professora Elsa Mamizuka do Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) foram utilizados em todas as reações.

#### **4.12 Análises Estatísticas**

Para verificar a concordância entre os diferentes métodos diagnósticos empregados no estudo, foram usados os testes Kappa (Guimarães et.al., 2016), sendo conduzidos no software InStat (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) e Excel. Para a avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos de *S. aureus*, foi utilizado o teste qui-quadrado e a análise de resíduo padronizado como teste post-hoc (Sokal & Rohlf, 1995), sendo realizados no software SPSS (SPSS® Statistical Software, NY, EUA) e Excel. Os testes estatísticos foram considerados a 5% do nível de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Identificação de *S. aureus*

Dos 36 animais avaliados, de dois rebanhos localizados em fazendas de duas regiões distintas em MG, 20 animais foram identificados com IIM por *S. aureus*, em pelo menos um dos quatro quartos mamários, e, portanto, selecionados, além de 11 animais com *S. aureus* em swab nasal.

Para a identificação e confirmação da presença de *S. aureus* nas amostras de leite e SN, diversos testes foram empregados. A começar por provas bioquímicas, passando por testes automatizados e confirmados com técnicas moleculares.

Os critérios utilizados para a escolha das amostras foram descritos no item 4 dessa dissertação. Os resultados encontrados para o número de amostras positivas para *S. aureus*, dos valores percentuais de concordância e da possível correlação entre os métodos, podem ser observados abaixo, nas tabelas 5 a 10.

Tabela 5. Número de amostras de leite de vacas positivas para identificação de *S. aureus* e seus valores percentuais, por diferentes métodos diagnósticos.

Método	Origem	N	Positivo	%
Testes Bioquímicos	Leite	218	218	100
MALDI-TOF	Leite	218	205	94,03
16 srRNA	Leite	115	114	99,01
au-nuc	Leite	115	110	95,65

Tabela 6. Porcentagem de amostras com resultados similares usando diferentes métodos para identificação de *S. aureus* em amostras de leite.

Método	MALDI-TOF	16 srRNA	au-nuc
Testes Bioquímicos	97,18 %	99,57%	97,83%
MALDI-TOF		97,75%	96,40%

Tabela 7. Número de amostras de swab nasal de vacas leiteiras, positivas *S. aureus* e seus valores percentuais, por diferentes métodos diagnósticos

Método	Origem	N	Positivo	%
Testes Bioquímicos	SN	161	13	8,07
MALDI-TOF	SN	161	9	5,59
VITEK® 2	SN	11	6	45,54
16 srRNA	SN	11	9	81,81
au-nuc	SN	11	6	54,54

Tabela 8. Porcentagem de amostras com resultados similares usando diferentes métodos para identificação de *S. aureus* em amostras de swab nasal.

Método	MALDI-TOF	VITEK® 2	16 srRNA	au-nuc
Testes Bioquímicos	83,33 %	80,00%	90,91 %	77,27%
MALDI-TOF		66,67%	72,22%	61,11%
VITEK® 2			70,00%	55,00%

Como observado nos resultados encontrados, a identificação de *S. aureus* em amostras de leite e de swab nasal por diferentes métodos foi variável. Ao considerar os isolados de *S. aureus* oriundos de amostras de leite, para que fosse possível traçar a concordância entre os diferentes métodos de análise empregados no presente estudo, foi padronizado o n amostral. Optou-se por padronizar o n amostral considerando o número de amostras realizadas nos testes de biologia molecular (ou seja, n=115) para que fosse possível traçar um critério comparativo, considerando que só poderíamos comparar as mesmas amostras.

Portanto, a correspondência entre os diferentes métodos, fenotípicos e genotípicos, de identificação de *S. aureus* em amostras de leite provenientes de quartos mamários com mastite, pode ser considerada como excelente. Esses resultados demonstram que, de acordo com os recursos disponíveis, quaisquer das metodologias podem ser usadas sem prejuízos nos resultados analíticos.

Ainda, entre as amostras de leite, observou-se correlação positiva entre os métodos diagnósticos *au-nuc* e 16 srRNA ( $r=0,49$ ,  $n=111$ ,  $p<0,0001$ ). Já entre as amostras de swab nasal, existiu uma correlação positiva entre os métodos diagnósticos VITEK® 2 e MALDI-TOF ( $r= 0,97$ ,  $n=9$ ,  $p<0,0001$ ).

Alguns autores encontraram alta similaridade entre a identificação bacteriana por testes bioquímicos e sistemas automatizados. El Behiry et al. (2014) compararam em seu estudo, métodos de identificação fenotípicos de identificação de *S. aureus* nas mastites, com os testes automatizados MALDI-TOF e VITEK® 2. Correlação de aproximadamente 95% e 92%, respectivamente, foram observadas, corroborando com os resultados encontrados no atual estudo.

Rodrigues et al. (2017) estudaram a relação de testes de identificação fenotípicas para amostras de enterobactérias causadoras de mastite e descreveram em seu estudo, que os resultados da técnica MALDI-TOF concordaram com os resultados dos testes bioquímicos em 92,9% (170/183).

Paim et al. (2013) reportaram em seu estudo, concordância de 100% (43/43), entre VITEK® 2, e o método fenotípico convencional de amostras de isolados de *S. aureus* provenientes de mastite, tanto para a avaliação de gênero, como de espécie.

Já Loonen (2012), em estudo comparativo entre o MALDI-TOF e teste de identificação de hemoculturas de sangue, para cocos Gram-positivo e Gram-negativo constatou que o MALDI-TOF foi o que demonstrou os melhores resultados e que cocos Gram-positivo foram corretamente identificados em 64% (33/52) das amostras. Já os Gram-negativo foram similares em 96% (45/47) quando comparados com as amostras de identificação por meio de provas bioquímicas.



Bizzini et al. (2010), em um estudo de revisão, observaram 97,7% de identificação correta de bactérias Gram-positivo em nível de espécie quando compararam testes de biologia molecular e de MALDI-TOF. Eigner et al. (2009) descreveram 95,2% de consistência entre MALDI-TOF e testes bioquímicos em 1116 amostras bacterianas e de leveduras previamente identificados na rotina clínica.

Uma das principais vantagens de se usar tecnologias automatizadas para a identificação bacteriana quando comparados aos métodos fenotípicos tradicionais e os de biologia molecular é o tempo para o resultado, que é reduzido (de 1 a 6 dias, para horas). Além disso, permitem a identificação bacteriana precisa de uma grande variedade de bactérias. O método de análises automatizado MALDI-TOF apresenta uma vantagem adicional, quando comparado ao *VITEK*<sup>®</sup> 2, por ser uma técnica de identificação de menor custo.

Os pontos acima mencionados são de grande importância para as áreas de saúde humana e animal. Podem se tornar um grande aliado para o diagnóstico de mastite, uma vez que permitem identificar patógenos mais rapidamente, possibilitando a realização de tratamentos mais precoces, aumentando as chances de sucesso, e evitando a transmissão de patógenos contagiosos entre os animais.

Atualmente na rotina diária de uma fazenda ou laticínio essa realidade é ainda distante, considerando os valores mais elevados dos métodos diagnósticos descritos. No entanto, considero que em um futuro muito próximo os métodos de análises automatizados como MALDI-TOF e *VITEK*<sup>®</sup> 2 serão recorrentes.

## 5.2 SPA typing

Após a confirmação das 116 amostras de *S. aureus* pela presença do gene da termonuclease *au-nuc*, prosseguiu-se à amplificação da região repetida da proteína A de *S. aureus*. O SPA typing está entre os principais métodos propostos de tipagem para *S. aureus*.

A principal vantagem desta técnica é sua simplicidade e rapidez, pois envolve o sequenciamento de um único *locus*. Como desvantagem destaca-se seu menor poder de discriminação entre as linhagens (Koreen et al, 2004). A figura 1 mostra o gel compatível com os resultados.

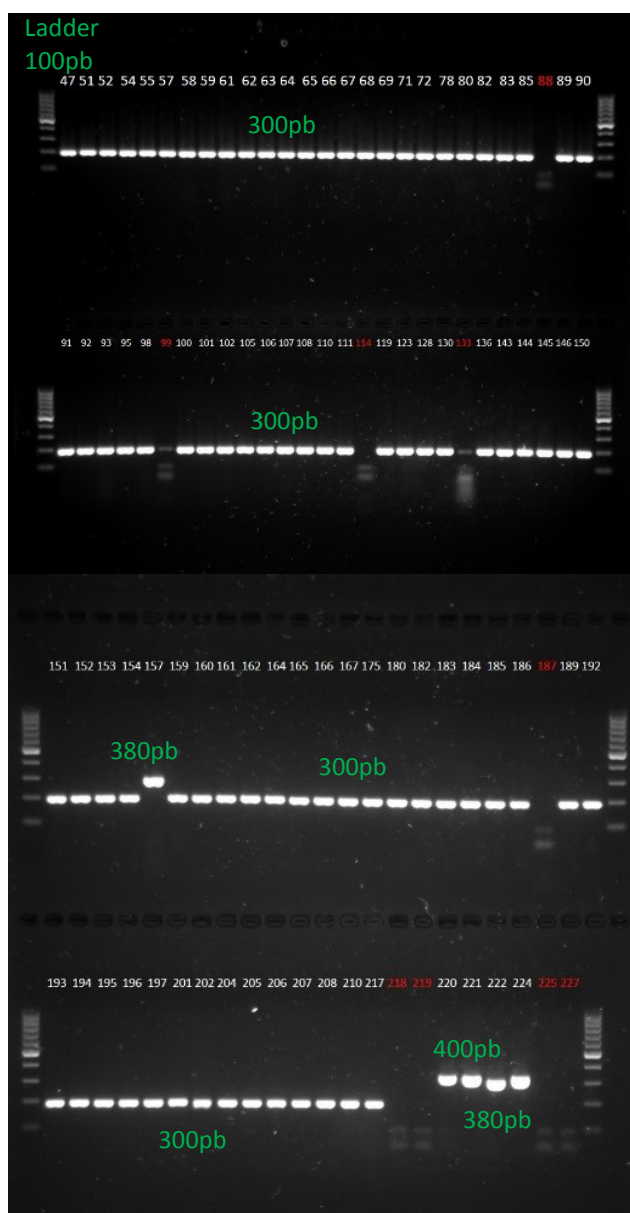


Figura 1: Gel com as bandas específicas compatíveis com a amplificação da região da proteína A de *Staphylococcus aureus*. Resultados em vermelho: negativos.

Como pode ser observado no Anexo 1, para cada uma das 116 amostras amplificadas na região da proteína A de *S. aureus* (110 correspondentes às amostras de leite e 6 de SN), foram identificados os genótipos de 4 *spa* tipos diferentes. Em 22 amostras (20 correspondentes às amostras de leite e 2 de SN), o *Bionumerics* não foi capaz de determinar o tipo, pois a sucessão de repetições presente não foi encontrada no banco de dados do *SeqNet/Ridom Spa Server*. Estas sequências foram denominadas *Unknown*. O termo diz respeito a amostras que ainda não foram tipificadas e por esse motivo, não se encontram no banco de dados.

Portanto, das 116 amostras positivas no *au-nuc*, apenas 94 foram tipificadas. O resultado encontrado foi de 94,68% (89/94) de *S. aureus* tipo t605 (100 % das amostras identificadas como t605 eram de leite), 3,19% (3/94) do tipo t098 (100% dessas eram amostras de SN); 1,06% (1/94) de *S. aureus* tipo t127 (amostra de SN) e 1,06% (1) de *S. aureus* tipo t189 (amostra de leite) como pode ser confirmado no anexo 1 e nas figuras 2 e 3.

Pela figura 2 observa-se que das 94 amostras, 55,31% (52) pertencem ao rebanho 1, da fazenda no município de Quartel Geral, sendo 93,46% das amostras do tipo t605 e 5,31% dos demais (t098, t127, t189). No rebanho 2, (fazenda localizada no município de Juiz de Fora) foram identificadas 44,68% (42) pertencentes ao rebanho 2, sendo 100% das amostras do tipo t605.

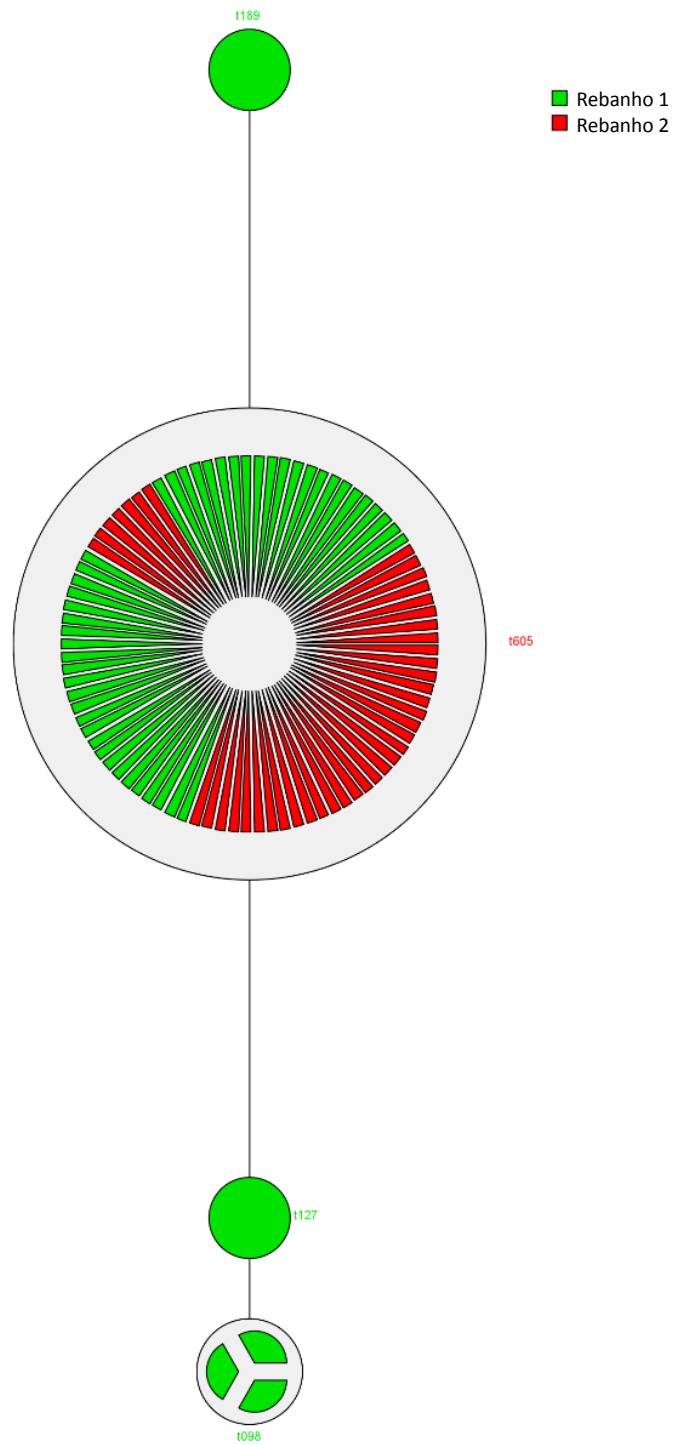


Figura 2: *Minimal spanning tree* (MST) dos tipos de *S. aureus* predominantes por rebanho.

No MST representado pela figura 3, pode ser observado os tipos predominantes em amostras de leite e amostras de *swab* nasal:

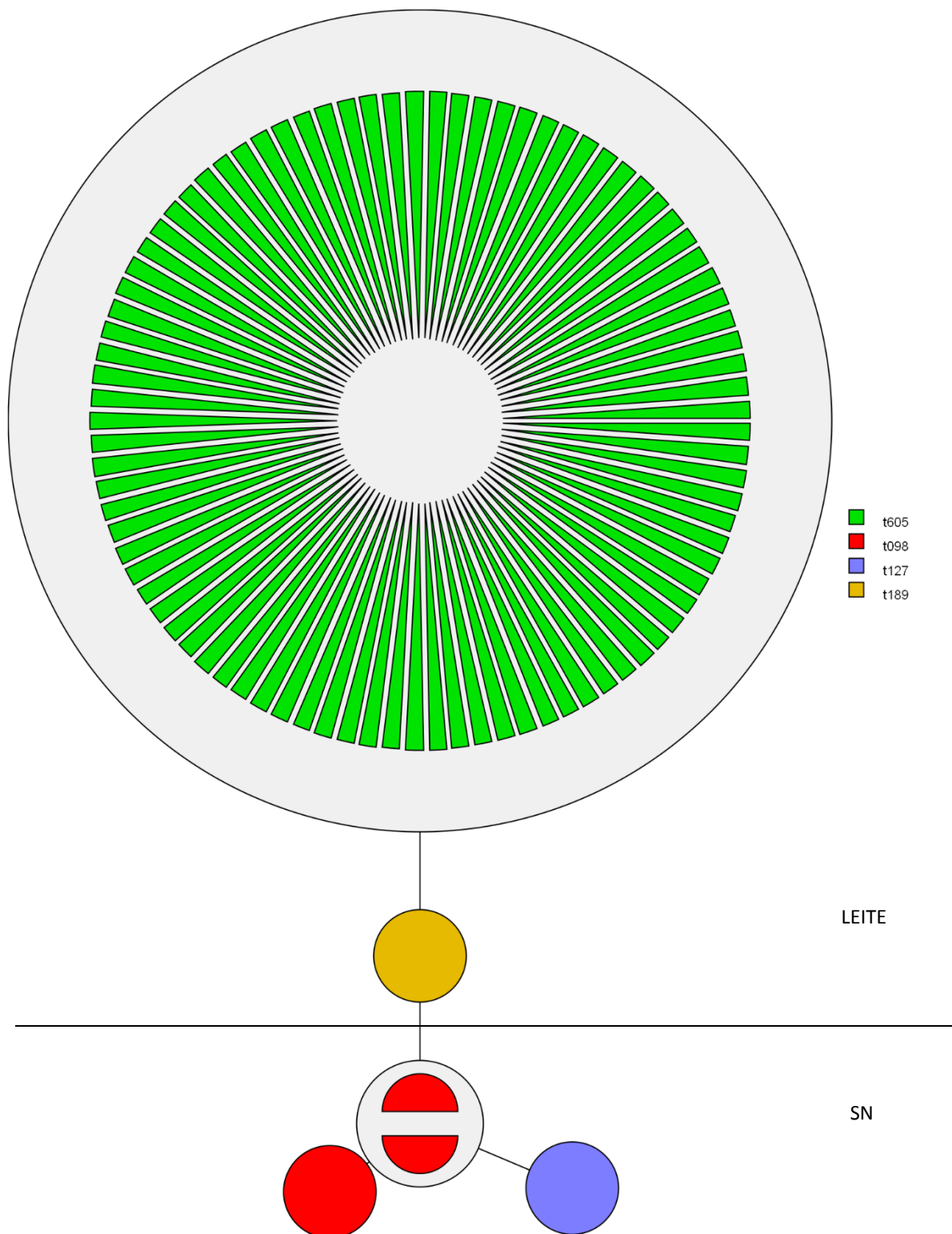


Figura 3: *Minimal spanning tree* (MST) dos tipos de *S. aureus* predominantes em leite e SN.

Pelos resultados encontrados, foi constatada ocorrência predominante do tipo t605 e baixa diversidade de linhagens genéticas, divergindo de alguns estudos já realizados no Brasil (Abreu, 2017; Silva et al., 2013, Silva et al., 2014). Esses trabalhos demonstram também alta ocorrência do tipo t605, mas, descrevem também outros tipos responsáveis por maior diversidade dentro e entre rebanhos. Ao contrário, no presente estudo observa-se a ocorrência de quase 100% desse único tipo.

De acordo com o banco de dados do *Ridom spa server* (<http://spaserver.ridom.de>), que considera todos os tipos de *S. aureus* já registrados, seja para amostras animais, como também para humanos, o tipo t605 tem uma frequência global relativa de 0,1% (dados coletados em janeiro de 2017), e está associado atualmente apenas a MSSA. Para os outros tipos encontrados nesse estudo, o servidor *Ridom spa server* indica que o tipo t127 tem uma frequência global relativa de 2,35% e há relatos dele associado à MSSA e MRSA. De fato, é o tipo mais citado na bibliografia estudada. Já o tipo t189, possui frequência de 0,50%, estando associado tanto à MRSA, quanto à MSSA e o tipo t098 tem frequência de 0,01% e está associado apenas à MSSA. Para esse último, não foram encontrados relatos associados com a ocorrência em rebanhos leiteiros.

Em estudo atual, realizado por Abreu (2017), realizou-se um rastreamento a partir de 270 isolados do estado de Minas Gerais, 61 do Rio de Janeiro, 32 de São Paulo e 6 de Goiás. Em seu estudo, a autora determinou 44 *spa* tipos diferentes, sendo os três mais frequentes t605 (57,45%), t002 (8,4%) e t127 (8,13%), corroborando com os achados no estudo atual. Foi o primeiro estudo no Brasil a utilizar o *spa* typing para avaliar uma coleção temporalmente diversa e, portanto, representativa da região estudada ao longo de 22 anos. Muitas eram de amostras individuais, mas havia também amostras coletadas de leite de tanques refrigeradores.

Ainda segundo Abreu (2017), os estudos de tipagem molecular mais comumente empregados em trabalhos com bovinos no Brasil foram realizados por *spa Typing* (Lange et al. 1999; Aires-De-Souza et al. 2007; Silva et al., 2013 e Costa et al., 2013), por sequenciamento *multilocus* (MLST) (Rabello et al., 2007; Silva et al., 2013; Oliveira et al., 2016) e por eletroforese em gel de campo pulsado PFGE (Rabello et al., 2007; Silva et al., 2013). Embora empregando diferentes metodologias para a tipagem de *S. aureus*, os resultados são na maioria das vezes muito similares, em que se observa a ocorrência de tipos mais recorrentes, de acordo com a região estudada.

No estudo mais antigo realizado no Sul do país por Lange et al. (1999), a técnica de *spa typing* foi utilizada sem análise das sequências, apenas comparando o tamanho das bandas obtidas após amplificação da proteína, logo possui menor poder discriminatório (Abreu, 2017). Na região nordeste, Costa et al. (2013) compararam o tamanho das bandas obtidas por *spa typing*, *coa typing* e *rRNA spacer typing*, à semelhança de Lange (1999), sem a realização de análise das sequências. O *spa Typing* foi utilizado em animais que não os bovinos por Aires-de-Souza et al. (2007) no Brasil.

Considerando outro estudo recente realizado no Sudeste brasileiro, Silva et al., (2013) determinaram a frequência de isolados de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) em amostras de leite de vacas com mastite. Foram sete tipos de *spa* identificados (% de isolados): t127 (44,6), t605 (37,5), t002, t1784, t2066 (1,8) e dois novos: t10856 (10,7) e t10852 (1,8). Ainda no estudo, demonstrou-se que o banco de dados MSSA isolados

com os tipos de *spa* t127 e t605, dois tipos encontrados no estudo atual, foram distribuídos em quase todas as regiões estudadas do estado de São Paulo.

Em estudos realizados fora do Brasil, observou-se também a ocorrência dos tipos encontrados aqui, especialmente o t605 e t127. No Canadá, os tipos t605 foram também observados por Said et al. (2010), mas em baixa frequência. Huber et al. (2009) encontraram quatro diferentes tipos t011 (n = 7), t034 (n = 11), t064 (n = 1), t127 (n = 1) na Suíça. Entre eles, um achado semelhante ao do presente estudo, foi a ocorrência de uma amostra t127. Os tipos t127 e t189 foram isolados também na Coreia (Hwang et al., 2010). Infere-se, portanto, que determinados tipos tem distribuição mundial. No entanto, alguns tipos são mais prevalentes em determinadas regiões.

Em trabalho realizado em frigoríficos de suínos, na Itália, o tipo t127 foi encontrado (Battisti et al., 2010). Ainda nesse estudo, os autores afirmam que é possível que a recuperação de amostras humanas em suínos represente contaminação de humano para os animais. O estudo reitera ainda que alguns tipos, como o t127, são de fato de origem antiga humana e que foram com o tempo selecionadas e adaptadas aos animais. Embora o trabalho seja em plantas frigoríficas, e com suínos, pode-se, contudo, perceber que a distribuição desse tipo também é relatada em outras espécies de animais, e que pelo descrito, pode estar fortemente associada ao potencial de zoonose de algumas amostras.

Dentre os resultados encontrados no presente estudo, o tipo t127 está entre as amostras identificadas de SN. Sabe-se que animais contaminados em fossas nasais com *S. aureus* podem disseminar a infecção para o ambiente. No entanto, pela diferença dos tipos identificados nas análises de leite (maioria *spa* tipo t605, com exceção de uma amostra identificada com o tipo t189) realizadas, não se pode dizer que os animais sejam fontes de infecção do patógeno nas fossas nasais, ou seja não há como afirmar que os animais que são portadores de *S. aureus*, apresentem o mesmo tipo de *S. aureus* responsável pela transmissão da mastite nos rebanhos.

Vale ressaltar que muitos desses tipos, embora diferentes, estão intimamente ligados. A relação entre mutações pontuais resultando em um pseudogene de *spa* e a patogenicidade de tipos de *S. aureus* é um ponto interessante para uma análise mais aprofundada (Hata et al., 2010).

Os resultados corroboram com a ideia de que a distribuição de *S. aureus* pode ser geograficamente dependente, sendo o tipo t605, por exemplo, pouco relatado no banco de dados e bastante comum no Brasil, inclusive sendo retratado em estudos de testes de outros alimentos.

Embora o tipo t605 seja pouco relatado em outros países do mundo, outro tipo encontrado no estudo foi o t127. De acordo com o trabalho de Hwang (2010), esse tipo está mais amplamente distribuído nas criações de bovinos mundiais.

Pelos resultados encontrados, a predominância de um número limitado de tipos que estão estreitamente relacionados como responsáveis pela mastite bovina de rebanhos distintos e dentro de rebanhos, sugere-se que as amostras pertencentes a estes tipos têm uma maior capacidade de propagação e de causarem IIM.

Outros estudos, que sugerem que relativamente poucos tipos de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de mastite em gado leiteiro, foram relatados ( Matthews et al. , 1994 ; Kapur et al. , 1995 ; Larsen et al. . , 2000 ; Mork et al. , 2005; Rabello et al., 2007 ). Portanto, a diversidade restrita de *S. aureus* associado às IIM em bovinos sugere que há nicho ecológico restrito de isolados deste patógeno, que são adaptados ao ambiente mamário (Le Maréchal et. al., 2011, Peton et. al., 2014, Bergonier et. al., 2014).

Uma dificuldade na análise, interpretação e armazenamento dos dados, reside na limitação de técnicas para se comparar os genótipos identificados entre diferentes metodologias empregadas e métodos utilizados.

De acordo com Bergonier (2014), ao contrário de outros métodos, o *spa-typing*, assim como com o MLST, apresentam em parte solução para esses problemas, uma vez que geram resultados, e estes são armazenados, compartilhados e facilmente acessados. No entanto, ainda segundo o autor, a genotipagem por MLST, tem baixo poder discriminatório e alto custo. Já tipagem de *spa* é baseada no sequenciamento de um único *locus* de repetição altamente polimórfico mostrando variações internas de unidades de repetição. Para o autor, o método sozinho não apresenta robustez, sendo muitas vezes usado associado ao MLST. Nesse sentido, o desenvolvimento de vários esquemas, como o Número Variável de Repetições Tandem (MLVA) tem sido uma alternativa e representa um complemento promissor ao MLST e *spa typing*.

De acordo com a identificação pelo método MLVA, Bergonier (2014) sustenta a ideia que características compartilhadas pelas cepas estão associadas à especificidade tecidual. O estudo mostra alguns tipos altamente específicos e fornece evidências de que esta linhagem adaptada às glândulas mamárias se diversificou recentemente de um antepassado com uma suposta origem humana através da aquisição de elementos genéticos móveis e da decomposição gênica. Ainda relata características fenotípicas específicas associadas a cepas de *S. aureus* animais e subsequentemente enfatiza a existência de ecovares adaptados a espécies de hospedeiro particulares. Sugere inclusive que os ruminantes sejam os hospedeiros de preferência desses patógenos. Reforça ainda que um número pequeno de tipos compreende a maioria dos animais, especialmente, dos isolados mamários. Adicionalmente, indica que há algumas cepas altamente específicas e outras bem disseminadas entre populações humanas e animais. Sugere que o índice de diversidade entre amostras de isolados da glândula mamária é menor do que de outros animais domésticos e humanos. Conclui, por fim, que é preciso identificar melhor a evolução e emergência de clones adaptados ao hospedeiro ou adaptados ao úbere.

Para que os estudos sobre a disseminação dos vários genótipos em todo o mundo não sejam apenas especulações, é salutar que o conhecimento da evolução dos tipos de *S. aureus*, considerando a epidemiologia e os níveis mais elevados de virulência, sejam menos evasivos e mais eficientes. Nesse sentido, é importante primeiro entender o micro-organismo, para depois conseguir compreender melhor a doença. Combinações de abordagens de tipagem que passem a associar dados epidemiológicos e fenotípicos parece uma estratégia mais interessante, tanto para a pesquisa, como para a aplicação no campo.



## 5.3 Resistência aos Antimicrobianos

### 5.3.1 MRSA: Isolados de amostras de leite e swab nasal

MRSA têm sido o foco de recentes estudos em gado leiteiro, considerando que o patógeno *S aureus* é um dos mais importantes quando se trata de mastite bovina, provocando perdas econômicas significativas na indústria de leite.

Os resultados encontrados referentes à MRSA obtidos nesse trabalho, encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Susceptibilidade de *S. aureus* isolados de leite e de swab nasal aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina pelos métodos antibiograma e MIC- VITEK® 2

Antimicrobiano	Método	Origem amostra	S N (%)	I N	R N (%)	RF N (%)	Total
Oxacilina	Antibiograma	LEITE	215 (98,62)	0 (0,00)	3 (1,37)	0 (0,00)	218
Oxacilina	MIC - VITEK® 2	LEITE	205 (94,90)	1 (0,46)	9 (4,16)	0 (0,00)	216
Cefoxitina	Antibiograma	LEITE	218 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	218
Screening de Cefoxitina	MIC - VITEK® 2	LEITE	208 (96,29)	0 (0,00)	6 (2,75)	4 (1,85)	216
Oxacilina	Antibiograma	SN	11 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
Oxacilina	MIC- VITEK® 2	SN	10 (90,90)	0 (0,00)	1 (9,09)	0 (0,00)	11
Cefoxitina	Antibiograma	SN	11 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
Screening de Cefoxitina	MIC- VITEK® 2	SN	10 (90,90)	0 (0,00)	1 (9,09)	0 (0,00)	11

#### LEGENDA:

S = Sensível

I = Indeterminado

R = Resistente

RF = R. forçado

Para o antimicrobiano oxacilina, 215 amostras de leite foram sensíveis e três foram resistentes no antibiograma. Já no VITEK® 2, 205 foram sensíveis, uma foi indeterminada e nove resistentes. Embora numericamente se distingam, não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os valores sensível ( $P = 0,69$ ) nos diferentes métodos (antibiograma e VITEK® 2). Também não foi observada diferença entre os valores “resistente” ( $P = 0,19$ ).

Em relação à cefoxitina, 218 amostras de leite foram sensíveis e nenhuma amostra foi resistente no antibiograma. Já no VITEK® 2, 208 foram sensíveis, seis foram resistentes e quatro, resistentes forçadas. Entre os resultados sensíveis para cefoxitina (leite), não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os métodos ( $P = 0,73$ ). Para o resultado indeterminado não foi observado nenhum resultado.

No caso de sensibilidade à oxacilina em amostras de swab nasal (SN), não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os métodos ( $P = 0,82$ ). Observaram-se 11 resultados sensíveis no antibiograma e nenhum resistente. No VITEK® 2 foram dez amostras sensíveis e uma resistente. Resultado indeterminado não foi observado.

Em relação aos resultados sensíveis à cefoxitina em amostras de swab nasal (SN), não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ( $P = 0,82$ ). Não foi observado nenhum resultado indeterminado e resultado resistente, não foi observado para o antibiograma. Para o VITEK® 2, foi observada uma amostra resistente.

Nove amostras geraram dúvidas e tiveram resultados divergentes entre os métodos. Essas amostras foram testadas novamente pelo método E-test®. Subsequentemente foram confirmadas a partir da pesquisa da presença do gene de resistência à meticilina *mecA* pelo método descrito por Mehrotra et al. (2000).

Embora tenham dado inicialmente resistentes ou suspeitas nas técnicas de antibiograma ou pelo método *VITEK*® 2, quando confirmados por testes moleculares, não houve a identificação do gene de resistência à meticilina *mecA*, como pode ser observado na figura 4. Pode-se inferir, portanto, que não se trata de amostras de MRSA.

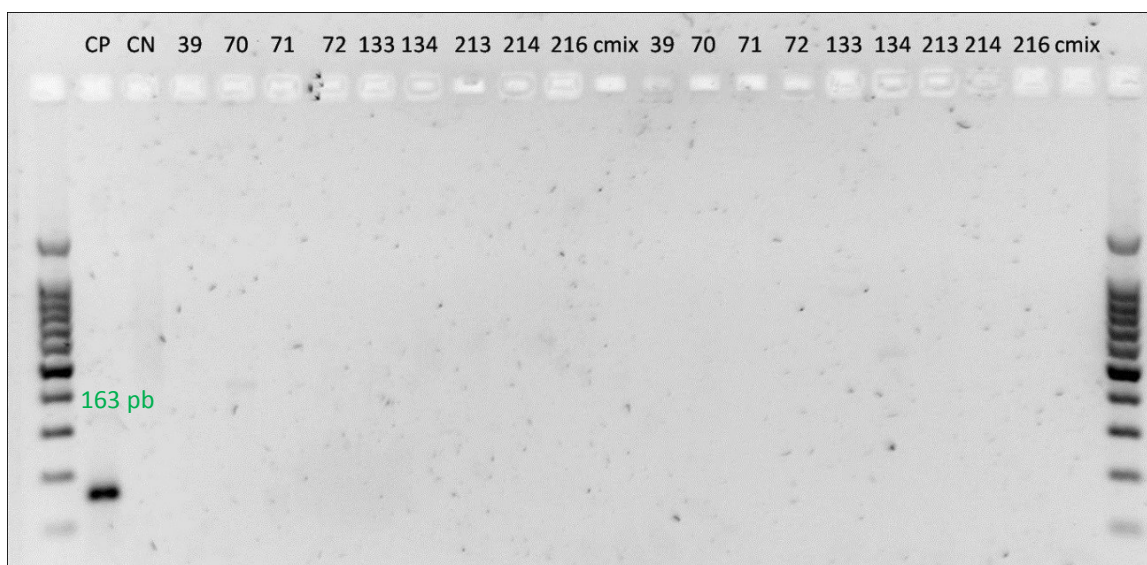


Figura 4: Gel sem as bandas específicas compatíveis com a padrão do gene de resistência à meticilina *mecA* (163pb), CP: controle positivo, CN: controle negativo.

Embora haja recomendações variadas sobre o diagnóstico laboratorial de MRSA, a verdade é que ainda não existe consenso sobre qual ou quais métodos utilizar e quando utilizar cada um deles.

Infelizmente, muitos dos métodos disponíveis apresentam índices consideráveis de erros de diagnóstico, tanto para falsos positivos, como para falsos negativos. Em especial quando se analisam amostras de processos infecciosos invasivos, ou de infecções persistentes. Nesses casos, uma solução seria o uso de métodos adicionais ou confirmatório.

Em relação aos métodos automatizados, como o *VITEK*® 2, é difícil comparar os resultados dos diversos estudos consultados, visto que frequentemente ocorrem alterações nos cartões e softwares empregados. Ainda, ao realizar uma revisão bibliográfica, a acurácia do método por vezes é comparada à dos testes de disco-difusão e por outras sua sensibilidade e especificidade são evidenciadas como sendo muito baixas.

Nesse sentido, os testes de disco-difusão, incluindo o disco de cefoxitina, utilizando-se os pontos de corte do CLSI, parece ser a melhor opção, principalmente quando se considera a relação custos x acurácia.

A não detecção de MRSA, no presente estudo, em amostras de leite, está de acordo com alguns trabalhos realizados no Brasil (Abreu, 2017; Parada, 2011), que não encontraram também MRSA. De acordo com Abreu (2017), a ausência de resistência ao cefoxitin e à oxacilina reflete a ausência de resistência à metilicilina e a outras penicilinas anti-estafilocócicas, ou penicilinas estáveis à penicilinases.

No entanto, outros trabalhos recentes reportaram casos de MRSA no país, na Região Sudeste e no Nordeste. De acordo com Silva et al. (2014), em estudo no estado de São Paulo, isolados MRSA-ST398 resistentes a múltiplos fármacos foram recuperados em 11% de vacas com mastite de uma única fazenda.

No ano passado, Oliveira et al. (2016), em estudo similar na Paraíba, detectaram o gene *mecA* em 21 (7,8%) amostras de *S. aureus* provenientes de amostras de leite e 1 (0,37%) isolado da mão do ordenhador. Ainda em seu estudo, observaram que não houve resistência à vancomicina e que os isolados foram mais comumente resistentes à penicilina (43%), ampicilina (38%) e oxacilina (27%). Nenhuma amostra foi resistente à vancomicina. Os achados ainda mostraram, pelo método de PFGE, alta diversidade clonal entre os isolados. Baseado no MLST, foram identificados 11 tipos de sequências diferentes (STs 1, 5, 6, 83, 97, 126, 1583, 1622, 1623, 1624 e 1625) com quatro STs novos (ST1622-ST1625).

Coelho et al. (2009), em estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, observaram que 47% e 25% dos isolados de *S. aureus* foram resistentes à penicilina e oxacilina, respectivamente. Todos os isolados resistentes à oxacilina foram positivos para o gene *mecA*.

Amostras de MRSA associados a animais de produção são bem mais relatados em estudos realizados em outros países, especialmente na Europa, do que atualmente aqui no Brasil.

Rabello et al. (2005) constataram que a susceptibilidade a várias classes de antimicrobianos é geralmente observada entre os isolados de bovinos. Observaram-se 44,9% de amostras de *S. aureus* sensíveis a todos os agentes antimicrobianos testados. Os isolados de algumas amostras de *S. aureus* revelaram alta taxa de resistência à penicilina/ampicilina (55,1%). Resultado semelhante foi encontrado por Lange et al. (1999) que notaram taxa de 43,9% de amostras de *S. aureus* resistentes a estas duas drogas. A predominância de resistência a estes fármacos pode ser relacionada com a sua utilização geral. Eles estão entre os antimicrobianos mais utilizados em medicina veterinária em todo o mundo (Lange, et al., 1999, Buzzola et al., 2001, Barkema, et al., 2006, Souza et al, 2007, Lee et al., 2012).

De acordo com Silva et al. (2014), acredita-se que a origem de infecções por MRSA da amostra ST398, associada com o *spa*-type t011, encontrada no Brasil tenha sido inicialmente disseminada de suínos.

Segundo Abreu (2017), as teorias possíveis para a baixa prevalência de amostras mais patogênicas no Brasil relacionadas a animais de produção pode estar associada à menor densidade populacional que temos, quando comparados aos sistemas de produção intensivos na Europa, à competição com outros tipos de MSSA circulantes e melhor sucedidas (Golding et al. 2010) e, por último, à possibilidade do estabelecimento tardio de ST398 nas Américas (Weese, 2010).

Outra hipótese possível é a disseminação de tipos de MRSA relacionados aos seres humanos, aos bovinos. Nesse caso, a prevalência nos rebanhos menos tecnificados seria mais frequente, diferente do que ocorre no Sudeste do Brasil, onde o estudo da autora foi realizado e a exemplo do que ocorre na Europa e no Nordeste do Brasil, (Abreu, 2017).

Ainda são escassos os estudos sobre a epidemiologia do MRSA de isolados bovinos realizados no país. Alguns tipos, ou linhagens, de *S. aureus* estão sendo muito estudados em todo o mundo e o mesmo deve ocorrer aqui. Diante desse cenário, observa-se a necessidade de estudos e investigações mais detalhados sobre a atual realidade nos mais variados sistemas de produção de leite, em várias regiões do Brasil.

### 5.3.2 Multirresistência

Outros antimicrobianos foram também avaliados, nesse caso apenas no método VITEK® 2. O perfil de sensibilidade antimicrobiana de 202 amostras de leite e SN analisadas e positivas ao exame microbiológico encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados da análise de susceptibilidade dos antimicrobianos pelos métodos VITEK® 2. – MIC (cartão AST-GP69)

Antimicrobianos	Origem	S N (%)	I N (%)	R N (%)	RF N (%)	Total
	LEITE	195 (96,53)	2 (0,99)	<b>5 (2,47)</b>	0 (0,00)	202
<b>Ácido Fusídico</b>	SN	10 (90,90)	1(9,09)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
<b>(+)Ámoxicilina/Ácido Clavulânico (MIC)</b>	LEITE	194 (96,03)	0 (0,00)	<b>8 (3,96)</b>	0 (0,00)	202
	SN	10 (90,90)	0 (0,00)	1(9,09)	0 (0,00)	11
<b>Ampicilina/Sulbactam (MIC)</b>	LEITE	193 (95,54)	0 (0,00)	1 (0,49)	8 (3,96)	202
	SN	10 (90,90)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (9,09)	11
<b>(+) Azitromicina (MIC)</b>	LEITE	197 (97,52)	0 (0,00)	<b>5 (2,47)</b>	0 (0,00)	202
	SN	9 (81,81)	0 (0,00)	2 (18,18)	0 (0,00)	11
<b>Benzilpenicilina (MIC)</b>	LEITE	17 (8,41)	0 (0,00)	<b>185 (91,58)</b>	0 (0,00)	202
	SN	9 (81,81)	0 (0,00)	1 (9,09)	1 (9,09)	11
<b>Nitrofurantoina (MIC)</b>	LEITE	199 (98,51)	0 (0,00)	<b>3 (1,48)</b>	0 (0,00)	202
	SN	9 (81,81)	0 (0,00)	2 (18,19)	0 (0,00)	11
<b>(+) Ciprofloxacina (MIC)</b>	LEITE	197 (97,52)	5 (2,47)	0 (0,00)	0 (0,00)	202
	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
<b>Clindaicina (MIC)</b>	LEITE	197 (97,52)	1 (0,49)	<b>4 (1,98)</b>	0 (0,00)	202
	SN	8 (72,72)	1 (9,09)	<b>1 (9,09)</b>	1 (9,09)	11
<b>Clorofenicol (MIC)</b>	LEITE	201(99,50)	1(0,49)	0 (0,00)	0 (0,00)	202
	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
<b>(+) Doxiciclina (MIC)</b>	LEITE	107 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	107

	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	193 (95,54)	9 (4,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	202
<b>Enrofloxacina (MIC)</b>	SN	11 (100)	0 (0,00)	0(0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	197 (97,52)	0(0,00)	<b>5 (2,47)</b>	0 (0,00)	202
<b>Eritromicina (MIC)</b>	SN	9 (81,81)	0 (0,00)	2 (18,18)	0 (0,00)	11
	LEITE	110 (54,45)	0 (0,00)	<b>92 (45,54)</b>	0 (0,00)	202
<b>Gentamicina (MIC)</b>	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	194 (96,03)	0 (0,00)	<b>8 (3,96)</b>	0 (0,00)	202
<b>Imipenem (MIC)</b>	SN	10 (90,90)	0 (0,00)	<b>1 (9,09)</b>	0 (0,00)	11
	LEITE	110 (54,45)	0 (0,00)	<b>92 (45,54)</b>	0 (0,00)	202
<b>Kanamicina (MIC)</b>	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	196 (97,02)	6 (2,97)	0 (0,00)	0 (0,00)	202
<b>Marbofloxacina (MIC)</b>	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	196 (97,02)	6 (2,97)	0 (0,00)	0 (0,00)	202
<b>(+) Norfloxacina (MIC)</b>	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
<b>Resistência Induzida a Clindamicina (MIC)</b>	LEITE	202 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	202
	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	199 (98,51)	1 (0,45)	<b>2 (0,99)</b>	0 (0,00)	202
<b>Rifampicina (MIC)</b>	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	103 (50,99)	1 (0,45)	<b>98 (48,51)</b>	0 (0,00)	202
<b>Tetraciclina (MIC)</b>	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
<b>Trimetoprim/Sulfametoxazol (MIC)</b>	LEITE	201(99,50)	0 (0,00)	<b>1 (0,49)</b>	0 (0,00)	202
	SN	11 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11
	LEITE	197 (97,52)	0 (0,00)	<b>5 (2,47)</b>	0 (0,00)	202
<b>Vancomicina (MIC)</b>	SN	10 (90,90)	0 (0,00)	1 (9,09)	0 (0,00)	11

Observa-se por meio da análise pelo método Vitek® 2 que foi possível identificar alta ocorrência de resistência em muitas amostras. Para os antimicrobianos norfloxacina, marbofloxacina, ciprofloxacina, clorofenicol, enrofloxacina e doxiciclina não foram observados perfis de resistência, sendo, portanto, considerados os antimicrobianos mais eficazes.

Embora muitos estudos relatem resistência a mais de um antimicrobiano, a consideração de multirresistência deve ser cautelosa. Entende-se como amostras multirresistentes, os isolados que apresentarem resistência a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes. Ainda, de acordo com Magiorakos et al. (2011), somada a essa consideração, deve-se descartar a resistência à ampicilina, tendo em vista a sua distribuição mundial, não devendo, portanto, ser considerada epidemiologicamente significativa.

Assim, no presente trabalho, observou-se a ocorrência de multirresistência, como pode ser visto no anexo 1. Para a interpretação dos resultados, considerou-se o conceito de multirresistência proposto por Magiorakos et al. (2011) e portanto, descartaram-se previamente para a análise, as amostras de resistência à benzilpenicilina.

Resumidamente foram 49,00% (99/202) de amostras com multirresistência aos antimicrobianos, sendo: 44,55% (90/202) de multirresistentes à gentamicina, kanamicina e tetraciclina; 0,50% (1/202) de caso de multirresistência à cefoxitina, oxacilina, amoxicilina/ácido clavulânico; 0,50% (1/202) de amostras de multirresistência à oxacilina, ácido fusídico, amoxicilina/ácido clavulânico, azitromicina, clindamicina,

eritromicina, rifampicina e vancomicina; 0,99% (2/202) de amostras multirresistentes à oxacilina, ácido fusídico, amoxicilina/ácido clavulânico, azitromicina, clindamicina, eritromicina e vancomicina; 0,50% (1/202) de multirresistência à cefoxitina, oxacilina, ácido fusídico, amoxicilina/ácido clavulânico, azitromicina, clindamicina, eritromicina, nitrofurantoína e vancomicina; 0,50% (1/202) de resistência múltipla à cefoxitina, oxacilina, gentamicina, kanamicina, tetraciclina; 0,50% (1/202) de multirresistência à cefoxitina, oxacilina, amoxicilina/ácido clavulânico, rifampicina, e trimetopim e 0,99% (2/202) de casos de multirresistências aos fármacos cefoxitina, oxacilina, amoxicilina/ácido clavulânico, azitromicina, eritromicina, nitrofurantoína e vancomicina.

Apesar de no presente estudo não terem sido identificadas amostras de MRSA por análise molecular, os resultados de multirresistência revelam uma condição preocupante nos rebanhos estudados, inclusive, pelos casos associados à Vancomicina.

Alguns investigadores, ao trabalharem com amostras de *S. aureus* isoladas em rebanhos localizados em outros municípios de MG e em todo o Brasil, também observaram altas taxas de resistência aos antimicrobianos da classe farmacêutica da penicilina.

As taxas de resistência observadas no presente estudo para Benzilpenicilina (91,58%) pode ser indicativo de que, nos rebanhos estudados, *S. aureus* foram submetidos à alta pressão seletiva frente a esse antimicrobiano. Por outro lado, pode-se inferir ainda, que animais adquiridos e introduzidos no rebanho possuíam genes de resistência a esse antimicrobiano.

Valores similares ao encontrado no atual estudo foram descritos por Nader Filho (2007) e Cunha et al., (2006) que observaram 97,2% e 90% de resistência à penicilina, respectivamente.

Outros autores demonstraram altas taxas de resistência aos fármacos desse grupo. Andrade et al. (2000) e Cardoso et al. (2002) observaram resistência próxima de 70%. Freitas et al. (2005) observaram 80,0% de resistência à penicilina, enquanto Medeiros et al. (2009) relataram 72,8% de resistência para a ampicilina. Martins et al. (2009) encontraram em valores de 86,6%. Carmo et al. (2013) observaram perfil de resistência 86,7%. Andrade (2012) observou em seu trabalho, resistência de 71,2 % à penicilina.

Os valores encontrados para gentamicina (45,54%), também foram considerados relativamente altos no presente trabalho, contrapondo estudos já realizados. Ao contrário, Andrade et al. (2000), Oliveira et al. (2002) e Nader Filho (2007) demonstraram que a gentamicina foi a droga que ofereceu maior ação (89,4%, 100% e 98,6%, respectivamente) sobre *S. aureus*.

Portanto, recomendações destes antimicrobianos como princípios ativos eficientes no tratamento de mastites bovinas causadas por bactérias, como proposto por Langoni et al. (2000), atualmente devem ser revistas.

A observação de grupos de antimicrobianos com tendência de aumento no perfil de resistência está associada ao uso abusivo e muitas vezes, errôneo, de determinadas drogas na rotina da clínica veterinária. Vale ressaltar que outros mecanismos estão

associados na aquisição de resistência, como os mecanismos de transferência ou alteração de genes (mutação, conjugação, transdução e transformação) entre os microorganismos (Santos et al., 2006).

Abreu (2017) relata que a resistência a múltiplos antimicrobianos foi encontrada em 15/412 isolados (3,64%), se considerado o critério adotado por Schwarz et al. (2010) para análise de amostras provenientes de animais. Percebeu ainda que a multirresistência seria apresentada apenas por 4/412 estirpes (0,97%).

Assim como no atual trabalho, Carmo et al. (2013) observaram que o fármaco mais ativo contra *S. aureus*, foi a norfloxacin, com 100% de eficácia. Resultados semelhantes foram encontrados por Brito et al. (2001), na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e por Freitas et al. (2005), no Estado de Pernambuco, que observaram que a norfloxacin foi eficaz contra *Staphylococcus* spp. isolados de animais com mastite em 100 e 96%, respectivamente.

Costa et al. (2013), também no estado de Minas Gerais, encontraram resultados similares para os índices de resistência para enrofloxacin e florfenicol, com valores de 0,26 e 0,40%, respectivamente, sendo considerados, como no presente estudo, baixos. A boa eficiência da norfloxacin nestas regiões onde ocorreram os estudos, provavelmente está associada ao uso limitado desta droga nestes rebanhos.

Para que características como a resistência bacteriana e transmissão entre as espécies possam ser monitoradas, a caracterização genotípica é essencial. A identificação dos clones presentes na população permite melhorar o controle de clones emergentes. Além de ser muito utilizado em surtos para diferenciar linhagens com relação próxima. No sistema de vigilância de MRSA da Dinamarca, por exemplo, desde 2006 é obrigatória a notificação de todos os isolados, e desde 2007 estes são genotipados por *spa Typing* (Spoor et al., 2013). Isso permite a identificação de tendências nos genótipos obtidos como a observação da frequência de uma estirpe no país ao longo do tempo e a adaptação desta aos hospedeiros (Abreu, 2017).

## 5.4 Dinâmica da infecção e Contagem de Células Somáticas (CCS)

Para avaliar a dinâmica da infecção, foram utilizados como referência, entre outros parâmetros, as variações na CCS de amostras de leite individual, dos quatro quartos mamários, provenientes das 36 vacas estudadas.

A CCS do leite é um indicador usado para avaliar e monitorar a frequência de animais e quartos mamários com mastite subclínica em programas de controle e prevenção de mastite em todo o mundo. Na tabela 11, observam-se os resultados obtidos entre a comparação dos diferentes quartos mamários e a CCS do rebanho.

Tabela 11. Média  $\pm$  desvio padrão de CCS log células mL<sup>-1</sup> e CCS de amostras de leite de diferentes quartos mamários de vacas

Quartos mamários	Log CCS (média $\pm$ s)	CCS (média $\pm$ s)
AD	5,9 $\pm$ 0,6	1450307,7 $\pm$ 1686466,3
AE	5,9 $\pm$ 0,3	1150942,3 $\pm$ 955023,1
PD	5,8 $\pm$ 0,5	952970,6 $\pm$ 962399,9
PE	6,0 $\pm$ 0,4	1384351,9 $\pm$ 1317684,9

LEGENDA:

AD – anterior direito

AE – anterior esquerdo

PD – posterior direito

PE – posterior esquerdo

De acordo com as análises da tabela acima, não houve diferença estatística. Portanto, a CCS do leite dos diferentes quartos mamários foi similar para os quartos mamários anterior direito (AD), anterior esquerdo (AE), posterior direito (PD) e posterior (PE).

Ao contrário do que era esperado, não foi possível associar ainda CCS, persistência da IIM e perfil de resistência aos antimicrobianos, inclusive meticilina (MRSA) aos diferentes tipos de *S. aureus*; provenientes de casos de mastite subclínica transiente e persistente. Não foi possível relacionar algumas amostras e traçar uma melhor dinâmica da infecção. Vale ressaltar que foi considerado como caso transiente, a IIM que estava presente em apenas uma amostragem. Já as IIM foram consideradas de natureza persistente quando eram detectadas em pelo menos três amostras consecutivas, pelo período mínimo de dois meses.

Prováveis explicações para os resultados observados podem estar relacionadas primeiramente ao baixo número de amostras (três) de mastite subclínica transiente, comparativamente às 176 amostras encontradas referentes a casos de mastite persistente. Em segundo lugar, considerando-se as análises moleculares (amostras de leite), destaca-se que não foram encontradas amostras de MRSA e na tipificação, apenas dois tipos foram achados nas análises realizadas, sendo que um deles, com apenas uma ocorrência - entre eles o t605 predominante que representou 98,87% (89/90) e o t189, 1,11% (1/90). Por fim, para que fosse possível comparar as amostras de SN com as amostras de leite, tipos semelhantes deveriam ser encontrados, fato que não aconteceu. Os resultados de tipificação indicam se tratar de tipos diferentes. As



encontradas nas amostras de leite foram: t605 e t189 e nas amostras de SN: t.098 e t127).

Vale ressaltar que, pelos achados e considerando que a persistência da infecção é determinada pela relação agente, hospedeiro e ambiente, os fatores responsáveis por causar IIM persistentes podem estar associados aos fatores individuais dos animais, uma vez que os nichos ecológicos que causaram IIM entre bovinos foram diferentes. Nesse sentido, provavelmente as amostras que causam IIM são adaptadas ao úbere, ou seja, aquele habitat específico.

Sobre a taxa de cura, Barkema et al. (2006) relataram que as taxas de cura para mastites por *S. aureus* variam consideravelmente. Dependem de vários fatores da vaca, do agente etiológico e dos fatores associados aos tratamentos. Segundo os autores, as taxas de cura diminuem com o aumento da idade da vaca, aumentando a contagem de células somáticas, a duração da infecção e o número de quartos infectados, entre outros. Demonstrou-se que neste estudo, quartos traseiros têm uma taxa de cura menor em comparação com quartos dianteiros. Além disso, tratamentos de IIM de MRSA resultam em taxa de cura mais baixa. No entanto, o fator de tratamento mais importante que afeta a cura é a sua duração (Barkema et al, 2006).

Ainda, de acordo com Barkema et. al. (2006), tratamento de animais jovens com *S. aureus* é muitas vezes justificado com base na cura bacteriológica e o bom desfecho econômico, enquanto o tratamento de animais mais velhos, infecções crônicas ou isolados resistentes à penicilina deve ser desencorajado.

Nas fazendas estudadas, um motivo aparente que pode justificar a alta ocorrência de mastite persistente pode estar justamente associado ao fator que mais afeta a cura, ou seja, o tempo de tratamento. Como já descrito, o correto emprego do tratamento está associado ao maior sucesso.

Ademais ao emprego bem sucedido do tratamento, é importante salientar que medidas preventivas corretas como correto descarte do leite de animais medicados, respeitando-se períodos de carência; adequado manejo de ordenha; manejo de vacas secas e manejo de vacas com mastite clínica; monitoramento constante do rebanho e das medidas preventivas, medidas de biossegurança ao comprar animais, entre outras, são condutas fundamentais de se estabelecer em toda e qualquer propriedade.

Na prática, o sucesso do controle e prevenção da mastite em rebanhos leiteiros é avaliado por medidas de prevalência ou o nível de infecção do rebanho. A dinâmica da infecção deve ser entendida para que as recomendações de melhoria nos tratamentos, considerando uma padronização de processos sejam eficazes.

Nesse sentido, melhores mensurações do nível de infecções e taxas de cura, aplicação de ensaios de tratamentos bem sucedidos, definições de casos melhor estabelecidos, relação entre fatores do hospedeiro e amostras de *S. aureus* melhor entendidos, etc. permitem um melhor entendimento da dinâmica das IIM em rebanhos e podem auxiliar na definição de estratégias mais assertivas e direcionadas para o controle e prevenção da doença.

## 6 CONCLUSÕES

Pelo presente estudo, não foi possível correlacionar a dinâmica da infecção com os diferentes nichos estudados – IIM e SN. Ainda, não houve associação entre os diferentes tipos de *S. aureus*, quando comparadas amostras de leite e de fossas nasais.

Confirma-se a necessidade de se entender melhor a epidemiologia da mastite causada por *S. aureus*. Além disso, se faz necessário que o diagnóstico de patógenos seja rápido e eficaz.

Apesar de métodos de caracterização fenotípica tradicionais fornecerem a base do conhecimento, técnicas automatizadas podem ser uma alternativa a serem empregadas na rotina das fazendas para a triagem, considerando o baixo custo e rápido diagnóstico. Pode-se inferir, portanto, que os métodos de identificação de micro-organismos, MALDI TOF e VITEK® 2 são boas opções de testes de triagem. No entanto, principalmente para avaliação da resistência, o uso de testes padrão ouro são a escolha mais confiável e permitem melhor detalhamento e compreensão sobre o agente.

Conclui-se que são necessários mais estudos sobre os fatores de resistência e genes de virulência, principalmente os relacionados a multirresistência e a MRSA de origem animal. É importante ainda aprofundar o conhecimento sobre as linhagens genéticas circulantes entre a população de vacas com mastite, tendo em vista que atualmente a resistência aos antimicrobianos representa um importante problema de saúde pública.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse foi o primeiro estudo realizado no Brasil de perfil de resistência por tipagem pelo método *spa typing*, considerado padrão ouro, realizado em isolados de *S. aureus* de casos de mastite persistente e transiente e nicho extra mamário (*swab* nasal). Sugere-se que mais estudos sejam realizados para melhorar a compreensão dos processos epidemiológicos envolvidos na mastite causada por este patógeno.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABREU, J. A. P.; **Estudo da diversidade molecular de linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados de mastite bovina**. 2017. 89p. Dissertação (mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 12, p. 3845-3849, 2007

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

ANDERSON, K. L., LYMAN, R., MOURY, K., RAY, D, WATSON, D. W., &CORREA, M. T. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. **J. Dairy Sci.**, v. 95, p. 4921–4920, 2012.

ANDRADE, H. H. **Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovinas no Distrito Federal e entorno**. 2012. 60 p. Dissertação (mestrado em saúde animal), Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília.

ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 115, 2016.

ANDRADE, M. A.; FILHO, F. C. D.; MESQUITA, A. J. Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciênc. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.

ASPERGER, H., e P. ZANGERL. ***Staphylococcus aureus***. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Roginski, J. W. Fuquay, and P. F. Fox (Eds). Academic Press and Elsevier Science, London, UK, v 4. H. p. 2563–2569, 2001.

BARKEMA H.W., GREEN. M. J., BRADLEY.A.J., ZADOKS.R.N. Invited review: the role contagious disease in udder health. **J. Dairy Sci.**, v.92, p 4717-4729, 2009.

BARKEMA, H. W., Y. H. SCHUKKEN, T. J. G. M.; LAM, M. L.; BEIBOER, H.; WILMINK, G. B.; e BRAND, A.. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.411–419, 1998.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y.H. e ZADOKS, R. N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis **J. Dairy Sci.**, v. 89, p1877-1895, 2006.

BATTISTI, A.; FRANCO, A.; Merialdi, G.; HASMAN, H.; Iurescia, M.; Lorenzetti, R.; Feltrin, F.; Zini, M.; Aarestrup, F. M.; Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. **Vet. Microbiol.**, v.142, p.361–366, 2009.

BENAGLI C, ROSSI V, DOLINA M, TONOLLA M, PETRINI O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. **PLoS One**, v. 6; p16424, 2011.

BENNET, R.W., LANCETTE, G.A. **Bacteriological Analytical Manual (BAM): General Guidelines/Procedures - *Staphylococcus aureus***. FDA, Food. 2001 Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>, acesso 08 de abril de 2015.

BERGONIER, D.; SOBRAL, D.; FEBLER, A. T.; JACQUET, E.; GILBERT, F. B.; SCHWARZ, S.; TREILLES, M.; BOULOC, P.; POURCEL, C.; VERGNAUD, G., *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **Vet Res.**, v. 45(1): p. 97, 2014

BIZZINI, A. e GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clin. Microbiol. Infect**, v.16, p.1614-1619, 2010.

BOSS, R.; NASKOVA, J.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Mastitis diagnostics: Quantitative PCR for *Staphylococcus aureus* genotype B in bulk tank milk. **J. Dairy Sci.**, v. 94, p.128–137, 2011.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 18/04/2002. Diário Oficial da União, **Distrito Federal**, Brasília, 19 abr. 2002a. Seção I, p. 3. 60

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. Diário Oficial da União, **Distrito Federal**, Brasília, 20 set. 2002b. Seção I, p. 13-22.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, **Distrito Federal**, Brasília, 30 dez. 2011. Disponível em: <[http://sistemasweb.agricultura.gov.br/arquivosislegis/anexos/arquivos/DO1\\_2011\\_12\\_30.pdf](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/arquivosislegis/anexos/arquivos/DO1_2011_12_30.pdf)>. Acesso em: 10 de abril de 2015

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 7 de 03/05/2016. Diário Oficial da União, **Distrito Federal**, Brasília, 04 mai 2016 n.84 Seção 1 – p.11

\_\_\_\_\_. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. **Distrito Federal**, Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default.shtm>> Acesso em: 10 de abril de 2015

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R.; RIBEIRO, M. T., & VEIGA. V. M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A.; Minimum inhibitory concentrations for ten antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.53, n.5, p.531-537, 2001.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciênc. Rural**, v. 32, n. 1, p. 79-82, 2002.

BUZZOLA, F. R.; QUELLE, L.; GOMEZ, M. I.; CATALANO, M.; STEELE-MOORE, L.; BERG, D., GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; SORDELLI, D. O. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. **Epidemiol. Infect.**, v.126, p.445 – 452, 2001.

CARBONNELLE, E.; BERETTI, J. L.; COTTYN, S.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.2156–216, 2007.

CARDOSO, H. F. T.; COSTA, G. M.; e SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 22, n. 5, p. 199-206, 2002.

CARMO, A. M. A; SALES, R. C.; GRACINDO, A. P. A. C.; PEREIRA, G. F.; ABRANTES, M. R.; SILVA, J. B. A.; SOUSA, Ê. S. Avaliação da sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos de micro-organismos isolados nos casos de mastite no município de Apodi/RN. Julho de 2013. IX CONGIC, p.108-112.

CASTAÑEDA VÁSQUEZ, H.; JÄGER, S; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; CASTAÑEDA VÁSQUEZ, M. A.; EL-SAYED, A. Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.2, p.377-382, 2013.

CERQUEIRA, M. M. O. P; SOUZA, M. R.; SENA, M. J. *Fatores determinantes na qualidade do leite – estudo de uma indústria de laticínios.* **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, p. 241-245, 1999.

COELHO, S.M.O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; DEMO, M.; BOGNI, C.; SOUZA, M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus*

*aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 29, p. 369–374, 2009.

COOPER, J. E. e FEIL, E. J. Multilocus sequence typing—what is resolved? **Trend. Microbiol.**, 12:373–377; 2004.

COSTA, G. M. e BARROS, R. A. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

CROXATTO, A., G.; PROD'HOM, e G. GREUB, Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol. Ver.**, v.36, n.2, p. 380-407, 2012.

CUNHA, A. F. **Proteínas antigenicas de *Staphylococcus aureus* com potencial para produção de vacinas contra mastite bovina.** 2015. Tese (doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R.; OLIVEIRA, A. A.; SILVA, K. P. C.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arq. Inst. Biol.**, v.73, n.1, p.17-21, 2006.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M. e STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciênc. e Tecnol. Aliment.**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

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

CLSI document VET01-A4. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 4th edition CLSI, **Wayne**, PA, 2013.

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

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

DEC, M; PUCHALSKI, A; URBAN-CHMIEL, R; WERNICKI, A. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. **BMC Microbiol.**, v.16, p.105 2016.

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J.P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P.O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J.; Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J. Clin. Microbiol.**, v.48, n.3, p.941-5, 2010.

DUFOUR, S.; DOHOO, I. R.; BARKEMA, H. W.; DESCÔTEAUX, L.; DEVRIES, T. J.; ROY, J. P. ; SCHOLL, D. T. Manageable risk factors associated with lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. **J. Dairy Sci.**, v. 95, p.1283-1300, 2012.

EIGNER, U.; HOLFELDER, M.; OBERDORFER, K.; BETZ-WILD, U.; BERTSCH, D.; FAHR, A. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. **Clin. Lab**, v.55, p.289, 2009.

ELBEHIRY, A; AL-DUBAIB, M; MARZOUK, E; OSMAN, S.; EDREES, H. Performance of MALDI biotyper compared with Vitek™ 2 compact system for fast identification and discrimination of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. **Microbiologyopen**, 5(6): 1061–1070, 2016.

ELBEHIRY, A.; ZAHARAN, R. N.; MARZOUK, E.; AL-DABIB, M.; Phenotypical and mass spectral assessment methods for identification of some contagious mastitis pathogens. **Am. J. Microbiol.**, v. 5, n.1, p 1-10, 2014.

FAN H. H.; KLEVEN S. H. e JACKWOOD M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Dis.**, v. 39, p.729-735, 1995.

FIL/IDF. Bulletin of the International Dairy Federation. The World Dairy Situation, n. 45, 225p, 2011.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; 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. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FRÉNEY, H.M.E. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphisms. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, p. 60-4, 1996.

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

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **J. Dairy Sci.**, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 12, p. 5442-5448, 2003.

HATA, E.; KATSUDA, K.; YASHI, H.K.; UCHIDA, I.; TANAKA, K.; EGUCHI, M. Genetic Variation among *Staphylococcus aureus* Strains from Bovine Milk and Their Relevance to Methicillin-Resistant Isolates from Humans. **J. Clin. Microbiol.**, v.48, n. 6, p. 2130-2139, June 2010

HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLOF, A.; e PYORALA, S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. **J. Clin. Microbiol**, v.46, p.3728–3735, 2008.

HUBER, H.; KOLLER, S.; GIEZENDANNER, N.; STEPHAN, R.; AND ZWEIFEL, C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Euro Surveill.** 22;15(16). 2010

HWANG, S.Y.; PARK, Y.K.; KOO, H.C.; AND PARK, Y.H. *Spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **J. Vet. Sci.** v.11, p 125–131, 2010.

KAPUR, V., W. M.; SISCHO, R. S.; GREER, T. S.; WHITTAM, J. M.; MUSSER. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **J. Clin. Microbiol**, v. 33, p. 376–380, 1995.

KLEIN, R.C.; FABRES-KLEIN, M.H.; BRITO, M.A.V.P.; FIETTO, L.G.; DE OLIVEIRA BARROS RIBON, A. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Vet. Microbiol.**, v.160, p. 183–188, 2012.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR.; W. C. W. **Diagnóstico microbiológico** – Texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

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. **J. Clin. Microbiol** v. 42 n. 2, p.792-799, 2004.

KREWER, C. C.; LACERDA, I. P. S.; AMANSO, E. S.; CAVALCANTE, N. B.; PEIXOTO, R. M.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; DA COSTA, M. M.; MOTA R.A. Etiologia, perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos e fatores de risco associados à mastite bovina nos estados da Bahia e Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33(5), p. 601-606, 2013.



LAMARO-CARDOSO, J.; DE LENCASTRE, H.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, R. M.; NOUER, S. S.; AIRES-DE-SOUSA, M.; MILHEIRIÇO, M.; ANDRADE, A. L. S. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 12, p. 3991-3997, 2009.

LANGE, C., CARDOSO, M., SENCZEK, D., E SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.67, p.127-141,1999.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A. O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Rev. Nappama**, n.1, p. 4-7, 2000.

LANGONI, H. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33(5), p. 620-626, 2013

LAPORT, M. S. Antimicrobial activity of marine sponges against coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v. 155, p. 362–368, 2012.

LARSEN, H. D.; SLOTH, K. H.; ELSBERG, C.; ENEVOLDSEN, C.; PEDERSEN, L. H.; ERIKSEN, N. H.; AARESTRUP, F. M.; JENSEN, E. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. **Vet. Microbiol.**, v.71, p.89–101,2000..

LE MARÉCHAL,C.; JARDIN, J; JAN,J. ; EVEN, S.; PULIDO, C.; GUIBERT , J.M.; HERNANDEZ , D.; FRANÇOIS, P.; SCHRENZEL, J.; DEMÔNIO, D.; MEYER, E.; BERKOVA, N.; THIÉRY, E.; VAUTOR, E.; YVES LE LOIR *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminam isolados de ruminantes causando mastite leve ou grave, **Vet. Res.**, v. 42 (1): p.35. 2011;

LEE, S. H. I.; CAMARGO, C. H.; GONÇALVES, J. L.; CRUZ, A. G.; SARTORI, B. T.; MACHADO, M. B.; OLIVEIRA, C. A. F. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. **J. Dairy Sci**, v.95, p. 7377-7383, 2012.

LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro state, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 12, p. 3845–3849, 2007.

LOONEN, A. J.; JANSZ, A. R.; STALPERS, J; WOLFFS , P. F.; VAN DEN BRULE, A. J.; An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.**, v.31(7), p.1575-83, 2012.

LOONEN, A. J. M.; JANSZ, A. R.; BERGLAND, J. N. ; VALKENBURG, M. ; WOLFFS, P. F.G; VAN DEN BRULE , A. J .C.; Comparative Study Using Phenotypic, Genotypic,

and Proteomics Methods for Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.50, n.4, p. 1437–1439, Apr 2012.

LOPES JÚNIOR, J. E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SANTOS, F. R.; SILVA, M. A. S.; MORAES, L. C. D.; SOUZA, G. N. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Cienc. Rural**, 2012. v. 42, n. 4. 2012.

LUNDBERG, A.; ASPÁN, A.; NYMAN, A.; ERICSSON, H.; WALLER, K.P. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. **Acta. Vet. Scand.** v. 56, p.2-8, 2014.

MACLOWRY, J. D e MARSH, H. H. Semi-automatic microtechnique for antibiotic sensitivity testing in the clinical laboratory. **J. Lab. Clin. Med.**, v.72, p.685-7, 1968

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock.** 2010. Porto Alegre: Artmed, 12 ed.

MAGIORAKOS, A-P.; SRINIVASAN, A; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18, n. 3, p. 268–81, mar. 2012

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; FONTELES, T. V.; REGO, S. L.; FAHEINA JUNIOR, G. S. Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de manipuladores de alimentos. **Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment**, v. 27, n. 1, p. 43-52, 2009.

MATOS, J.S.; WHITE, D.G; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Isolation of *Staphylococcus aureus* from Sites Other than the Lactating Mammary Gland. **J. Dairy Sci.**, v.74, p. 1544-1549

MATTHEWS, K. R., S. J; KUMAR, S. A. O.; CONNER, R. J. ; HARMON, J. W. ;PANKEY, L. K.; FOX & OLIVER, S. P. Genetic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain-based DNA fingerprinting. **Epidemiol. Infect.**, v.112: p177–186, 1994.

MEDEIROS, E.S.; MOTA, A.M.; SANTOS, M.V.; FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; TELES, J.A.A. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.29, n.7, p.569-574, 2009.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins , Exfoliative Toxins , Toxic Shock Syndrome Toxin 1 , and Methicillin Resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1032–1035, 2000.

MIDDLETON, J. R.; FOX, L. K.; GAY, J. M.; TYLER, J. W. Influence of *Staphylococcus aureus* Strain-type on Mammary Quarter Milk Somatic Cell Count and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase Activity in Cattle from Eight Dairies. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p.1133–1140, 2002.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.37 n.10, p. 3411-3414, 1999.

MORK, T.; JORGENSEN, H. J.; SUNDE, M.; KVITILE, B.; SVILAND, S.; WAAGE, T.; TOLLERSRUD S., Persistence of Staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. **Vet. Microbiol.**, v.159, p. 171–180, 2012.

MURRAY, P. What Is a New in Clinical Microbiology – Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. - e **J. Molec. Diag.**, v.14(5): p.419-423, 2012.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Oliveira. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arq. Inst. Biol.**, v.74, n.1, p.1-4, 2007.

NDOYE, B.; RASOLOFO, E. A.; LAPOINTE, G.; ROY, D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. **Dairy Sci. Technol.** v. 91, p. 495-524, 2011

OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; SÁ, M. E. P. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro frente a amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite subclínica bovina, no Agreste meridional de Pernambuco, **Hora Vet.**, v. 22, n.127, p.8-10, 2002.

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

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. a. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. **Foodborne Pathog. Dis.** v. 2, n. 2, p. 115–129, 2005.

OSTERAS, O.; SOLVEROD, L.; REKSEN, O. Milk culture results in a large Norwegian survey – effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p.1010-1023, 2006.

PAIM, T. G. S; CANTARELLI V. V.; D'AZEVEDO P. A. Performance of the VITEK® 2system software version 5.03 in the bacterial identification and antimicrobial susceptibility test: evaluation study of clinical and reference strains of Gram-positive cocci. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, p.377–38, 2014.

PAIM, T. G.S.; REITER, K, C; OLIVEIRA, C, F; AZEVEDO, P, A. Desempenho da metodologia por MALDI-TOF MS na identificação de cocos Gram-positivos isolados na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil, **J. Infect. Control.**, v.2, p02-05, 2013

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

PARADA, J. L.; GONÇALVES, D.; SOCCOL, V. T.; LIMA, M.; SOCCOL, C. R. Mastite bovina na região metropolitana de Curitiba: resistência aos antibióticos e controle antimicrobiano da infecção. **Braz. Arco. Biol. Technol.** v.54, n.4, 2011.

PATERSON, A. E.; DAVIS, M. F.; AWANTANG, G.; LIMBAGO, B.; FOSHEIM, G. E.; SILBERGELD, E. K. Correlation between animal nasal carriage and environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at U.S. horse and cattle farms. **Vet Microbiol.**, v.160 (3-4), p. 539-543, 2012

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLEMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.** v.22, n.1. 2014

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

PEREIRA, M.S.; LEAL, N.C.; LEAL, T.C.; SOBREIRA, M.; DE ALMEIDA, A.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Lett Appl Microbiol.**, v.35, p.32-36, 2002.

PETERSON, A.E.; DAVIS, M. F.; JULIAN, K.G.; AWANTANG, G.; GREENE, W. H.; PRICE, L. B; WATERS, A.; DOPPALAPUDI, A.; KRAIN, L. J.; NELSON, K.; SILBERGELD, E. K.; WHITENER, C. J; Molecular and phenotypic characteristics of healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a rural hospital. **PLoS One**; v. 7(6),2012

PETON, V.; BOUCHARD, D. S.; ALMEIDA, S.; RAULT, L.; FALENTIN, H.; JARDIN, J.; JAN, G.; HERNANDEZ, D.; FRANÇOIS, P.; SCHRENZEL, J.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; BERKOVA, N.; EVEN, S.; YVES LE LOIR, Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines, **Vet. Res.** v 45(1): 106. 2014;

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Mastitis: counter attack. 1991. A strategy to combat mastitis. **Naperville**: Babson Bros. 150 p.

PHILPOT, W.N. & NICKERSON, S.C. Winning the fight against mastitis. 2000. **Naperville**, IL: Westfalia-Surge, 188p.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, K.; DE AART, L.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H.W.; VliegHER, S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **J. Dairy Res.** 74:478-483, 2007.

PIRES, F. V.; DA CUNHA, M. D. L. R. D. S.; ABRAÃO, L. M.; MARTINS, P. Y. F.; CAMARGO, C. H.; FORTALEZA, C. M. C. B. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A population-based survey. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

PYÖRÄLÄ, S. Mastitis caused by different microbes. In: SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. p. 143-160, 1995.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Bacterial causes of bovine mastitis**. In: Veterinary Microbiology and Microbial disease. Oxford: Blackwell, p. 465-475, 2002.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; HARTIGAN, P. F.; FANNING, S., FITZPATRICK, E. S. . **Bacterial causes of bovine mastitis**. In: Veterinary Microbiology and Microbial disease. 2 ed. London: Wiley- Blackwell, 400 p. 2011.

RABELLO, R. F.; SOUZA, C. R. V. M.; DUARTE, R. S.; LOPES, R. M. M.; TEIXEIRA, L. M. & CASTRO, A. C. D. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **J.Dairy Sci.**; v.88, p3211-3219. 2005.

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. **J Med Microbiol.**, v. 56, p.1505-1, 2007..

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **J. Microbiol Methods.**, V. 78, p. 1-9, 2009.

RODRIGUES, N. M. B.; BRONZATO, G. F.; SANTIAGO, G. S.; BOTELHO, L. A. B.; MOREIRA, B. M.; COELHO, I. S; SOUZA, M. M. S; COELHO, S. M. O The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification *versus* biochemical tests: a study with Enterobacteria from a dairy cattle environment. **Braz. J. Microbiol.**, v.48, n.1, p.132-138, 2017.

SAID, K.B.; ISMAIL, J.; CAMPBELL, J.; MULVEY, M.R.; BOURGAULT, A. M. MESSIER, S.; ZHAO, X. Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and *spa* typing. **J. Clin. Microbiol.** v.48, n.2, p.375-86, 2010.

SANTOS, C. D. M.; LEAL, G. S.; ROSSI, D. A. Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp isolados de leite de vacas com mastites

recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia – MG. **Vet. Not.**, v. 12, n. 2, p. 83-88, 2006.

SANTOS, K. R. N., DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 17-23, 1999..

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 765–9, 2010.

SCHULTHESS, B.; BLOEMBERG, G.V.; ZBINDEN, R.; BÖTTGER, E.C.; HOMBACH, M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v52, p.1089–97, 2014.

SHOPSIN, B., GOMEZ M., MONTGOMERY, S. O., SMITH, D. H., WADDINGTON, M., DODGE, D. E., BOST, D. A., RIEHMAN, M., NAIDICH, S. KREISWIRTH, B. N. Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains **J. Clin. Microbiol**, vol. 37, no. 11, p. 3556-3563, 1999.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Vet. Res.**, v.34(5), p. 579-96, 2003.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **J Antimicrob Chemother.**, v. 65, n. 4, p. 601-604, 2010.

SILVA, N. C.; GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; JÚNIOR, A.F.; GÓMEZ-SANZ, E.; GÓMEZ, P.; LANGONI, H.; RALL, V.L.; TORRES, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 9, n.6, p. 665-9, 2014.

SILVA, N.C.; GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; BUDRI, P.E.; GÓMEZ-SANZ, E.; BENITO, D.; LANGONI, H.; RALL, V.L.; TORRES, C. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **J. Dairy Sci.**, v.96, n.11, p.6856-62, 2013

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006

SIUZDAK, G.. Espectrometria de Massa para Biotecnologia. Academic Press, San Diego, 1996.

SMITH, E.M.; GREEN, L.E.; MEDLEY, G.F.; BIRD, H.E.; DOWSON, C.G.; Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. **J. Clin. Microbiol.**, 2005. v.43, n.9, p.4731-4736.

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

SOKAL, R. R., & ROHLF, F. J. **Biometry**. New York, USA: Freeman and company. 1995.

SOUSA, M. A., PARENTE, C. E. S. R. C, MOTTA, O. V. M., BONNA, I. C. F., SILVA, D. A., LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro state, **Appl. Environ. Microbiol.**, p. 3845–3849, 2007.

SOUZA, F. N. **Mastitis: aspects of the host-pathogen interaction**. 2015. 115p. Tese (doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, F. N.; CUNHA, A. F.; ROSA, D. L. S. O.; BRITO, M. A. V.; GUIMARÃES, A. S.; MENDONÇA, L. C.; SOUZA, G. N.; LAGE, A. P.; BLAGITZ, M. G.; DELLA LIBERA, A. M.M.P.; HEINEMANN, M. B; CERQUEIRA, M.M.O.P. Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. **Pesq. Vet. Bras.**, v.36, n.9, sept. 2016

SOUZA, V.; FILHO, A. N.; MELO, P. C; FERRAUDO, G. M.; FERRAUDO, A. S.; CONDE, S. O; JÚNIOR, F. A. F. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* isolates at different sites in the milk producing dairy farms. **J. Microbiol.** v.43, p4. 2012.

TANAKA, K. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.42(33): p. 3860-3870, 2003.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. Molecular typing working group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. 1997. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** v.18, n.6, p.426-439, 1997.

TENOVER, F.C. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.407-415, 1994.

VAN DEN BORNE, B. H. P.; NIELEN, M.; VAN SCHAİK, G.; MELCHIOR, M. B.; LAM, T. J. G. M.; ZADOKS, R. N. Host adaptation of bovine *Staphylococcus aureus* seems associated with bacteriological cure after lactation antimicrobial treatment. **J. Dairy Sci.**, v.93, p.2550–2558, 2010.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J-M.; CHEVALIER, N.; PÉPIN, M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. **Vet. Microbiol.**, v.106, p.235-239, 2005.

VIEIRA V. PESSOA-JUNIOR, J. LAMARO-CARDOSO, Y. M. TERNES, M. C. P., R. M.; RE A. KIPNIS, S. S.; L., A.; RADE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in neonates and children attending a pediatric outpatient clinics in Brazil. **Braz. J. Infec. Diseas.**, v. 18, n. 1, p. 42–47, 2014.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. 2001. **Zaragoza:** Acribia., 730p.,

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W.H.M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 27-45, 2002.

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

WERNER, G.; FLEIGE, C.; FESSLER, A.T.; TIMKE, M.; KOSTRZEWA, M.; ZISCHKA, M. Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. **Vet Microbiol.**, v.9, p.162–9, 2012.

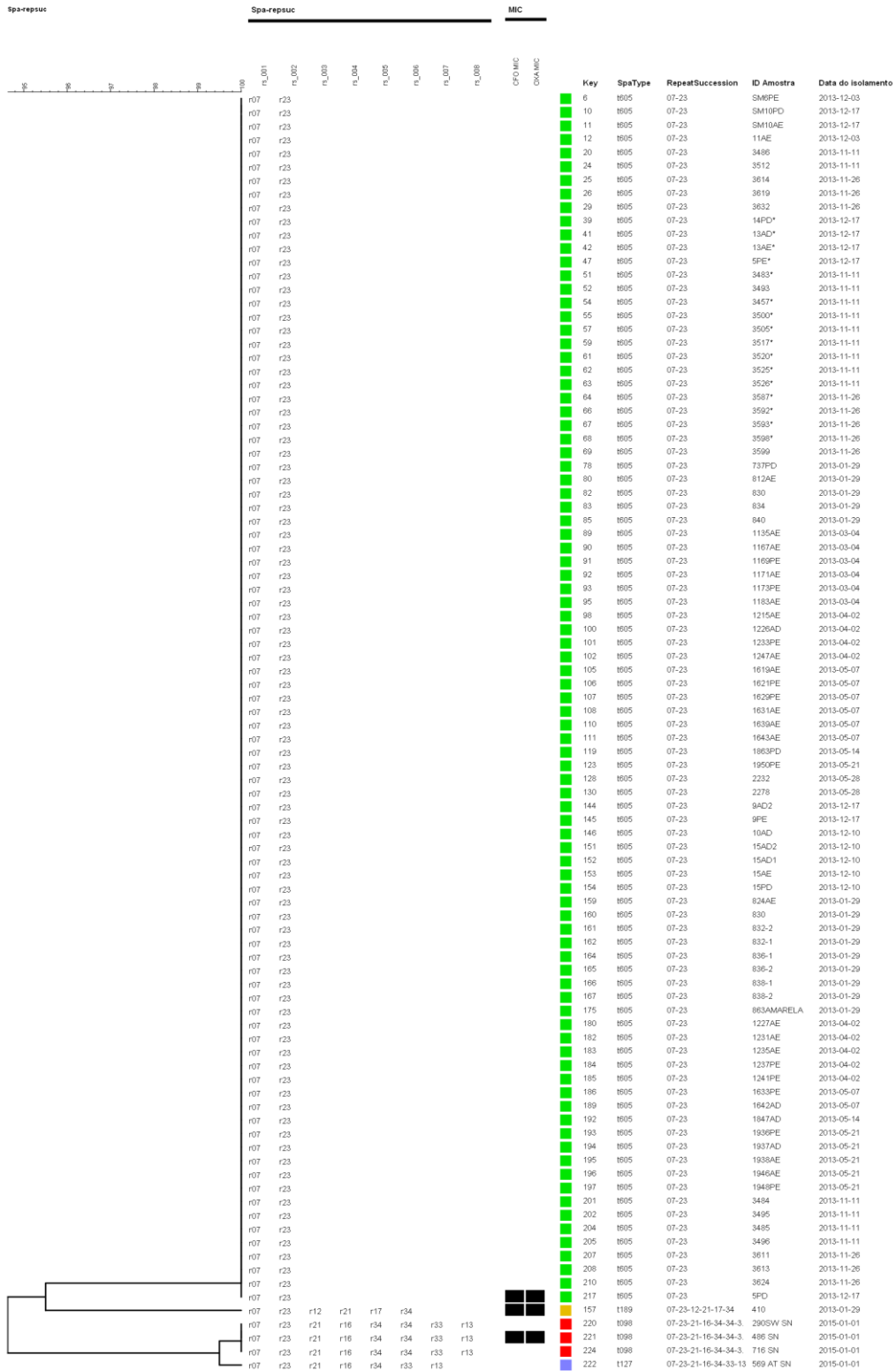
WIESER, A. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). **Appl Microbiol Biotechnol**, 2012.

WOODS, G.L., WASHINGTON, J.A. **Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods.** In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A. et al. (Ed.) Manual of clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology Press, p.1327-1341, 1995.

ZADOKS, R.N., VAN LEEUWEN, W.B., KREFT, D., FOX, L.K., BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H. & VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **J. Clin. Microbiol.** v.40, n. 1, p.3894-3902, 2002.



**Anexo 1:** Dendrograma interpretado pelo Bionumerics com os resultados da tipagem empregando o *SPA typing*, com os respectivos dados de ano de isolamento, município e estado.



**Anexo 2:** Isolados que apresentaram perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados, considerando a definição de Magiorakos et al., 2011

ID	FAZ	VACA	TETO	CEF	OXA	FUS	AM	AZ	BE	CL	ER	GE	EM	KA	MA	NI	RI	TE	TRIM	VAN
410	FP	410		2	2	0	2	0	2	0	0	0	*2	0	0	0	0	0	0	0
737	FP	232	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
812	FP	743	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
824	FP	243	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
829	FP	46	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
830	FP	46	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
834	FP	66	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
835	FP	89	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
836	FP	89	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
838	FP	89	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
840	FP	667	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
841	FP	667	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
851	FP	603	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
852	FP	603	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
854	FP	603	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1128	FP	0	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1135	FP	743	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1148	FP	0	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1167	FP	66	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1169	FP	66	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1170	FP	89	AD	*3	2	2	2	2	2	2	2	0	*2	0	0	0	2	0	0	2
1171	FP	89	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1173	FP	89	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1181	FP	46	PE	*3	2	2	2	2	2	2	2	0	*2	0	0	0	0	0	0	2
1182	FP	667	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1183	FP	667	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
1184	FP	667	PD	*3	2	2	2	2	2	2	2	0	*2	0	0	0	0	0	0	2
1186	FP	603	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1187	FP	603	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1188	FP	603	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1215	FP	743	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1226	FP	243	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1227	FP	243	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1230	FP	89	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1231	FP	89	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1233	FP	89	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0

ID	FAZ	VACA	TETO	CEF	OXA	FUS	AM	AZ	BE	CL	ER	GE	EM	KA	MA	NI	RI	TE	TRIM	VAN
1235	FP	66	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	1	0	0	2	0	0
1237	FP	66	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1241	FP	46	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1246	FP	667	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1618	FP	89	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1619	FP	89	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1629	FP	46	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1631	FP	66	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1632	FP	66	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1633	FP	66	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1638	FP	243	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1639	FP	243	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1642	FP	743	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1643	FP	743	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1843	FP	89	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1846	FP	89	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1847	FP	243	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1852	FP	66	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1854	FP	66	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1858	FP	46	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1863	FP	743	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1864	FP	743	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1933	FP	46	AD	0	1	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1934	FP	46	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1936	FP	46	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1938	FP	743	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1943	FP	232	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1945	FP	89	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1946	FP	89	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1948	FP	89	PE	0	1	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1950	FP	66	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1952	FP	66	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1953	FP	243	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1954	FP	243	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1957	FP	89	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
1943	FP	232	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
2232	FP	243	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
2254	FP	743	PE	0	1	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
2278	FP	66	PE			0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0

ID	FAZ	VACA	TETO	CEF	OXA	FUS	AM	AZ	BE	CL	ER	GE	EM	KA	MA	NI	RI	TE	TRIM	VAN
2282	FP	66	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
2778	FP	66	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3483	FS M	1165	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
3484	FS M	1165	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
3494	FS M	1217	AE	2	2	2	2	2	2	2	2	0	*2	0	0	2	1	1	0	2
3587	FS M	1339	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3588	FS M	1339	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3592	FS M	1308	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3593	FS M	1308	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3598	FS M	1165	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3599	FS M	1223	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3602	FS M	1223	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3611	FS M	1227	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3613	FS M	1227	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3614	FS M	1227	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3615	FS M	1318	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3622	FS M	1435	PE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3623	FS M	1371	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3624	FS M	1371	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3631	FS M	1252	AD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3632	FS M	1252	AE	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3633	FS M	1252	PD	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3634	FS M	1252	PE	2	2	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0
3784 (9 AE)	FS M	1371	AE	2	2	1	2	0	2	0	0	0	*2	0	0	2	2	0	2	0
3859 (5 PD)	FS M	1223	PD	*3	2	0	2	0	2	0	0	0	*2	0	1	0	0	0	0	0
3895 (14 PD)	FS M	1165	PD	2	2	1	2	2	2	1	2	0	*2	0	0	2	0	0	0	2
486 SN 3	FP			2	2	1	2	2	2	1	2	0	*2	0	0	2	0	0	0	2
89 SN-1	FP			0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0

**LEGENDA:**

**Quadrado cinza grafite**, com o número 2 o isolado é resistente (Magiorakos et al., 2011).

**Quadrado em branco**: o isolado é sensível, MDR (*multidrug-resistant*): intermediário ou resistente a  $\geq 1$  agente em  $\geq 3$  classes de antimicrobianos.

**Quadrado rosa**: benzilpenicilina, desconsiderado do estudo de acordo com a definição de Magiorakos et al., 2011.