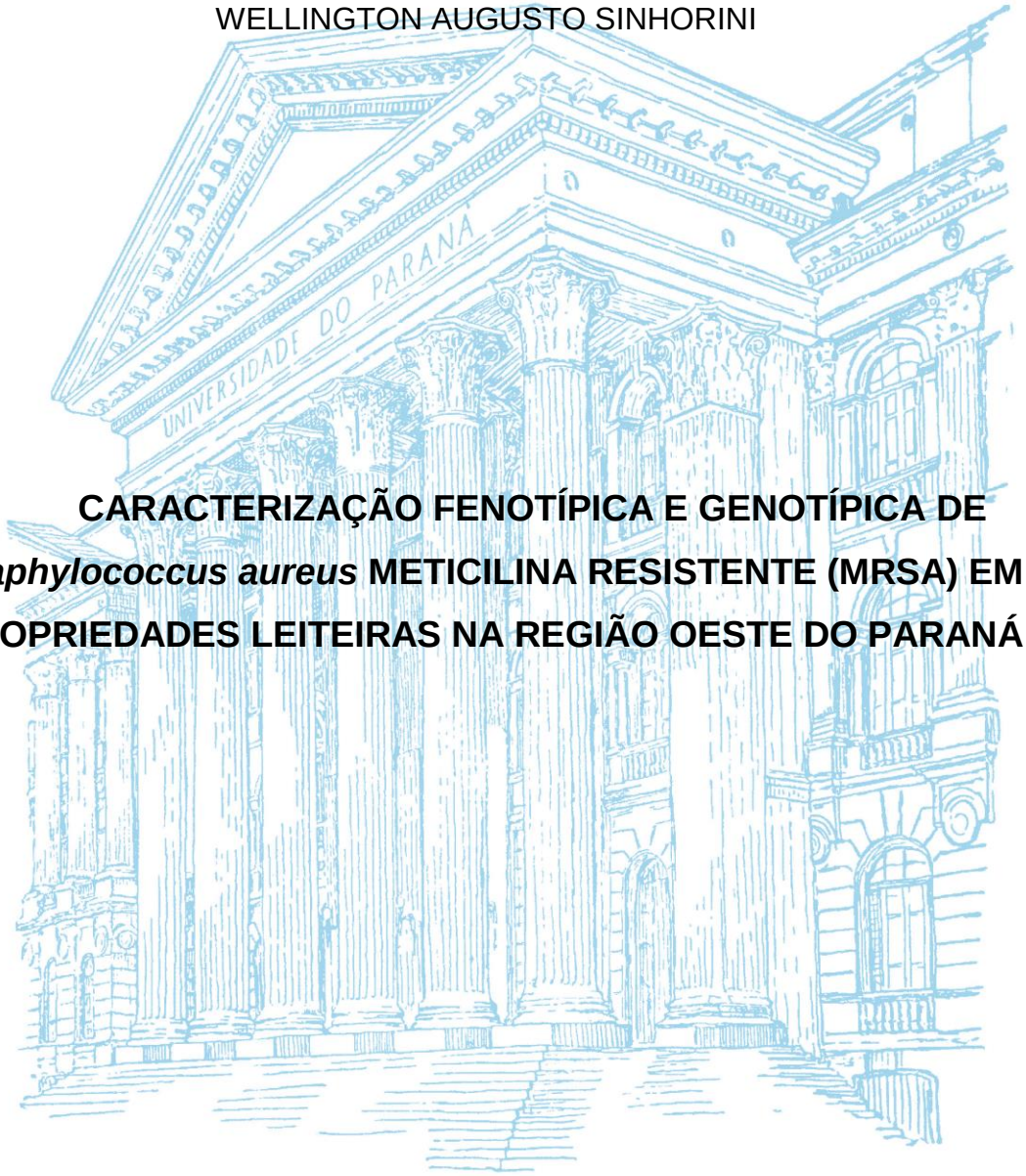
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WELLINGTON AUGUSTO SINHORINI



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE (MRSA) EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

PALOTINA

2017

WELLINGTON AUGUSTO SINHORINI

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE (MRSA) EM PROPRIEDADES LEITEIROS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia aplicada à Produção Animal, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.ª Drª. Silvia Cristina Osaki
Co-orientadora: Profª. Drª. Sheila Rezler Wosiacki

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S615

Sinhorini, Wellington Augusto
Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus metilicina* resistente (MRSA) em propriedades leiteiras na região oeste do Paraná / Wellington Augusto Sinhorini. -- Palotina, 2017
84f.

Orientadora: Silvia Cristina Osaki
Coorientadora: Sheila Rezler Wosiacki
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. PFGE. 2. Fenotípico. 3.MRSA. I. Osaki, Silvia Cristina. II. Wosiacki, Sheila Rezler. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.2

Ficha catalográfica elaborada por Liliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **WELLINGTON AUGUSTO SINHORINI** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE (MRSA) EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ** , após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 31 de Maio de 2017.

SILVIA CRISTINA OSAKI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Avaliador Interno (UFPR)

MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A realização de um projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de vários colaboradores. Aos professores da UFPR: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros, Profª. Drª. Elizabete Takiuchi, Profª. Dr. Luciana Grange e aos professores da UFV: Prof. Dr. Luís Augusto Nero e Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi, que direta ou indiretamente contribuíram no projeto, o meu reconhecimento, gratidão e admiração.

À CAPES pela ajuda financeira através do PROCAD e da bolsa de estudo, permitindo a realização do projeto.

À Profª. Drª. Silvia Cristina Osaki e Profª. Drª. Sheila Rezler Wosiacki, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de pessoas que transpiram sabedoria; meu respeito e admiração pelas suas serenidades e pelo dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Aos amigos de longa caminhada e aos novos que fiz ao ingressar na pós-graduação e nas viagens em pesquisa, que juntaram-se durante este percurso e me ajudaram de forma direta ou indireta na realização do meu projeto e a construção do meu conhecimento. Todos exemplificam a ética e competência profissional, a dedicação e o aprimoramento contínuos, pelos incentivos e oportunidade de convívio, pelo ombro amigo na felicidade e nas tristezas, estando sempre ao meu lado.

A Deus por iluminar meu caminhos.

À minha família, por me acompanhar e apoiar os meus sonhos, ajudando de todas as formas possíveis.

MUITO OBRIGADO!!!

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

RESUMO

A mastite é causada por inúmeros agentes etiológicos. O *Staphylococcus aureus* é considerado um dos micro-organismos que mais provocam a enfermidade. O mesmo também causa sérias infecções purulentas tanto no homem, quanto nos animais, tornando-se um agente zoonótico de relevância para Saúde Pública. O presente trabalho teve por objetivo a identificação de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA), através de sua caracterização e classificação molecular e fenotípica, em diferentes amostras provenientes de propriedades da região de Cascavel – PR. Para tanto, foi realizada uma triagem com amostras colhidas de tanque de expansão de 69 propriedades. Estas amostras foram submetidas à pesquisa dos genes de resistência *mec*A e *bla*Z e do gene *fem*A para confirmação da espécie, utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase. Dentre o total de positivos na PCR, quatro propriedades que apresentaram os genes de resistência, foram visitadas novamente. Todas as vacas em lactação dessas propriedades foram submetidas ao teste de CMT para verificar a presença de mastite subclínica. Em seguida foram realizadas colheitas de amostras de tanque, teteiras, amostras de leite de animais com mastite subclínica e clínica e suabe de fossas nasais e das mãos dos manipuladores, que foram analisadas fenotipicamente (Gram, oxidase, catalase, coagulase, manitol e Dnase), genotipicamente (genes *fem*A, *coag, bla*Z e *mec*A) e testadas para a sensibilidade a antimicrobianos. As amostras positivas para *S. aureus* foram submetidas à técnica de Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para tipificar os isolados. Foi aplicado um questionário epidemiológico com o objetivo de conhecer os fatores de risco relacionados com a presença dos genes de resistência. Como resultados, observamos a presença de 42 isolados tipificados pela técnica PFGE, com amostras positivas para os genes testados (24,21% para *mec*A; 84,37% para *bla*Z; 100% para *coag* e *fem*A) e teste de sensibilidade a antimicrobianos (presença de resistência a Oxacilina) caracterizando MRSA. No PFGE observamos uma heterogeneidade quanta à presença de pulso tipos dentro das propriedades, e até mesmo a presença de um mesmo pulso tipo em propriedades diferentes e locais diferentes, demonstrando a diversidade clonal existente e a provável circulação dos micro-organismos. No presente estudo não foram encontrados fatores de risco quando analisados pelo programa *software* Epi info^{TM} 7.

Palavras-chave: PFGE, fenotípico, MRSA

ABSTRACT

Mastitis is caused by numerous etiological agents. Staphylococcus aureus is considered one of the micro-organisms that most cause the disease. The same also causes serious purulent infections in both humans and animals, becoming a zoonotic agent of relevance to Public Health. The present work aimed at the identification of Resistant Methicillin Staphylococcus aureus (MRSA), through its characterization and molecular and phenotypic classification, in different samples from properties of the Cascavel - PR region. In order to do so, a sample was collected with samples collected from the 69 properties expansion tank. These samples were submitted to the search of the mecA and blaZ resistance genes and the femA gene for confirmation of the species using Polymerase Chain Reaction. Among the total of positives in the PCR, four properties that presented resistance genes, were visited again. All lactating cows of these properties were submitted to the CMT test to verify the presence of subclinical mastitis. After that, samples of milk, milk samples from animals with clinical and subclinical mastitis and nasal fossa were collected, and phenotypically analyzed (Gram, oxidase, catalase, coagulase, mannitol and Dnase) , Genotyped (*fem*A, *coag*, *bla*Z and *mec*A genes) and tested for antimicrobial susceptibility. Samples positive for S. aureus were submitted to pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique to typify the isolates. An epidemiological questionnaire was applied in order to know the risk factors related to the presence of resistance genes. As results, we observed the presence of 42 PFGE-typed isolates, with positive samples for the genes tested (24.21% for mecA, 84.37% for blaZ, 100% for coag and femA) and antimicrobial susceptibility test Presence of resistance to oxacillin) characterizing MRSA. In PFGE we observed a quantum heterogeneity to the presence of pulse types within the properties, and even the presence of a same pulse type at different properties and different sites, demonstrating the existing clonal diversity and the likely circulation of the microorganisms. In the present study, no risk factors were found when analyzed by the software program Epi infoTM 7.

Key-words: PFGE, phenotype, MRSA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE COLHEITA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS NAS PROPRIEDADES LEITEIRAS NO OESTE DO PARANÁ **38**

FIGURA 02 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *femA* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (132 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE DE MIX; 04: CONTROLE POSITIVO; 5 A 20: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS.....**42**

FIGURA 03 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *coag* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (500/700 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE DE MIX; 04: CONTROLE POSITIVO; 5 A 20: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS.....**43**

FIGURA 04 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *blaZ* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (516PB). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE POSITIVO; 04 A 21 AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS.....**44**

FIGURA 05 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *mec*A POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (309/314 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE POSITIVO; 04 A 08 AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS E NEGATIVAS;09:MARCADOR.....**45**

FIGURA 06 – GEL DE AGAROSE (2%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DA MACRO-DIGESTÃO POR *Sma*I NA ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02 A 08 AMOSTRAS; 09: MARCADOR MOLECULAR; 10 A 17: AMOSTRAS DE CAMPO; 18: MARCADOR MOLECULAR.....**47**

FIGURA 07 – ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, SEGUNDO PERFIL NO PFGE **49**

FIGURA 08 – ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, SEGUNDO PERFIL DO PCR E ANTIBIOGRAMA **53**

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Relação das cidades do Paraná estudadas e quantidade de propriedades selecionadas **29**

TABELA 02. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de uniplex-PCR para detecção dos genes de resistência a β-lactâmicos, espécie e 16SrRNA para *S. aureus*.....**31**

TABELA 03 – Etapas da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção dos genes *fem*A, *mec*A, *bla*Z e 16sRNA.....**32**

TABELA 04. Valores de OR em relação à presença do gene *bla*z nas propriedades estudadas.....**39**

TABELA 05. Valores de OR em relação à presença do gene *mec*A nas propriedades.....**39**

TABELA 06 – Número de isolados por propriedade utilizadas no PFGE e relação das amostras por local de isolamento.....**47**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	- Polymerase Chain Reaction
PFGE	- Pulsed-field Gel Electrophoresis
OS-MRSA	- Oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MRSA	- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
NJ	- *Neighbor Jones*
CMT	- *California Mastite* Test
CCR	- *Cassette chromosome recombinase*
DNA	- *Deoxyribonucleic Acid*
CC	- *Clonal Complex*
SCCmec	- *Staphylococcal cassette chromosome* mec
ST	- *Sequence Type*
Fem	- *Factors essentiolfor methicillin resistance*
HA-MRSA	- *Hospital-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
CA-MRSA	- *Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
MRS	- *Methicillin-resistant* staphylococci
CDC	- *Centers for Disease Control and Prevention*
IPTMs	- Infecções da Pele e Tecido moles
ASC	- Ágar Sangue de Carneiro
DNASE	- *Desoxyribonuclease*
CLSI	- *Clinical & Laboratory Standards Institute*
TSB	- *Tryptic Soy Broth*

LISTA DE SÍMBOLOS

© - copyright

@ - arroba

® - marca registrada

β - Beta

μ - Micro

ƛ – Lambda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 13
1.1 JUSTIFICATIVA..... 13
1.2 OBJETIVOS..... 16
1.2.1 Objetivo Geral..... 16
1.2.2 Objetivos Específicos..... 16
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 17
2.1 *Staphylococcus aureus* 18
2.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA 19
2.3 CIRCULAÇÃO DO AGENTE *Staphylococcus aureus* 23
2.4 TÉCNICAS DE IDENTIFIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE *S.aureus*.....25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....28
3.1 COMITÊ DE ÉTICA.....28
3.2 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES 28
3.3 TRIAGEM DAS PROPRIEDADES A SEREM ESTUDADAS E ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS 29
3.3.1 Aplicação do Questionário Epidemiológico.....29
3.3.2 Isolamento de *Staphylococcus aureus* das Amostras Colhidas.....30
3.3.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....30
3.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS NAS PROPRIEDADES SELECIONADAS APÓS TRIAGEM E ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS 33
3.4.1 Seleção das Propriedades.....33
3.4.2 Seleção dos Animais.....33
3.4.2.1 Realização do CMT e colheita das amostras de leite.....33
3.4.3 Colheita de Amostras das Teteiras.....34
3.4.4 Colheita de Amostras dos Ordenhadores.....34
3.4.5 Colheita de Amostras Obtidas do Tanque de Expansão 34
3.4.6 **Isolam**ento e Identificação de *Staphylococcus aureus* das amostras colhidas 34
3.4.7 Teste de Sensibilidade Antimicrobiano.....35
3.4.8 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....35
3.4.9 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....36

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

4.1 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A PRESENÇA DOS GENE DE RESISTÊNCIA.....39

4.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIAÇÃO DE *S. aureus*.....41

4.2.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos 41

4.2.1.1 Detecção dos genes *fem*A e *coag* 41

4.2.1.2 Detecção do gene *balZ* e teste de sensibilidade a antimicrobianos 43

4.2.1.3 Detecção do gene *mec*A e teste de sensibilidade a antimicrobianos.....44

4.3 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) 46

5 CONCLUSÃO **57**

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 58

REFERÊNCIAS..... 60

ANEXO 1 – RESULTADOS OBTIDOS DA TRIAGEM A PARTIR DO PCR PARA OS GENES *mec*A, *bla*Z E *fem*A, DAS AMOSTRAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ. P= AMOSTRAS POSITIVAS E N= AMOSTRAS NEGATIVAS.....75

ANEXO 2 – RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO PCR PARA OS GENES *mec*A, *bla*Z E *fem*A, DAS AMOSTRAS DE SUABE NASAL, MÃO E TETEIRAS, E ALÍQUOTAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO E DE VACAS COM CMT POSITIVAS, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ NA SEGUNDA COLHEITA. P1 E P2= *mec*A; P= POSITIVO E N= NEGATIVO; S= SENSÍVEL E R= RESISTENTE77.....76

ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO.....79

1 INTRODUÇÃO

Para a economia Brasileira, a relevância do leite como matéria prima está diante da versatilidade do produto, seu consumo e produção. Colocando assim, o mesmo, em patamares de alta importância. O leite, possui grande representatividade no comércio e consequentemente no consumo, fazendo com que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) faça menção na Instrução Normativa de n.º62 de 2011 (substituta da Instrução Normativa de n.º 51, de 2002) e complementada pela IN07 de 03/05/2016 e pelo RIISPOA 9.013 de 29/05/2017, estabelecendo níveis mínimos de sólidos totais (proteína + gordura + lactose), extrato seco desengordurado (proteína + lactose) células somáticas e contagem de bactérias totais (BRASIL, 2011).

Observando a normativa e colocando a preocupação frente à contaminação do leite, a mastite torna-se um problema para Saúde Pública, sendo responsável por causar sérios danos nas glândulas mamárias devido a infecções por inúmeros micro-organismos, como *Staphylococcus aureus*, figura representativa na enfermidade. O mesmo também causa sérias infecções purulentas tanto nos humanos, quanto nos animais, tornando-se um agente zoonótico de relevância (ARAUJO W.P. 1998; NADER FILHO et al., 2007)

Este agente possui capacidade de sobreviver na microflora dos seres vivos, como fossas nasais, membranas de mucosas, entre outros, com infecções que variam de localizadas até mesmo sistêmicas, geralmente de forma recorrente, com papel importante tanto na medicina humana quanto veterinária (CAVALCANTI et al, 2005). Existem também alimentos que podem conter estes micro-organismos, como a carne, leite e seus derivados, além do ambiente como ar, poeira e água, que também podem ser locais para o seu desenvolvimento (CAPURRO et al*.,* 2010).

A forma em que os animais são criados e manejados é extremamente propenso à aquisição de micro-organismos patogênicos. A glândula mamária por sua vez, torna-se a maior região acometida pela infecção dentro de um rebanho. Ductos de tetos infectados, lesionados e colonizados, conjunto de teteiras e demais equipamentos de ordenha, como panos comuns para secagem dos tetos de diferentes animais, e mãos dos ordenhadores, perfazem uma rede de fômites e veiculadores, capazes de disseminar os agentes, desta forma, fazendo com que o momento da ordenha seja o melhor momento para a transmissão entre os animais,

entre o homem e os animais e também dos fômites para os animais (BRADLEY, 2002).

S. aureus possui grande potencial de virulência e patogenicidade, decorrentes de fatores associados à composição de sua parede celular ou ainda fatores secretados, como por exemplo, toxinas super antigênicas, enzimas, citotoxinas, exotoxinas e toxinas esfoliativas, provocando sintomas com severidades variadas (HWANG et al., 2010; PINCHUK et al., 2010; SANTANA et al., 2010; FUSCO et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2011). Entre os fatores de virulência conhecidos, o que provoca maior problemática à Saúde Pública é a resistência a um ou vários antibióticos da classe dos β-lactâmicos, sendo assim, denominado *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA) (CDC, 2016), causando preocupação na medicina humana, podendo também causar infecções em várias espécies de animais (FEBLER et al., 2010).

A resistência nada mais é do que a resposta evolutiva que estes micro-organismos encontraram para se defenderem dos agentes antimicrobianos a que são expostos continuamente (VAN HOEK et al., 2011). O monitoramento destes patógenos torna-se importante para observação e análise de sua propagação, implicando em melhorias na terapêutica das clínicas e efetivas ações contra os agentes resistentes (UNAL et al., 2012).

MRSA são de grande importância mundial, como agentes nosocômios, com um aumento substancial de sua incidência a cada ano. Estirpes de MRSA raramente são isoladas a partir de animais, citando como exemplo o trabalho realizado por Van Duijkeren (2007) que isolou MRSA de vacas com mastite, cavalos e cães com lesões, sendo esta estirpe proveniente de outros cães e gatos portadores. Com o decorrer do tempo, tem ocorrido relatos de transmissão de MRSA entre seres humanos e animais (VOSS A. et al., 2005)

A preocupação com a resistência é cada vez maior, frente aos achados de MRSA multirresistentes. Estas infecções são consideradas epidemias em muitos países como EUA, França, Coreia do Sul, África do Sul, Escócia, Dinamarca entre outros. Com o passar dos anos, o número de pesquisas sobre o assunto vem aumentando, demonstrando a preocupação da comunidade médica e científica em sanar as dúvidas e monitorar as epidemias e a epidemiologia do agente (HIRAMATSU, K., 2001).

1.1 JUSTIFICATIVA

Há uma grande pressão e preocupação internacional mediante toda a problemática da presença de bactérias multirresistentes que possam oferecer risco de transmissão dos animais para os seres humanos. O risco se faz perante a cadeia alimentar, através do consumo de produtos contaminados, além de uma preocupação maior de populações como trabalhadores rurais, fazendeiros, médicos veterinários ou trabalhadores da indústria, que possuem contato direto com os animais ou seus produtos (BARLOW, 2011).

A identificação de sequências específicas do *S. aureus* encontradas nos animais de produção, semelhantes às sequências encontradas nos seres humanos, implica que é possível a ocorrência de transferência destes agentes entre espécies (GARCIA- ALVAREZ et al., 2011; SAKWINSKA et al., 2011).

Além de toda a problemática abordada em relação à saúde, tais infecções provocam grandes prejuízos econômicos na Saúde Pública, provocando aumento no número de internações, utilização de medicamentos e equipamentos. Um estudo realizado por Kraker et. al. (2011) na Europa, mostra que estes gastos decorrentes do tratamento de infecções por MRSA custam em torno de 44 milhões de euros. Esses dados reforçam a importância desses microrganismos com a Saúde Pública mundial e também como um problema econômico.

O MRSA tem sua origem ainda pouco estudada, consequentemente, pouco entendida. Algumas pesquisas postularam prováveis origens, contudo, mutáveis de forma muito rápida a medida que novos estudos são feitos (BARLOW, 2011). Por isso toda a informação sobre a ocorrência de resistência torna-se necessária em nível local, regional, nacional e internacional, norteando, encaminhando e promovendo alterações nas estratégias de intervenções sobre a problemática. Assim, pesquisas de monitoramento são necessárias (AARESTRUP, 2004).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Diante do exposto e considerando a importância desses animais como reservatórios de MRSA para os seres humanos, o presente trabalho teve por objetivo a identificação de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), sua caracterização e classificação genotípica e fenotípica, em diferentes amostras provenientes de diferentes propriedades da região oeste do Paraná, especificamente na microrregião de Cascavel, com enfoque para Saúde Pública, verificando a presença de MRSA circulantes na produção leiteira.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Isolar cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente em leite proveniente dos tanques de expansão; animais com mastite subclínica/clínica diagnosticados através da técnica de CMT; suabes de teteiras; suabes das mãos e fossas nasais dos manipuladores destes animais em diferentes propriedades leiteiras em municípios da região de Cascavel –PR;

- Caracterizar genotipicamente as amostras, utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e a Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE);

- Realizar identificação fenotípica através dos testes bioquímicos (Dnase, Manitol, Gram, Coagulase, Catalase e Oxidase) e avaliar a resistência aos antimicrobianos pela técnica de *Breakpoint*.

- Identificar grupos clonais através da técnica de PFGE (Eletroforese em Campo Pulsado), objetivando encontrar cepas similares nas diferentes propriedades ou dentro das propriedades.

- Identificar possíveis interações epidemiológicas através da análise dos fatores de risco associados, buscando entender a dinâmica de transmissão destas cepas entre os homens e os animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O subproduto da hiperfiltração que a glândula mamária dos ruminantes produz, denominado leite, é, mundialmente, um grande alimento tanto para sua prole quanto para o consumo humano. Possui uma variabilidade de nutrientes, enriquecendo o meio e assim, tornando-o suscetível ao ataque de vários micro-organismos presentes no meio ambiente, no próprio animal, no homem e também em todos os possíveis fômites que estão presentes no processo de ordenha (teteiras, toalhas, objetos utilizados para pré e pós *dipping,* entre outros*)* (RIBEIRO et al., 2009).

Podendo conter uma série de microrganismos patogênicos, o leite torna-se um importante veiculador de contaminantes para a população de forma geral. Isso é importante e preocupante, pois a precariedade ou a falta de boas práticas na produção e comercialização tornam o produto um risco à Saúde Pública (NEWWL, 2010).

O leite deve chegar aos laticínios com o menor número possível de contaminantes, e para isto, são importantes as condições sanitárias em que esses animais se encontram. Assim, doenças no rebanho também interferem diretamente na qualidade do leite, sendo a mastite uma das afecções que mais causam prejuízos e danos na qualidade do produto (HALASA et al, 2007).

É uma doença ocasionada por agentes patogênicos que vão alterar os principais componentes do leite, além de causar um impacto na Saúde Pública, por ser um alimento consumido por grande parte da população e passível de veicular diversos micro-organismos. Aproximadamente 130 espécies bacterianas já foram isoladas, identificadas e observadas como causadoras da mastite bovina e muitas ainda podem causar doenças nos seres humanos (SOUZA et al, 2009; JOBIM et al, 2010).

Por sua vez, a mastite pode ser classificada em dois grandes grupos: contagiosa, causada por agentes disseminados entre os animais, durante a ordenha, entre produtores e seus animais, entre outros animais e as vacas em lactação; e ambiental, que como o próprio nome diz, é causada por micro-organismos presentes no ambiente. Para ilustrar de modo geral, entre os principais agentes envolvidos estão *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalacttiae, Streptoccus dysgalactiae, Streptococcus uberis, Corynebacterium bovis,*

enterobactérias, vírus, fungos e outros agentes, até mesmo processos inflamatórios de origem alérgica, metabólica, toxinas e traumáticos (ZAFALON L.F., 2008; FARIA et al, 2017).

Neste contexto, *Staphylococcus aureus* é um patógeno contagioso, reconhecido como um dos principais causadores da enfermidade, com grande capacidade de adquirir resistência aos antibióticos (UDO et al, 2006). Este mesmo micro-organismo também é encontrado na microflora humana como patógeno, causando inúmeras doenças.

Análises da distribuição genotípica de cepas de *S. aureus* de origens diversas demonstraram ocorrência de estirpes em vários hospedeira, sugerindo a presença de algumas linhagens estafilocócicas de origem animal (SUNG et al., 2008).

Como forma de combate ao agente, os antibióticos são a primeira escolha, sendo largamente utilizados no controle e erradicação das infecções no rebanho leiteiro (PYÖRÄLÄ et al., 2009), que também são utilizados para tratamento humano.

Desde de 1940, quando a penicilina começou a ser usada para combater estes patógenos (BARLOW, 2011) a eficiência do medicamento acabou comprometido quando a resistência começa à aparecer nas bactérias.

2.1 Staphylococcus aureus

Pertencente à família das *Micrococeacea*, gênero *Staphylococcus*, são cocos Gram-positivos, com apresentação celular individual ou em pares, cadeias curtas ou ainda agrupados. As colônias em placa possuem presença de pigmento e podem apresentar hemólise em Ágar Sangue de Carneiro, auxiliando na identificação. São anaeróbios facultativos, não produtores de esporos e produtores de catalase. Estruturalmente são bactérias encapsuladas, produzem toxinas (citotoxinas, toxinas esfoliativas, entre outras), além de produção de coagulase e nuclease. O teste de catalase é utilizado como diferencial para os estafilococos catalase positivas (CoPS), apesar de haver relatos de *Staphylococcus aureus* catalase negativa (CoNS) em vários países, inclusive no Brasil (KONEMAN et al., 2001).

Considerado um patógeno associado a infecções adquiridas tanto no ambiente doméstico como hospitalar, possui abrangência variada de “nichos”, sendo denominado patógeno nosocômio (FOSTER, 2009; SINHA & FRAUNHOLZ, 2010). É

um importante causador de doenças, descrito como um agente etiológico das mastites (COELHO, 2009).

A seleção de micro-organismos resistentes ocorre, por exemplo, através dos tratamentos realizados de forma inadequada com a utilização descontrolada de antimicrobianos e tantas vezes, sem protocolos adequados (UNAL et al., 2012). Além de tratamentos sem controle ou de formas inadequadas como tempo, dosagem, antibiótico inadequado para o determinado caso, Schwarz et al. (2008), descreveram alguns pontos que podem ter provocado o crescente aparecimento das bactérias resistentes, como: a) repetida exposição a um agente microbiano, b) acesso das bactérias a um grande *pool* de genes de resistência em um ambiente multibacteriano e c) presença de elementos genéticos móveis.

2.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Na relação seres humanos/ meio ambiente/micro-organismos, estes últimos possuem grande vantagem quanto às adaptações, com mecanismos de resistência ao meio que vivem, respondendo rápido ao que lhes é colocado como barreira. É o que ocorre quando são expostos aos antimicrobianos, usados no tratamento de muitas doenças infecciosas, em algum momento, tornam-se ineficientes e infelizmente novos antibióticos para tratar e conter as bactérias-antibiótico-resistentes ainda não estão disponíveis (SANTOS, 2002).

Segundo Fidler (1998), o desenvolvimento da resistência antimicrobiana, em muitos micro-organismos patogênicos, constitui um dos mais sérios problemas no controle das doenças infecciosas.

Os *Staphylococcus* possuem uma notável capacidade de transmissão de informações gênicas, entre membros da população bacteriana, facilitando a disseminação das características de resistência, entre diversas populações de micro-organismos comensais aos seres vivos. Não obstante, essa capacidade de transferência se dá por vários modos, como mutações (deleção, inserções ou mutações de ponto), propagação clonal ou por transferência horizontal de genes (HGT) que localizam-se em elementos gênicos móveis como bacteriófago, plasmídeos, transposons e absorção de DNA nu (CHAMBERS, 1997).

A forma de transferência por HGT é um importante mecanismo de ação que promove e desempenha ação dentro do processo de transmissão de dados gênicos.

No Reino Unido e EUA, foi observado em infecções hospitalares, mesmo antes da resistência à Meticilina em 1960, um aumento constante na resistência à penicilina, mediada por transferência de plasmídeos entre as bactérias (LENCASTRE et al., 2007; ENRIGHT 2002).

Com isso, em 1967, o MRSA multirresistente foi relatado em vários países, e com o aparecimento do gene *mec*A, esta resistência tornou-se mais complexa. Este é o principal componente que dá origem à resistência nos micro-organismos, não possui uma origem conhecida, mas suas características perfazem cerca de 88% de verissimilidade com o genes de *S. aureus* antibiótico-susceptíveis, sendo portanto um possível precursor evolutivo do gene *mec*A encontrado em estirpes de MRSA (DEURENBERG R.H., 2007).

A aquisição do gene *mec*A foi o ponto de partida para uma plena evolução do MRSA, codificando uma proteína exógena de ligação à penicilina (PBP), conhecida como PBP2a ou PBP2', proporcionando resistência à Meticilina e resistência cruzada a outros β-lactâmicos (BROWN & REYNOLDS, 1980).

Além disso, os *S. aureus* possuem o SCC*mec*, (estafilocócicos cassete cromossomo *mec*) que tem a capacidade de deter/obter inúmeros genes de resistência (IWG-SCC, 2013). Fato que implica a uma capacidade de se obter resistência, de forma adquirida ou mutável, às várias classes de antibióticos. A gama de antibióticos que estes seres possuem resistência torna-se cada vez maior. Resistência a fluoroquinolonas (enrofloxacina, marbofloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina e pradofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, canamicina, tobramicina, estreptomicina), macrolíticos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina e lindomicina), inibidores dos canais de folato (trimetoprim/sulfametoxazole), tetraciclinas, rifampicina e cloranfenicol, foram descritos por Faria et al. (2014), demonstrando uma preocupação emergente quanto a estes micro-organismos, pois cada vez mais, ocorre dificuldade de tratamento às enfermidades causadas pelos agente multirresistentes.

O gene *mec*A não é nativo do *S. aureus*, e é inserido em SCC*mec*, que consiste em um grande bloco de DNA exógeno (KATAYAMA et al., 2000). Este bloco de DNA (SCC*mec*), pode conter certo número de elementos gênicos, como inserções (IS 257 e IS 431), plasmídeos (pUB 110) e transposons (Tn554), permitindo que transportem todo tipo de gene, como os que configurem resistência aos antibióticos e até mesmo genes de desintoxicação de metais pesados. Com tais

características, é considerado como uma ilha de resistência. Além disso, carrega cópias de IS256, distribuídos no genoma do *S. aureus*, fornecendo pontos de acesso para inserção de outros elementos de resistência (KATAYAMA et al., 2000).

Existem cerca de quatro classes (A, B, C e D) de genes do complexo *MEC* (TURLEJ et al., 2011; KATAYAMA Y. et al, 2001). Todos eles possuem o gene *mec*A em sua forma completa, com todos os oligonucleotídeos, uma cópia da sequência de inserção IS431, e às vezes, contém de forma completa ou "truncada" genes reguladores de *mec*, os *mecI* e *mecRI*. Ainda existe o cromossomo cassete recombinase (*ccr*), que dá origem a outras informações de importância ao SCC*mec*, ligados a integrações específicas de sítios e excisão do SCC*mec* (KATAYAMA et al, 2000 e PEACOCK e PATERSON, 2015).

Uma outra forma de resistência, muito encontrada em *S. aureus*, é o gene *bla*Z, que codifica a função de produção da enzima extracelular beta-lactamase. Tendo uma ação reconstitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, sua expressão é mediada por dois genes adjacentes, *blaI* e *bla*R1, respectivamente, um como inibidor da transcrição de *bla*Z e outro anti-inibidor (LOWY, 2003).

O gene *bla*Z, também foi identificado em CoNS (*S. chromogenes, S. hyicus, S. epidermidis*), sugerindo que este gene possa ser a base da resistência nos *Staphylococcus* de forma geral. Frente a isso, relatos provaram a transferência do gene entre CoNS e S. aureus, implicando uma possível participação do CoNS como reservatório para o S. *aureus* (OLSEN et al., 2006).

Os clones dos MRSA demonstram destaque para problemática em Saúde Pública. Sung e Lindsay (2007) relatam a existência de um clone, o ST151, específico de bovinos e comumente encontrado associado à mastite, tem grande potencial de virulência e possui em seu *locus,* capacidade de aquisição de resistência à vancomicina, sugerido por Guinane et al. (2008) como uma ameaça à Saúde Pública.

O clone ST398, isolado em suínos, possui capacidade de causar doença em seres humanos, demonstrando a importância da transmissão de cepas de origem animal aos seres humanos, causando danos à saúde desses (WULF e VOSS, 2008).

Uma pesquisa feita em 2011 identificou estirpes de *S. aureus* (LGA251) isoladas de leite de vacas e de amostras provenientes dos seres humanos no Reino Unido e na Dinamarca, resistentes à meticilina, mas negativas para a presença do

gene *mec*A (GARCIA ALVAREZ et al., 2011). Esta resistência foi estudada molecularmente, e observou-se uma variação no gene *mec*A, com novas características, sendo denominada *mec*C, não detectada com a sequência oligonucleotídea habitual para *mec*A ou com testes de aglutinação de PBP2a, sendo assim um desafio para sua identificação (PATERSON et al., 2014). Uma nova classe, classe E, ficou designada para este novo gene, juntamente com seus novos alótipos dos genes reguladores *mec* (TURLEJ et al., 2011).

Até o momento, a descrição deste novo alótipo de *mec*A foi relatada em seres humanos e no gado de leite, em diversos países da Europa do Norte, como Reino Unido, Dinamarca, Irlanda, Alemanha, França, Suécia e Noruega (PETERSEN et al., 2013). Fora deste âmbito (homem-bovinos), a presença desta nova variante pode ocorrer de forma heterogênea. Walther et al. (2012) demonstraram em seus estudos a presença de *mec*C em animais de companhia e roedores, equinos, coelho, foca entre outros animais.

Existem inúmeros clones ST dentro deste gênero de micro-organismo, alguns específicos de bovinos, que causam grandes infecções em glândula mamária de animais leiteiros e com grande potencial de aquisição de resistência à vancomicina, sendo o caso do clone ST151, revelados em pesquisa realizada por Sung e Lindsay (2007). Estes micro-organismos resistentes em animais demonstram uma grande preocupação para Saúde Pública, pois é de conhecimento que os mesmo não possuem barreiras, circulando entre os ambientes, dos humanos e dos animais, e desta forma possibilitando a transmissão de genes de resistência. Além disso, as bactérias podem sofrer uma adaptação no microambiente humano, causando em ambos os casos, doenças e ameaçando a Saúde Pública (GUINANE et al., 2008).

A expressão de determinada característica pode envolver inúmeros outros genes na codificação com possível expressão gênica para fatores de resistência à meticilina, que ao contrário do *mec*A, sempre estão presentes tanto em bactérias meticilina resistentes ou não. Estes são conhecidos como *fem (factors essential for methicillin resistance*) ou gene *aux (auxilary*), que por sua vez estão diretamente envolvidos na biossíntese da parede celular ou nos genes de resistência (BENSON, et al. 2002). Portanto, *fem* e *aux* estão ligados diretamente na identificação de *S. aureus*, reconhecidos como fator específico deste patógeno (ANGELO, 2010; SILVA et al, 2005).

O MRSA apresenta constantes mudanças, que há décadas vêm sendo estudadas. Antigamente restringia-se às infecções graves e restritas a hospitais e durante décadas esta era a realidade do quadro infeccioso por MRSA. Quando uma nova realidade começou a aparecer, com infecções em pacientes imunocompetentes na comunidade, a preocupação quanto ao tratamento agravou-se. Recentemente, tanto as comunidades médicas quanto veterinárias depararam-se com o surgimento de LA-MRSA e o *mec*C, dando maior preocupação à Saúde Pública, além de uma percepção sobre as linhagens de HA-MRSA (adquirida no hospital) ganharem vantagens de aparecerem como bactérias patogênicas CA-MRSA (adquirida na comunidade) e vice-versa. *(*FIGUEIREDO, 2014; FERREIRA, 2017)

2.3 CIRCULAÇÃO DO AGENTE *S. aureus*

A capacidade notória do MRSA em propagar-se por longas distâncias é relatada por Enright et al.(2000), desta forma os clones específicos internacionais são geralmente associados como HA-MRSA e infecções comunitárias ou CA-MRSA.

Portanto, são estirpes nosocômios de grande importância mundial com aumento substancial a cada ano. O *S. aureus*, é conhecido na produção leiteira como grande causador de mastite e outras doenças graves em animais, como sepse e feridas de difícil cura, sendo que as estirpes de MRSA raramente são isolados a partir de animais, citando como exemplo o trabalho realizado por Van Duijkeren (2007) que isolou MRS de vacas com mastite, cavalos e cães com lesões, sendo esta estirpe proveniente de outros cães e gatos portadores. Com o decorrer do tempo, relatos de transmissão de MRSA entre seres humanos e animais, têm ocorrido (VOSS A. et al., 2005).

Diversos autores relatam sua circulação entre os animais (ARMAND-LEFEVRE et al., 2005; HAENNI et al., 2012; QUITOCO et al., 2013). Um complexo clonal, denominado CC398, teve seu primeiro relato feito entre animais de produção, denominado assim LA-MRSA, descrito na Europa (ARMAND-LEFEVRE et al., 2005). Com os inúmeros estudos ao redor do mundo, observamos relatos de sua detecção em diferentes países da Oceania feito por WILLIAMSON et al. (2013), até mesmo na América do Sul (Peru) como descrito por Arriola et al (2011) e relacionado a

contaminação do leite no Brasil por SILVA et al.(2014). Seu aparecimento provoca preocupação para Saúde Pública, uma vez que foi identificado como causador de doença no homem pela primeira vez por Armand-Lefevre et al. (2005) e Krziwanek et al. (2009). Esta variante de MRSA tem seu começo de forma notória, proveniente dos animais e assim transmitida ao ser humano, ao contrário da maioria dos MRSA relatados nos animais, que possuem agrupamentos ST de estirpes CA-MRSA (encontrados na comunidade) (HAENNI et al., 2012).

Esta linhagem chama bastante atenção da comunidade científica, como colonizadoras, e raramente, causadoras de infecções em suínos. Mas a mesma não se restringe aos suínos, sendo encontrados em cavalos, cães e até mesmo nos seres humanos, levando a um risco de infecções dado a sua baixa especificidade quanto a hospedeiros, causando sérios problemas (VAN DUIJKEREN et al, 2007; WITTE, 2007). Este mesmo micro-organismo foi relatado como patogênico aos seres humanos, provocando doenças e até mesmo surtos em hospitais, levando a uma atenção contínua à procura de micro-organismos com potencial de transmissão e patogenicidade aos seres humanos (WULF e VOSS, 2008).

Com a identificação de sequências específicas do *S.aureus* encontradas nos animais de produção, semelhantes às sequências encontradas nos seres humanos, cogita-se a possibilidade de transferência, tanto genética quanto celular, destes agentes entre as espécies (GARCIA- ALVAREZ et al., 2011, SAKWINSKA et al., 2011).

A utilização de antibióticos também é empregada na produção animal, inclusive como promotores de crescimento. Porém o uso inadequado destes produtos promove um crescente aparecimento de bactérias resistentes, fazendo com que animais venham a ser reservatório destes micro-organismos (SUNG; LINDSAY, 2007).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), as infecções por MRSA chegam aproximadamente a 80.000 por ano nos EUA, com cerca de 11.200 mortes (CDC, 2016). Países da Europa relatam cerca de 170.000 infecções por ano, perfazendo 44% de todas as infecções (ECDC/EMEA, 2009).

Aqui na América Latina, um estudo foi realizado com 33 centros de pesquisas em 11 países (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Guatemala, Honduras, Jamaica, México, Panamá, Porto Rico e Venezuela), pela *Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial* (T.E.S.T.), onde observaram a prevalência geral de MRSA (com

suas duas cepas HA e CA), em torno de 48,3% no período de 2004-2007 (ROSSI 2008). O Programa SENTRY de Vigilância Antimicrobiana na América Latina revelou um aumento na prevalência de MRSA entre infecções estafilocócicas em centros clínicos de 33,8% em 1997 para 40,2% em 2006 (PICÃO, 2008).

O primeiro relato na América Latina de MRSA adquiridos na comunidade foi feito por Galiana et al. (2003) no Uruguai, que descreveram casos de infecções em quatro crianças que não apresentavam os fatores de risco tradicionais para infecção por MRSA nosocômio (GALIANA, 2003). Outro relato conhecido, logo nos primeiros anos de estudo desta afecção na comunidade, foi de Ribeiro et al*.* (2005)*,* observando estirpes de CA-MRSA localizadas em três linhagens isoladas de pacientes com artrite séptica ou infecções da pele e tecido mole (IPTMs) entre 2002 e 2003. Um artigo escrito por Ma et al. (2005), descreveu um grande surto de CA-MRSA em Montevidéu, Uruguai, e sugere que CA-MRSA é um problema crescente na América Latina.

Como relato em bovinos, e comprovando a transmissão deste agente entre seres humanos e animais, temos o artigo publicado por Éva Juhász-Kaszanyitzky et al (2007), da Hungria, que relataram a presença do MRSA em animais leiteiros com mastite subclínica em uma propriedade, correlacionando estas cepas com as de uma amostra de um dos manipuladores dos animais, afirmando a possibilidade de transmissão entre as espécies, possibilitando um canal de contato entre as bactérias, favorecendo a troca de informações e até mesmo adaptação a um novo hospedeiro.

2.4 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE *S.aureus*

Muitos Laboratórios adotam procedimentos de diagnóstico laboratorial clássicos, uma vez que *kits* comerciais, por mais seguros que possam ser, saem caros para a pesquisa e rotina laboratorial. O começo do diagnóstico é feito com a utilização de Ágar Sangue de Carneiro (ASC) desfibrinado a 5%, que apresentará colônias grandes (6-8 mm de diâmetro), convexas butiráceas, β-hemólise e produtoras de pigmentos que variam do amarelo claro ao amarelo-ouro (SANTOS et al., 2008), bem como a utilização de Ágar *BairdParker*, que representará colônias de tamanhos médios, coloração de cinzento escuro a pretas, brilhantes, com halos

transparentes que circundam as colônias (MANUAL BD, 2011). Quando utilizada a coloração por Gram, apresentam células redondas e violetas (Gram positivas), agrupadas ou isoladas, formando cachos (SANTOS et al., 2007; ANVISA, 2017).

Para uma confirmação fenotípica, os testes bioquímicos de Dnase, manitol, catalase, coagulase e oxidase são mais recomendados, caracterizando assim o *S. aureus*. Suas características fenotípicas são avaliadas através dos testes de catalase, coagulase, teste de desoxirribonuclease (DNASE) e fermentação do manitol (KONEMAN et al., 2001).

O agente tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, denominado Ágar manitol salgado ou meio Chapman. Quando positivo, o indicador do pH, que é o vermelho de fenol, torna-se amarelo ao redor da colônia, e negativo quando permanece avermelhado (KONEMAN et al, 2008).

No teste de catalase observamos a formação de bolhas vistas a olho nu porque os *S. aureus* possuem a enzima catalase que desdobra o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio livre. É utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus* (ANVISA, 2017). Esses micro-organismos possuem a proteína coagulase, presente em todas as cepas, podendo apresentar diferentes propriedades sorológicas e antigênicas entre elas, existindo cerca de 10 tipos diferentes de proteínas classificadas até o presente momento (HIROSE, 2010).

Na rotina já estabelecida de diagnóstico, a microbiologia é muito utilizada, porém possuem limitações existentes fazendo com que os protocolos rápidos de biologia molecular para a detecção de patógenos, suas enzimas e genes mutáveis, sejam cada vez mais utilizados (HUYGENS et al., 2006). Sua sensibilidade e rapidez fazem com que a PCR seja uma ótima opção como diagnóstico na mastite e nas características genéticas dos agentes infecciosos (CREMONESI et al., 2006).

Com o avanço da tecnologia, a utilização de técnicas moleculares para o diagnóstico da mastite e para a pesquisa da presença de genes de resistência em amostras microbiológicas, tem melhorado consideravelmente o diagnóstico das enfermidades e possíveis alterações moleculares. Existem várias técnicas descritas na literatuta para o diagnóstico molecular, utilizadas tanto para identificação como para a genotipagem dos agentes causadores de doenças, identificação de seus genes codificadores de toxinas e resistência (GRABER et al., 2009).

Para o diagnóstico de *Staphylococcus aureus,* as técnicas moleculares demandam menor tempo e são mais sensíveis quando comparadas às técnicas clássicas usadas na rotina (YANG et al., 2007).

A proteína coagulase, encontrada no *S. aureus*, é considerada um importante fator de virulência, sendo capaz de promover a coagulação do plasma sanguíneo (GHARIB et al., 2013). No teste fenotípico da coagulase existem fatores ambientais, de leitura e a existência de proteínas ativas que podem dificultar a sua identificação (LO TURCO et al. 2014). Dessa forma, a utilização da PCR para identificação do gene *coag* presente em *Staphylococcus* coagulase positiva torna-se válida pela sua rapidez e confiabilidade (GHARIB et al., 2013).

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) é uma técnica molecular utilizada para verificar similaridade e variações genéticas, baseada na migração de fragmentos obtidos a partir de macro restrição, é frequentemente indicada como padrão-ouro para tipificação. PFGE permite comparações epidemiológicas e de clonalidade, com poder discriminatório e repetibilidade considerados ótimos (SMITH et al. 2005; SZABÒ, 2014).

É considerada a técnica molecular com separação de DNA mais difundida, como padrão para tipificação de *S. aureus*, que é realizada a partir de fragmentos de DNA clivados com a endonuclease *SmaI* para *S. aureus* (CDC, 2016).

Em 2003 foi realizada uma padronização da técnica para a detecção do *S.aureus* denominada "*harmony PFGE Protocol*". Este protocolo é um projeto financiado pela União Europeia (UE), cujo objetivo principal é a padronização dos métodos laboratoriais, no que diz respeito aos agentes patogênicos nosocômios. Vários países (Bélgica, Holanda, Reino Unido, entre outros), reuniram-se com o objetivo de formar uma coleção de cepas encontradas em epidemias europeias e outras cepas importantes MRSA e para isso, desenvolveram um protocolo padronizado que facilita as comparações internacionais e rastreamento de isolados (MURCHAN et al., 2003).

Uma vez obtidos os perfis eletroforéticos de cada isolado, estes podem ser analisados visualmente com base nos critérios de Tenover's ou mesmo utilizando-se de *softwares* pagos, permitindo a comparação de sequências de DNA clivado. A pesquisa realizada por VOSS et al. (2005) descreveram um novo clone, e este não é tipável no PFGE utilizando a enzima *SmaI*, o clone em questão é o ST 398. Isso ocorre devido à mutação que altera a metilação nos resíduos de adenina e citosina

que impedem a clivagem pela enzima de restrição *SmaI*. Outras enzimas foram testadas para tentar clivar e assim padronizar técnicas de PFGE para ST398, sem nenhum sucesso (BOSCH et al., 2010; KADLEC et al.; 2009).

Trabalhos realizados por Kérouanton et al. (2007) e Adkins et al. (2016) demonstram que a técnica de PFGE padrão utilizada possui êxito na tipificação dos isolados de *S. aureus* em surtos alimentares.

Mesmo sendo uma técnica mundialmente adotada para tipificação de cepas, existem desvantagens em sua adoção e confecção da técnica. Alto custo para implantação, dificuldades de padronização de protocolos e critérios para interpretação dos dados entre diferentes laboratórios e restrição das análises em plataformas privadas, dificultam a geração de dados para estudos (CDC, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊS DE ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos setor de Ciências da Saúde (SD – UFPR) com parecer CEP/SD – PB nº 1654362, e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFPR Palotina), com protocolo nº 34/2015.

3.2 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES

As colheitas foram realizadas na microrregião de Cascavel-PR (Cascavel e Santa Tereza do Oeste), microrregião de Toledo – PR (Marechal Cândido Rondon, Palotina, Toledo e São Pedro do Iguaçu) e microrregião de Foz do Iguaçu – PR (Céu Azul e Vera Cruz), localizadas no terceiro planalto do estado, na região oeste paranaense, com uma altitude média de 785 metros. As propriedades (Tabela 1) foram selecionadas de acordo com a concordância dos proprietários e que apresentassem produção leiteira de pequeno a médio porte, tamanho de rebanho variável, contendo raças puras e mestiças.

TABELA 01- RELAÇÃO DAS CIDADES DO PARANÁ ESTUDADAS E QUANTIDADE DE PROPRIEDADES SELECIONADAS

Cidades	Propriedades
Cascavel	4
Céu Azul	1
Marechal Cândido Rondon	17
Palotina	18
São Pedro do Iguaçu	3
Santa Tereza do Oeste	13
Toledo	7
Vera Cruz do Oeste	6
Total	**69**

Fonte: O autor (2017)

3.3 TRIAGEM DAS PROPRIEDADES A SEREM ESTUDAS E ANÁLISES LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS

Foram colhidos 25 mL de leite em tubos tipo *Falcon* com capacidade de 50mL dos tanques de armazenamento que continham o produto final da produção após passagem nos possíveis fômites e veiculadores em 69 propriedades. Os isolados das alíquotas de leite passaram por avaliações genotípicas através do PCR utilizando-se os genes *fem*A, *bla*Z e *mec*A, para caracterizar a espécie *S. aureus* e presença dos genes de resistência.

3.3.1 Aplicação do Questionário Epidemiológico

Foram realizadas perguntas, em forma de questionário, sendo respondidas pelos manipuladores responsáveis pela ordenha no momento das colheitas.

O questionário contou com a presença de perguntas como: qual tratamento realizado na propriedade para mastite, lavagem de mãos na manipulação, presença de pessoas doentes ou animais com dificuldade em melhora com tratamento, número total de animais, coordenadas de manejo e entre outras (ANEXO 3).

Os resultados encontrados e os dados do questionário epidemiológico foram analisados no programa EpiInfo (versão 7.2.0.1), através do qui-quadrado tabelado na ordem 2x2 e correção de Yates, com o objetivo de avaliar os principais fatores de risco relacionados com a presença de MRSA.

3.3.2 Isolamento de *Staphylococcus aureus* das Amostras Colhidas

Cem microlitros de leite *in natura*, homogeneizados foram pipetados e inoculados em placas de Petri descartáveis contendo Ágar Sangue de Ovino a 5% e *BairdParke*r. Foi realizado um procedimento de semeadura em superfície (*spead plate*) com o auxílio de alças de *Drigalski.*

As placas foram incubadas a 36ºC por 24 horas, não havendo crescimento eram avaliadas novamente em 48 horas. Após crescimento, colônias isoladas eram semeadas novamente em placas com o mesmo ágar para isolamento. As colônias identificadas visualmente como *Staphylococcus aureus,* segundo cada característica típica descrita no manual de cada ágar e possivelmente atípicas com características parciais às típicas (somente um halo, opacas, tons mais claros, sem hemólise, entre outras) foram separadas e acondicionadas em microtubos contendo glicerina, congeladas a -20ºC, até o momento da caracterização molecular. Cada tubo continha três colônias com a mesma morfologia.

Como controles em todas as técnicas microbiológicas foram utilizados controles positivos ATCC 25923 (*S. aureus*) e controle negativo ATCC 8739 (*E.coli*).

3.3.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Uma vez que havia mais de um isolado armazenado, foi utilizado um *pool* desses isolados para a extração de DNA. Foi retirada uma quantidade de 10 µL de material de cada tubo e adicionada em caldo BHI. Os tubos foram incubados em estufa a 36ºC *overnight.*

A extração de DNA foi feita utilizando o kit comercial *Wizard®Genomic DNA Purification Kit* e seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante. A qualidade e quantidade do DNA genômico extraído foram determinadas utilizando um Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, Waltham,* MA, EUA). O DNA eluído foi armazenado a -20 ° C até a sua utilização. Em cada ciclo de extração de DNA foram extraídas as amostras de campo, um controle positivo e um negativo.

Os genes de resistência a β-lactâmicos pesquisados foram o *mecA* e *blaZ*, e para confirmação de espécie dos isolados, utilizou-se o *fem*A. Para a reação no termociclador, utilizou-se a amplificação individual dos genes em questão (uniplex),

com a amplificação do gene 16SrRNA que serviu de controle interno da reação. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão listados na Tabela 2.

TABELA 02. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE UNIIPLEX-PCR PARA DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA A B-LACTÂMICOS, ESPÉCIE E 16SRRNA PARA *S. aureus*

gene	Sequência (5'-3')	Produto amplificado	Referência
*mec*A	GATGATACCTTCGTTCCAC GTATGTGCGATTGTATTGC	314 pb	Sfaciotte et al. (2015)
*mec*A	TGGCTATCGTGTCACAATCG3 CTGGAACTTGTTGAGCAGAG	309 pb	Vannuffel et al. (1995)
BlaZ	AGAGATTTGCCTATGCTTC CTTGACCACTTTTATCAGC	516 pb	Vesterholm-Nielsen et al. (1999)
16S	AGGTGGCAAGCGTTATC CGCACATCAGCGTCAG	228 pb	Monday e Bohach (1999)
femA	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132 pb	Dias et al. (2011)

Fonte: O autor(2017)

A reação de amplificação do DNA cromossômico das amostras foi realizada segundo descrito por cada autor (com algumas modificações) (Tabela 03). O volume final das reações foi de 25µL, contendo 12,5µL GoTaq®*Green Master Mix*, 10,5µL água *free* DNA, 0,5µL de cada oligonucleotídio iniciador e 1µL de DNA extraído. As reações foram realizadas no termociclador da marca PCR *Amplitherm Thermal Cycles.*

TABELA 03 – ETAPAS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DOS GENES *fem*A, *mec*A, *blaZ*

Gene	Ciclo	Referências
*fem*A	95ºC por 5 minutos 35 ciclos de : 95ºC por 30 segundos 53ºC por 30 segundos 72ºC por 30 segundos 72ºC por 5 minutos	Dias et al. (2011)
blaZ	94ºC por 7 minutos 30 ciclos de : 94ºC por 30 segundos 50ºC por 30 segundos 72ºC por 30 segundos 72ºC por 7 minutos	Vesterholm-Nielsen et al. (1999)
*mec*A	95ºC por 10 minutos 30 ciclos de : 95ºC por 30 segundos 52ºC por 30 segundos 72ºC por 1 minuto 72ºC por 10 minutos	Vannuffel et al. (1995)

Fonte: O autor (2017)

Como controle positivo para os genes *fem*A, *mec*A, *bla*Z e 16s rRNA, foi utilizada a ATCC 43300 (*S. aureus*) e como controle negativo, água *free* DNA.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador ultravioleta. Para a comparação do tamanho do fragmento amplificado, foi utilizado o marcador de tamanho molecular de 1kb da marca comercial *Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder*.

3.4 COLHEITAS DAS AMOSTRAS NAS PROPRIEDADES SELECIONADAS APÓS TRIAGEM E ANÁLISES LABORATORIAIS DA SEGUNDA COLHEITA

3.4.1 Seleção das Propriedades

Do total das propriedades positivas para a presença do gene *mec*A, quatro delas foram selecionadas para uma segunda visita. A seleção foi baseada na quantidade de vacas em lactação (entre cinco a 20 animais), tipo de ordenha (mecânica) e municípios diferentes ou uma distância considerável entre elas. As propriedades visitadas são pertencentes aos municípios de Toledo, Palotina e Santa Tereza do Oeste.

3.4.2 - Seleção dos Animais

Todas as vacas em lactação das propriedades selecionadas para a segunda fase foram submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT) para o diagnóstico de mastite subclínica, onde as reações eram consideradas positivas a partir da formação de viscosidade à leitura. Foi avaliado também o quadro clínico dos animais, alterações macroscópicas do leite ou da glândula mamária.

3.4.2.1 Realização do CMT e colheita das amostras de leite

Para a realização do CMT foi utilizada uma raquete contendo quatro cavidades e o reagente para CMT comercial. Foram adicionados aproximadamente 2mL de leite na raquete, juntamente com o reagente para CMT, seguido de homogeneização e leitura após 10 segundos. O gel foi formado de acordo com a quantidade de leucócitos presentes, e sua viscosidade indicou o escore de infecção que consistia em negativo quando não havia formação de gel, traços (leve formação de gel) + (fracamente positivo), ++ (reação positiva) e +++ (reação fortemente positiva)**.**

Após o teste de CMT, as amostras de leite com qualquer grau de reação, foram colhidas seguindo os passos: limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v), colheita em tubos de ensaio tipo *Falcon* esterilizados, de 2 a 5 mL de leite, em duplicatas, de cada quarto mamários, antes do início da ordenha. As amostras foram

acondicionadas em recipientes com gelo e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.

3.4.3 Colheita de Amostras das Teteiras

Suabes estéreis foram friccionados em movimentos circulares na porção final de cada um dos insufladores (quatro por cada conjunto de ordenha), em todos os conjuntos de ordenhadeira e colocados em meio BHI sendo transportadas para o laboratório em isotérmicos contendo gelo.

3.4.4 Colheita de Amostras dos Ordenhadores

Foi utilizado um suabe estéreo para a colheita de material da cavidade nasal e outro para as mãos dos ordenhadores.

As amostras foram colocadas em meio BHI para enriquecimento, acondicionadas em caixas térmicas refrigeradas e levadas ao laboratório para análise.

3.4.5 Colheita de Amostras Obtidas dos Tanques de Expansão.

Alíquotas de aproximadamente 20mL foram colhidas diretamente dos tanques de expansão de cada propriedade. Estas amostras foram acondicionadas em tubos tipo *Falcon* de 50 mL estéreis, refrigeradas e levadas ao laboratório para análise.

3.4.6 Isolamento e Identificação De *Staphylococcus aureus* das amostras colhidas

As amostras obtidas através dos suabes foram enriquecidas em meio BHI e após o período de turvação (de no mínimo 12 horas) foram semeada scom auxílio de alça bacteriológica descartável, por estrias, em placas de Petri descartáveis contendo Ágar Sangue Ovino a 5% e *BairdParke*r, para identificação e isolamento de *Staphylococcus.* As amostras de leite *in natura* foram semeadas com auxílio de alças de *Drigalski,* utilizando um inóculo de 100 µL.

As placas foram incubadas a 36ºC por 24 horas e quando não havia crescimento eram avaliadas em 48 horas. As colônias identificadas visualmente

como *Staphylococcus aureus,* segundo cada característica típica (conforme manual do meio nutriente utilizado) e possivelmente atípicas foram separadas e repicadas, com estriamento em ágar. No acondicionamento foram utilizados tubos contendo *Tryptic Soy Broth* (TSB) e logo após o crescimento em estufa a 36ºC por 12 horas foram refrigerados a 4ºC, até o momento da caracterização molecular e fenotípica. Cada tubo continha uma única colônia isolada.

Os testes bioquímicos para identificação de *S. aureus* utilizados foram: catalase, oxidase, DNase, manitol e Gram. Já a coagulase foi realizada com soro fresco de equino, onde a colônia a ser testada era imersa em uma solução de 0,5 mL de soro de equino fresco mais 2 mL de solução fisiológica, e logo após eram incubados a 37º e avaliadas após 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas, conforme Silva et al. (2005).

Como controle em todas as técnicas microbiológicas, foram utilizados controles positivos ATCC 25923 (*S. aureus*) e controle negativo ATCC 8739 (*E.coli*).

3.4.7 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

Os isolados encontrados na segunda colheita foram submetidas ao teste de resistência a antimicrobianos utilizando a técnica de *breakpoint* segundo Bae et al. (2005), que permite a análise simultânea de diferentes isolados, considerando uma concentração fixa do antibiótico, determinada através dos limites de resistência estabelecidos pela CLSI ed 26 (2016). Foram utilizados os seguintes antibióticos em meio Ágar *Screening*: Ampicilina (33µL/mL), Ceftiofur (30 µL/mL), Tetraciclina (80 µL/mL), Lincomicina (19 µL/mL), Tilosina (150µL/mL), Oxacilia (256 µL/mL), Vancomicina (10 µL/mL), Ciprofloxacina (32 µL/mL), Eritromicina (256 µL/mL) e Gentamicina (256 µL/mL). O crescimento do inóculo era avaliado após incubação de 24 e 48 horas, em estufa a 36ºC.

3.4.8 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A PCR foi feita conforme descrita no item 3.2.2, neste caso, testando unicamente cada colônia isolada, acrescida da pesquisa da presença da enzima coagulase utilizando o gene *coag*.

A reação pra o gene *coag* seguiu o ciclo de: 95º C por 5 minutos para a fase de desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 57ºC por dois minutos e 72ºC por quatro minutos, com uma fase final de por cinco minutos a 72º. O par de *primer* utilizada foi descrito por Goh et al (1992), sendo ele: COAG-5 (5'-GGTATTCGTGAATACAACGATGGAA-3 ') e COAG-3 (5'-AAAGAAAACCACTCACATCA-3 '), com produto final de 700/500 pb (CHIOU et al., 2000).

3.4.9 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

As análises de macro restrição do DNA dos isolados bacterianos foram realizadas considerando o protocolo proposto por André et al. (2008), com algumas modificações. Resumidamente, a partir de um inoculo em caldo TSB com densidade óptica de aproximadamente 1 (λ = 590 nm) obtido após incubação a 37 °C por 16 h, 150 µL foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e submetidos à centrifugação a 16000 X g por cinco minutos, com descarte do sobrenadante. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 150 µL da solução *Cell Suspension Buffer* (10 mM Tris–HCl, pH 7.2, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA), acompanhado de 7 µL de solução de lisostafina (1 mg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e 7 µL de solução de lisozima (10 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.), juntamente com 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) preparada a 2% e mantida a 50 °C. Logo após, a mistura foi distribuída nas formas de confecção de *plugs* e deixada em temperatura ambiente para solidificação. Os *plugs* foram então transferidos para micro tubos de 1,5 mL contendo 1 mL da solução *Lysis Buffer* (10 mM Tris–HCl pH 7.2, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.2% desoxicolato, 0.5% sarcosil) e incubados a 37 °C por 1 h. Em seguida, a solução prévia foi substituída por 500 µL de solução de Proteinase K (2 mg/mL - 250 mM EDTA pH 9.0, 1% sarcosil), com incubação a 50 °C por 30 min. Após a proteólise, os *plugs* foram rinsados com 1,4 mL de solução *Wash Buffer* (10 mM Tris–HCl pH 7.6, 0.1 mM EDTA), e em seguida, foram realizadas três lavagens sucessivas com a mesma solução com pausa de 30 minutos em cada lavagem.

Para a digestão enzimática, cerca de 1/5 do *plug* original foi seccionado e posicionado em micro tubos de 0,5 mL devidamente identificados. Os *plugs* foram submetidos à estabilização inicial em 200 µL do tampão da enzima 1X (TE) com repouso de 10 minutos. Após a retirada do tampão prévio, 150 µL do TE 1X foram

novamente adicionados, acompanhados de 20 U da enzima de restrição *SmaI* (Promega Corporation, Madison, EUA), seguido de incubação a 25 °C por 4 h.

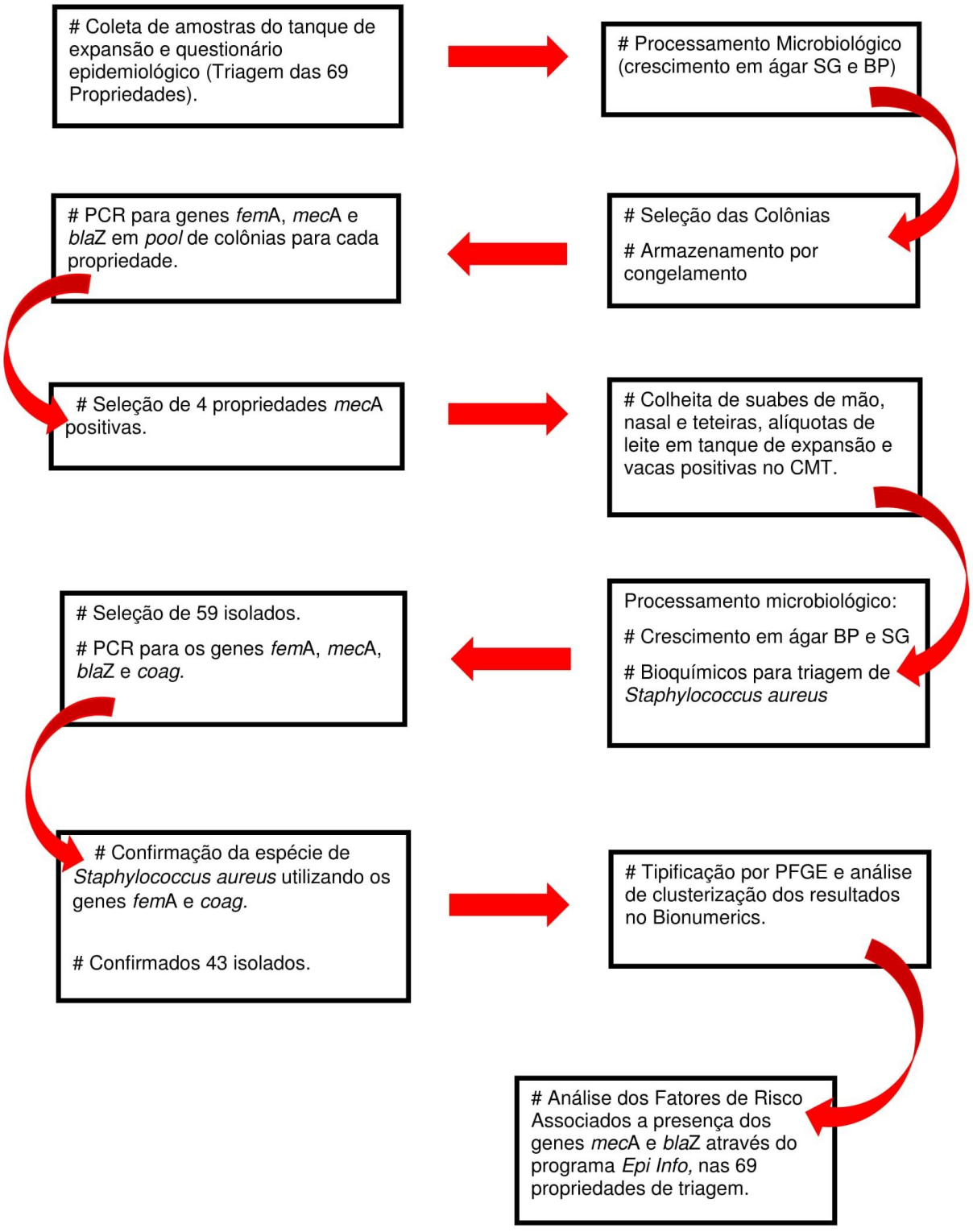
O DNA digerido foi separado em equipamento CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), utilizando o protocolo de 5 - 40 segundos por 20 horas, em ângulo de 120°, 6V/cm, em tampão TBE 0,5X mantido a 14 °C, acompanhado de marcador de peso molecular Pulse Mar-ker™ 50-1,000 Kb (Sigma-Aldrich Co.) em pelo menos duas canaletas por gel realizado.

Os géis obtidos foram revelados em banho de imersão com o corante intercalante GelRed™ 3X (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. As bandas obtidas foram analisadas usando o software BioNumerics v.7.6. Os dendogramas foram obtidos através do método de agrupamento *NJ*, usando o coeficiente de similaridade de *Jaccard*, com *cutt – off* de aproximadamente 60% segundo resultados do *software.*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colheitas de amostras, tipos de amostras e obtenção dos resultados estão representadas no fluxograma apresentado na Figura 1.

FIGURA 1. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE COLHEITA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS NAS PROPRIEDADES LEITEIRAS DO OESTE DO PARANÁ.



Fonte: O autor (2017)

4.1 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À PRESENÇA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Nenhum fator de risco pesquisado foi significativo quando utilizado o programa Epi-Info 7.2, segundo a fórmula do Qui-quadrado e Exato de Fisher. Porém algumas associações apresentaram um valor de *Odds Ratio* alto, sugerindo a presença de fatores de risco.

Foram identificados como possibilidades de risco de se ter o gene *bla*Z e/ou *mec*A as variáveis que obtiveram valores de *O.R.* ≥3, considerada uma forte associação. Valores encontram-se nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 04 - VALORES DE OR EM RELAÇÃO À PRESENÇA DO GENE *bla*Z NAS PROPRIEDADES ESTUDADAS

Variável	*Odds Ratio*
Trata animais com mastite	64,39
Lavar as mãos até 5x	21,21
Produção de leite dia (≥400 litros)	15,23
Local de ordenha (curral)	11,97
Presença de Infecções persistentes	10,58
Raça Holandeza	9,93
Produção de leite dia entre 200-400 litros	8,37
Utiliza antibióticos para diarreia/metrite	8,18
Mais de um tipo de antibiótico nos tratamentos	7,45
Ordenha mecânica	7,45
Utiliza antibiótico para Pneumonia	7,14
Utiliza antibiótico para tratamento no casco	5,85
Produz derivados do leite	6,65
Lavar as mãos somente com água	3,38

Fonte: O autor (2017)

TABELA 05 - VALORES DE OR EM RELAÇÃO A PRESENÇA DO GENE *mec*A NAS PROPRIEDADES

Variável	*Odds Ratio*
Internamento de pessoas que moram ou trabalho na propriedade	28,06
Raça holandeza	15,95
Confinamento	12,92
Mais de 10 tratamentos para mastite/mês	11,82
Leite armazenado até 48h em tanque de expansão	10,19
Está usando ou usou antibiótico nos últimos 6 meses	7,79
Ordenha mecânica	5,94
Uso de pano para secar tetos	5,69
Produção de leite dia entre 100-400 litros	5,68
Infecções persistentes	5,63
Produção semiconfinado	4,49
Mais de um tipo de antibiótico nos tratamentos	4,23

Fonte: O autor (2017)

Observa-se valores que podem ser considerados possíveis riscos para contaminação, manutenção ou expressão do gene nas bactérias encontradas nas propriedades. De forma geral, fatores como uso de antibióticos, ambiente de ordenha, sistema de criação, cuidados com a higiene pessoal, predisposição racial, tamanho da produção e infecções persistentes nos animais, foram as principais chances considerando o *O.R.* ≥3 pela análise univariada.

Estudo realizado por Krewer et al. (2013) mostrou o sistema de produção semiconfinado como significativo para a presença da mastite nos rebanhos. No presente trabalho a relação desse tipo de produção com a presença dos genes de resistência não apresentou diferença significativa, porém apresentou um OR de 4,49 para a presença do gene *mec*A (Tabela 05). Produção confinada também apresentou um OR alto (12,92) para a presença do gene *mec*A (Tabela 05).

Alguns autores afirmam que as vacas criadas em confinamento são mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecções intramamárias, pois existe uma maior concentração de animais, consequentemente exposição à matéria orgânica e aos microrganismos patogênicos ali existentes (KALMUS et al., 2006). Para Krewer et al. (2013), a maior frequência de mastite no rebanho de Pernambuco e na Bahia, está relacionada com o fator nutricional dos animais, já que seus estudos demostram resultados significativos para a ausência de suplementos alimentares fornecidos aos animais.

Além do sistema de criação, a raça dos animais também pode influenciar. Existem raças com maior e menor predisposição para doenças, consequentemente para presença de agentes patogênicos. O presente estudo demonstrou que animais da raça holandesa apresentaram um OR de 15,95 e 9,53 para a presença dos genes de resistência *mec*A e *bla*Z respectivamente (Tabelas 04 e 05). Rangel et al. (2004) afirmaram que essa raça possui uma maior predisposição para doeças.

Krewer et al. (2013) demostram valores de OR ≥ 3 para fatores de risco como: produção de leite por dia, local de ordenha (curral) e uso de pano para secar os tetos. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, como uso de panos na secagem dos tetos (OR 5,63) (Tabela 05); realizar ordenha no curral (OR 11,97) (Tabela 04) e a quantidade de produção leite dia (OR 15,23; 8,37; 3; 5,68 e 3,91) (Tabelas 04 e 05). O uso de pano para secar os tetos pode proporcionar uma disseminação de agentes patogênicos entre os animais, causando a mastite (EMBRAPA, 2017).

Outro possível fator seria a presença do bezerro ao pé, onde o OR encontrado foi de 3,44 (Tabela 05), demonstrando forte correlação. Segundo Silva et al (2011), existe uma relação entre o aumento de contaminação após o bezerro alimentar-se, favorecendo a contaminação do leite quando não realizado pré *deeping*, por exemplo.

Quando os ordenhadores eram questionados quanto à quantidade e como lavavam as mãos, a maioria das respostas era positiva, porém a quantidade de vezes que eram lavadas e com o que lavavam, não foi o suficiente para que o ato fosse considerado eficiente na eliminação de agentes patogênicos, ou ainda os manipuladores podem ter dado uma resposta que não era real quanto as vezes e com o que lavam as mãos. A maioria das respostas era de até cinco lavagens durante a ordenha (OR 21,21.) (Tabela 04). Recomendações feitas por Fonseca & Santos (2001) e Guerreiro et al. (2005), são de que a lavagem das mãos devem ser realizadas antes, durante e após a ordenha, com água e sabão, não especificando a quantidade de vezes que devem lavar, fato que pode contribuir para a presença/permanência dos micro-organismos resistentes e sua disseminação.

Outro OR bastante elevado é em relação ao internamento de alguma pessoa que mora ou trabalha na propriedade, tendo um valor estimado de 28,06 (Tabela 04). A relação do internamento com a presença do gene *mec*A pode ser explicada pelo histórico do gene. *S. aureus mec*A positivo (MRSA), que são estirpes que possuem origem inicial em ambientes nosocômios. Os primeiros relatos de sua presença estavam interligados às pessoas internadas ou que circulavam no ambiente hospitalar. Alguns anos mais tarde, essa presença foi observada na comunidade, demonstrando seu potencial de circulação (FIGUEIREDO et al., 2014).

4.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *S. aureus*

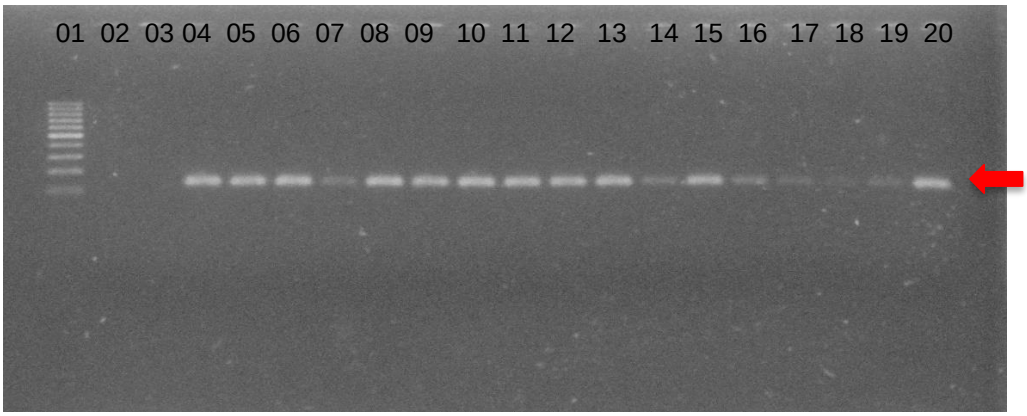
4.2.1 Reação em Cadeia pela Polimerase e Teste de Sensibilidade a Antibióticos

4.2.1.1 Detecção dos genes *fem*A e *coag*

Das 128 estirpes testadas para *fem*A, 103 (80,46%) foram positivas (ANEXO 1 e 2) (Figura 02). A primeira colheita apresentou uma positividade de 86,95% (60/69) e a segunda 72,88% (43/59) na segunda colheita. Esses valores são

semelhantes aos encontrados por Dias et al. (2011), onde testaram 200 amostras provenientes de leite cru e destes, 72,5% (145) foram positivas para presença do gene em questão. Contrapondo os dois resultados apresentados, estudos realizados por Teixeira et al. (2014), analisaram amostras de leite cru no estado de Minas Gerais, encontraram o gene em 100% das amostras.

FIGURA 02 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *femA* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (132 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE DE MIX; 04: CONTROLE POSITIVO; 5 A 20: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS.

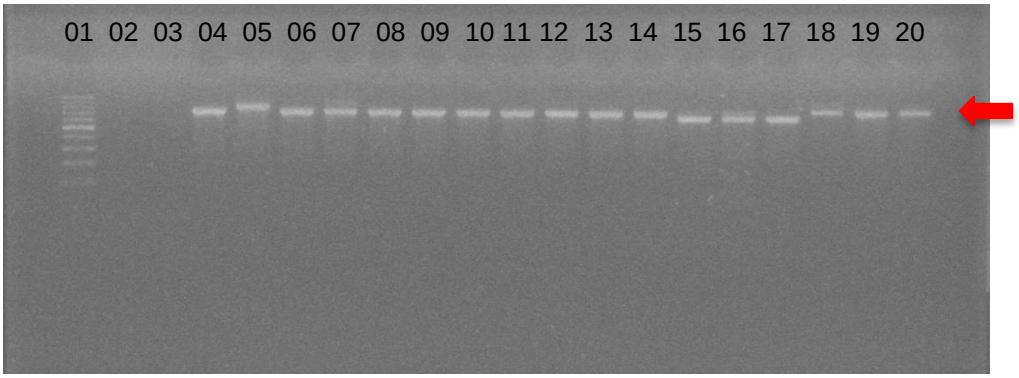


Fonte: O autor (2016)

As porcentagens elevadas encontradas podem ser explicadas pela pré seleção dos isolados que fenotipicamente foram identificados como *S. aureus*, aumentando a probabilidade de ter selecionado realmente essa espécie. O gene estudado é responsável pela codificação de um elemento encontrado na parede do *S.aureus* (Dias el al., 2011; Teixeira et al., 2014).

A detecção do gene *coag* foi realizada somente nas amostras da segunda colheita, onde 100% dos isolados positivos para *fem*A (Figura 03). Resultados semelhantes foram obtidos por Rallapalli et al. (2008), que relataram a existência desse gene em todos os *S. aureus* testados em sua pesquisa. Para o estudo realizado por Gharib et al. (2013), esta similaridade comprova a eficiência da técnica para identificação de isolados *S.aureus*, utilizando *primers* específicos e uma padronização da técnica PCR (GHARIB et al., 2013).

FIGURA 03 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *coag* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (500/700 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE DE MIX; 04: CONTROLE POSITIVO; 5 A 20: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS.



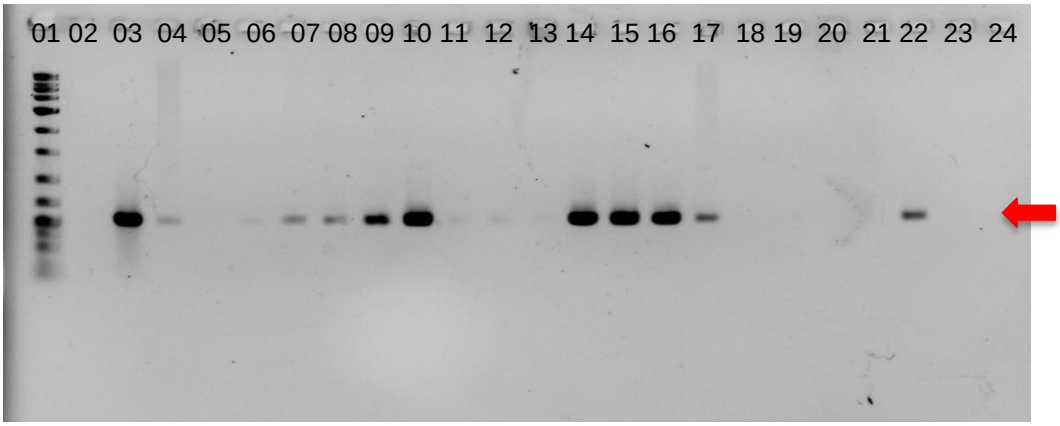
Fonte: O autor (2016)

4.2.1.2 Detecção do gene *bla*Z e teste de sensibilidade a antibióticos

A maioria dos estafilococos, coagulase positiva ou coagulase negativo, são resistentes à penicilina G, bem como à penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina (TAVARES et al, 2001). O teste de susceptibilidade à penicilina de isolados estafilocócicos é realizado na maioria dos laboratórios pela difusão do disco em Ágar. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) define a susceptibilidade à penicilina como uma concentração inibitória mínima (MIC) de penicilina ≤0,12 µg / mL ou como a formação de um halo de inibição ≥29 mm pelo método de difusão em disco. Embora os testes de difusão em disco sejam aceitos como métodos para determinar a susceptibilidade à penicilina, estudos sugerem que estes métodos não detectam com confiabilidade a produção de β-lactamase, recomendam o uso de técnicas com maior acurácia ou associação de técnicas (HAVERI et al, 2005).

O presente estudo identificou 108 (84,37%) de positivos para a presença do gene de resistência *bla*Z (Figura 04), codificante de beta lactamase, testado nas 128 amostras (ANEXO 1 e 2). Ferreira et al (2017) encontraram uma positividade maior, onde 101 isolados foram analisados e 96 (95,04%) apresentavam o gene, porém apenas 17 (16,83%) eram *S.aureus* e destes, três (10,7%) eram sensíveis ao antibiótico penicilina e somente dois deles (66,66%) possuíam o gene em questão.

FIGURA 04 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *blaZ* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (516PB). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE POSITIVO; 04 A 24 AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS E NEGATIVAS.



Fonte: O autor (2016)

Em relação à porcentagem de isolados de *S. aureus,* os valores encontrados foram menores do que os encontrados no presente estudo, onde amostras obtidas na segunda colheita, com total de 59 isolados, 43 (72,88%) eram *S.aureus* caracterizados genotípica e fenotipicamente, sendo 24 (55,81%) sensíveis à ampicilina na técnica de *breakpoint* e 20 (83,33%) destes são *bla*Z positivo. Estes achados também mostram que o teste fenotípico para presença de β-lactamase não reproduz fidedignamente a real presença do gene que causa a resistência. El Feghaly et al (2012) relataram a presença do gene *bla*Z em 10 amostras (9.52%) em um total de 105 isolados, bem menores do que os achados neste trabalho.

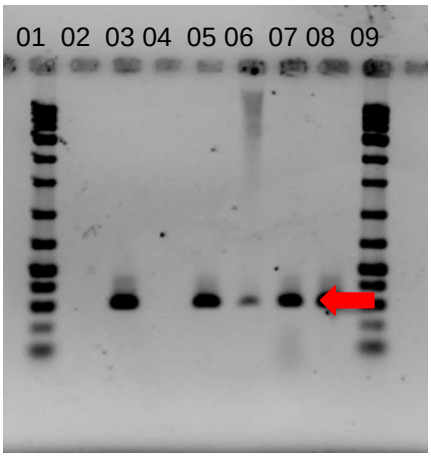
Para McMillan et al. (2016), que pesquisaram isolados encontrados em leite colhidos diretamente nas propriedades produtoras, os achados foram menores para o gene *bla*Z. Em um total de 30 isolados de *S.aureus*, um (3,33%) foi positivo para a presença de *bla*Z e resistente à penicilina, sendo que no presente trabalho foram obtidos 32 (74,41%) positivos ao gene e destes 12 (37,5%) foram resistentes fenotipicamente.

4.2.1.3 Detecção do gene *mecA* e teste de sensibilidade a antimicrobianos

No presente trabalho, das 128 amostras analisadas (ANEXO 1 e 2), 34 (26,56%) foram positivas para a presença do gene *mecA* (Figura 05), diferentes dos resultados encontrados por Can et al. (2017) que não encontraram nenhuma

amostra positiva para o gene em 40 isolados de *Staphylococcus aureus o*btidos de propriedades na província de Hatay, no sul da Turquia.

FIGURA 05 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *mec*A POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (309/314 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02: CONTROLE NEGATIVO; 03: CONTROLE POSITIVO; 04 A 08 AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS E NEGATIVAS; 09: MARCADOR.



Fonte: O autor (2016)

S. aureus que possuem o gene *mecA* e mostram resistência ao teste de sensibilidade ao antimicrobiano para oxacilina/cefoxitina, são definidos como MRSA (SAKOULAS et al. 2001 e SAEED et al, 2014; CLSI, 2015). Foram observados oito (18,60%) isolados da segunda colheita, com gene *mec*A e destes, quatro (50%) são resistentes a oxacilina, portanto caracterizando o MRSA. Estes valores acabam sendo maiores do que os encontrados por Marques et al. (2017), que observaram resultados negativos para a presença do gene *mec*A e resistência à oxacilina em 20 isolados de *S.aureus*.

A expressão do gene *mecA* em cepas de MRSA presentes no cromossomo de SCC *mec*, que constitui um elemento genético móvel, resulta em susceptibilidade diminuída à meticilina / oxacilina (HIRAMATSU et al, 2001) e é ela que principalmente caracteriza a estirpe (CDC, 2016).

O presente trabalho demonstrou a presença de *S. aureus* positivos para *mecA* e *PBP2a*, mas fenotipicamente suscetíveis à oxacilina, achados relatados pelo mundo (SAKOULAS et al. 2001 e SAEED et al, 2014). Geralmente é aceito que estes tipos de isolados sejam classificados como OS-MRSA (IKONOMIDIS et al. 2008). Na segunda colheita, dos 43 isolados de *S. aureus* oito

(18,60%) foram *mec*A positivos e destes, apenas quatro (50%) foram sensíveis à oxacilina. Mistry et al. (2016) obtiveram 19 (48,71%) de 39 isolados *S.aureus* com presença do gene *mec*A e sensíveis à oxacilina, valores superiores aos encontrados no presente estudo.

O surgimento de oxacilina suscetível S. *aureus mecA* positivo (OS-MRSA), complicou ainda mais o cenário de diagnóstico e tratamento. As cepas de OS-MRSA têm sido relatadas em infecções animais e humanas pelo mundo (PU et al. 2014). Embora os OS-MRSA sejam fenotipicamente suscetíveis à oxacilina, pode ser propensos ao desenvolvimento de MRSA fortemente resistente, tanto pela mudança do próprio micro-organismo OS-MRSA para MRSA, quanto pela transferência desta informação para outros isolados. Tudo isso pode ocorrer frente a algum fator que ative este gene nos isolados, como uma seleção decorrente do uso de antibióticos *(*IKONOMIDIS et al. 2008).

A razão para presença deste fenótipo (presença do gene e ausência da resistência ao antibiótico) não é elucidada, mas um estudo sugeriu que as mutações de aminoácidos nas proteínas *fem*XAB (envolvidas na síntese da parede celular) podem contribuir para o fenótipo OS-MRSA (GIANNOULI et al. 2010), além de fatores de regulação intrínsecos as SCC*mec*, como *mecR1 e mecI* entre outros*,* que de alguma forma regulam a presença ou ausência da PBP2a (ROSATO et al. 2003; PEACOCK e PATERSON, 2015).

O teste de susceptibilidade à resistência à meticilina/oxacilina em *S. aureus* pode ser problemático devido à resistência heterogênea exibida por muitos isolados clínicos. Embora os métodos de testes de susceptibilidade sejam padronizados (CLSI, 2015), os poucos isolados que contêm *mec*A e que parecem ser fenotipicamente susceptíveis têm o potencial de se tornarem resistentes se expostos a penicilinas antiestafilocócicas (SAKOULAS et al. 2001).

4.3 ELETROFORESES EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Para a realização da PFGE foi utilizada a enzima de macro restrição de DNA *Sma*I para avaliar similaridade clonal entre os isolados. Foram utilizados 42 isolados de *S. aureus* para tipificação (Tabela 06), que passaram por identificação fenotípica (Catalase, Coagulase, Gram, Manitol e Dnase) e genotípica (genes *fem*A e *coag*), confirmando a espécie das amostras testadas. Pelo menos um isolado de

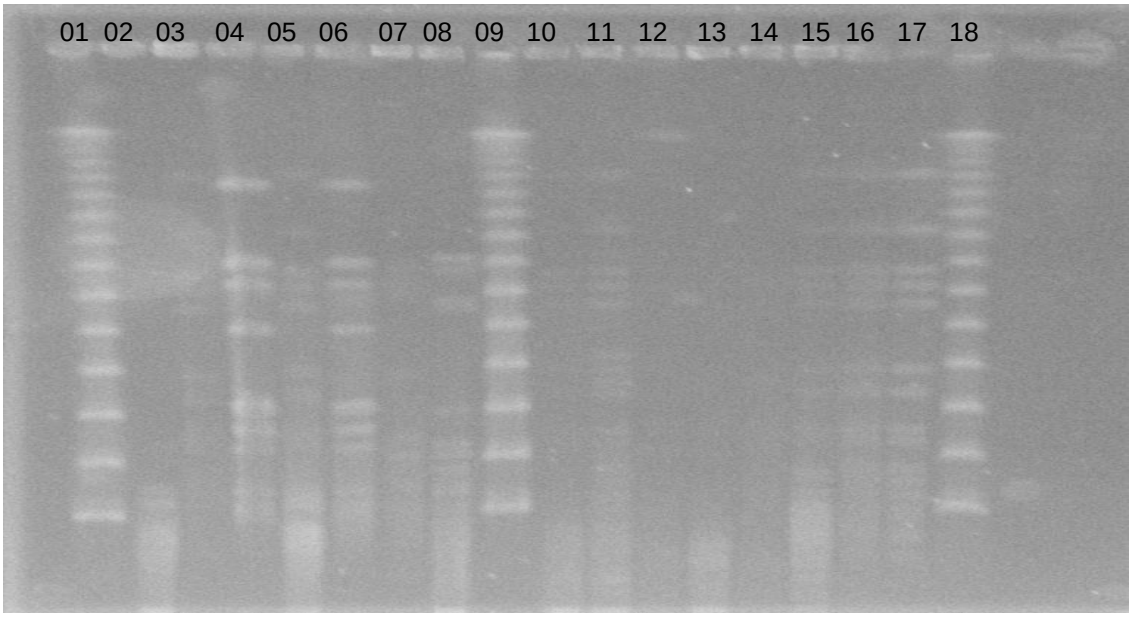
cada tipo de amostra de cada propriedade selecionada na segunda colheita foi levado para tipificação e foram consideradas positivas as amostras que em Gel de Agarose apresentavam produtos da macrodigestão (Figura 06).

TABELA 06 – NÚMERO DE ISOLADOS POR PROPRIEDADE UTILIZADA NO PFGE E RELAÇÃO DAS AMOSTRAS POR LOCAL DE ISOLAMENTO

	Propriedade	**Quantidade de isolados**
	7	6
	23	6
	27	13
	69	17
Total	4	42
	Local	**Quantidade**
	Animais	23 (54,76%)
	Teteiras	11 (26,19%)
	Nasal	4 (9,52%)
	Tanque	2 (4,76)
Total	5	42 (100%)

Fonte: O autor (2017)

FIGURA 06 – GEL DE AGAROSE (2%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DA MACRODIGESTÃO POR *Sma*I NA ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE). 01: MARCADOR MOLECULAR; 02 A 08:AMOSTRAS; 09: MARCADOR MOLECULAR; 10 A 17: AMOSTRAS; 18: MARCADOR MOLECULAR.

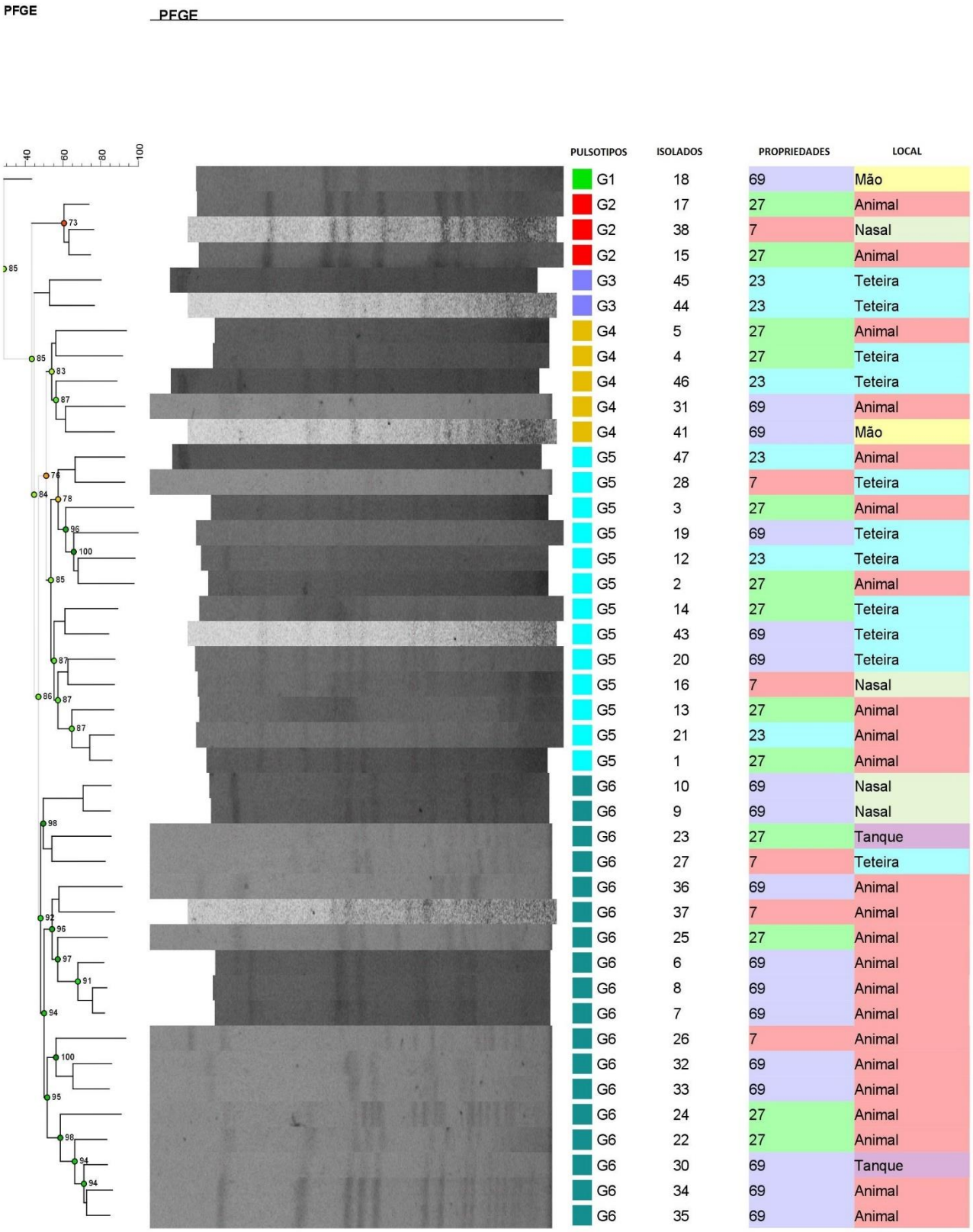


Fonte: O autor (2016)

A maioria dos isolados testados pela técnica de PFGE foi proveniente de animais, totalizando 54,76% (23) e 26,19% (11) foram obtidas de teteiras. Já em relação às quatro propriedades selecionadas, isolados da propriedade 69 perfazem 40,47% (17) do total sendo o maior número de isolados e a propriedade 27 a segunda com 30,95% (13), observados na Tabela 06. A quantidade de cada isolado por propriedade ocorreu mediante crescimento ou não de micro-organismos a partir das amostras colhidas e semeadas em ágar.

No total seis grandes *clusters* SmaI-PFGE G1-G6 foram formados com *cutt-off* de aproximadamente 60%. Dentre os seis grupos, o maior em número de amostras foi o PFGE G6, com n=18 (42,82%), seguido do PFGE G5 com 13 amostras, PFGE G4 com cinco amostras, PFGE G2 com três amostras, PFGE G3 com duas amostras e por último PFGE G1 com 1 amostra (Figura 07).

FIGURA 07 – ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Staphylococcos aureus* DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, SEGUNDO PERFIL NO PFGE.



Fonte: O autor (2017)

A quantidade de *clusters* formada se assemelha aos encontrados por McMillan et al. (2016), onde a partir de 30 isolados de MRSA obtidos de teteiras e leite de três fazendas na Austrália, foram identificados 13 isolados distintos no PFGE, que agruparam-se em seis *clusters*, com 11 pulsotipos. Já os valores encontrados por Sit et al. (2017), onde analisaram isolados provenientes de um hospital na Malásia, foram menores em relação aos números de *clusters*, com apenas três, mas superiores quanto à quantidade de pulsotipos, que foram oito.

Pensando em população clonal, agrupados em *clusters* neste estudo, observamos nas propriedades, uma população bem heterogênea. Foram observados na propriedade 27 e 69, quatro populações clonais, sendo PFGE G2-G4-G5-G6 e G1-G4-G5-G6, respectivamente. Na propriedades 7 e 23 , foram observadas três populações clonais cada, PFGE G2-G5-G6 e G3-G4-G5, respectivamente. Analisando os *clusters* em relação aos locais de origem de dentro das propriedades (animais, teteiras, tanque, mão e narinas), observamos que cada população clonal foi composta por vários isolados de locais diferentes, assim, isolados obtidos de animais possuem uma diversidade clonal muito grande, sendo observado o mesmo para isolados de teteira. Mas isso não ocorre para isolados obtidos de tanque, que são encontrados somente no cluster PFGE G6, representando uma “homogeneidade clonal”. Dados encontrados no estudo realizado por McMillan et al. (2016), corraboram no ponto em que ocorre uma diversidade de população clonal nos isolados obtidos de bovinos, mais divergem quanto ao relatado sobre a população clonal nas fazendas, sendo que em seu trabalho, cinco populações são consideradas homogêneas e somente uma apresentando heterogeneidade em seu trabalho.

Para Saúde Pública, um fato importante e curioso ocorre em relação à similaridade dos isolados encontrados, inferindo que isolados obtidos independente da propriedade e local de colheita, podem possuir similaridade clonal. Isolados de mãos encontrados na propriedade 69, possuem dois pulsotipos diferentes: um encontrado em PFGE G1 (amostra 18), e outro em PFGE G4 (amostra 41), que por sua vez, assemelha-se ao isolado de um animal da mesma propriedade (amostra 31), e com uma similaridade menor, possui mesma semelhaça dos isolados obtidos em propriedades e locais de colheita diferentes. Outro dado importante observado, é de que isolados encontrados na narina do ordenhador da propriedade 7 (amostra

16) se assemelha aos encontrados na propriedade 69 (amostra 20), proveniente de teteira e estas propriedades são separadas por aproximadamente 56 km.

Haveri et al. (2008) observaram relações semelhantes aos encontrados na propriedade 69. Esses autores relataram que obtiveram isolados bacterianos idênticos tanto no equipamento de ordenha quanto nos encontrados nas mãos e narinas dos ordenhadores, demostrando a colonização do agente em diferentes sítios dentro da mesma propriedade. Já o ocorrido com as amostras 16 e 20, obtidas de propriedades diferentes, foi observado por Febler et al. (2010) e Adkins et al. (2016), que relataram a presença de pulsotipos iguais, encontrados em casos de mastite, em fazendas diferentes. Os fatos relatados pelos autores também corraboram com os outros achados do PFGE no presente estudo, quanto à presença de populações clonais distintas em propriedades e locais de colheita diferentes. No presente estudo foi observado que amostras provenientes de origem (propriedades) e locais (dentro das propriedades) diferentes, estão alocadas em diferentes grupos (Figura 05).

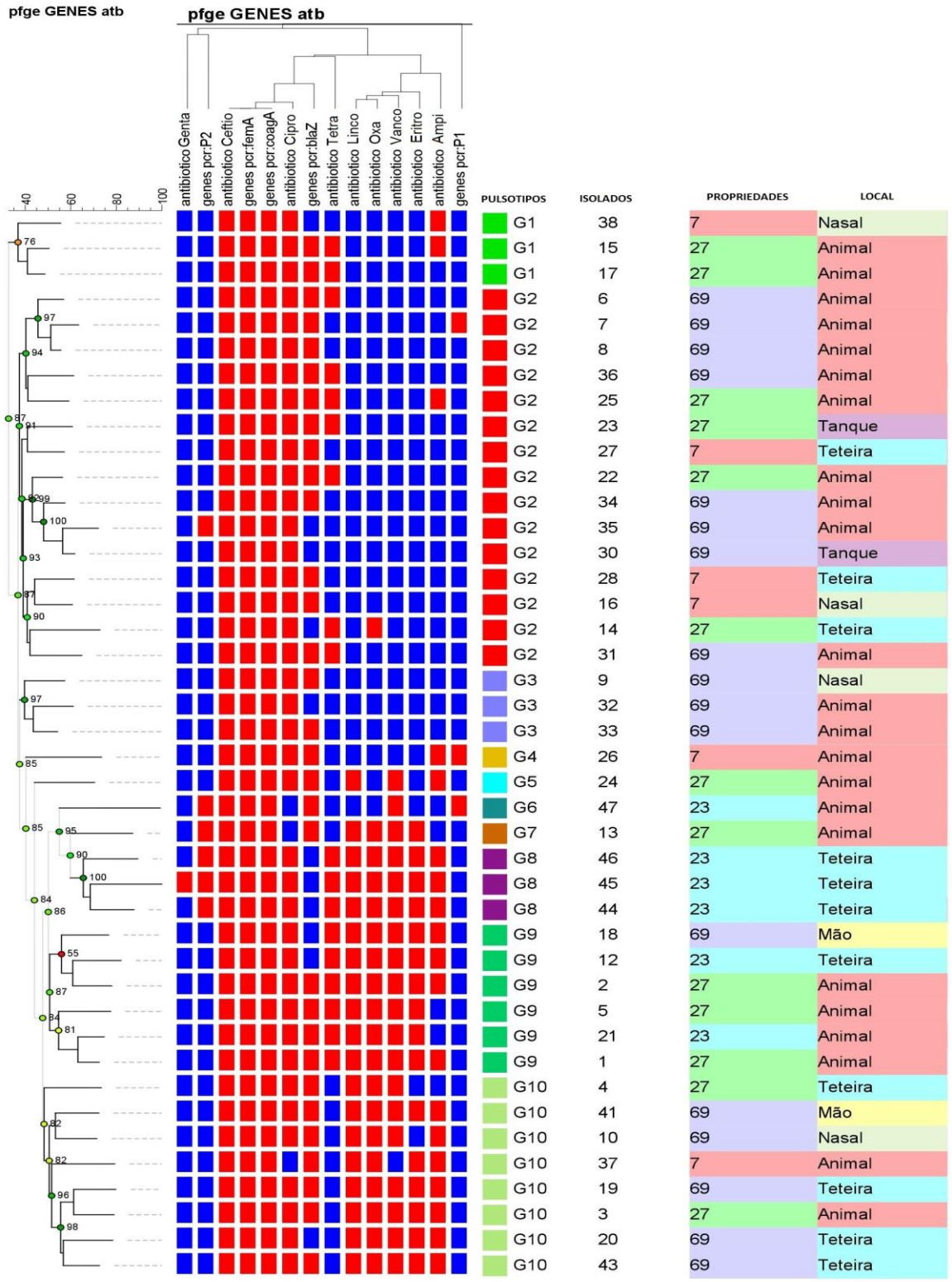
Esta diversidade clonal está presente em vários micro-organismos, resultado de um processo de seleção (natural ou iatrogênicos), com presença de eventos microevolutivos que ocorrem diariamente dentro e entre as bactérias, promovendo uma variabilidade genética muito grande na própria espécies (OTE et al. 2011). A ampla distribuição das populações genotípicas, ou seja, a presença de micro-organismos similares em localidades diferentes (dentro e entre propriedades) é relatada na literatura, pela ocorrência de fatores de risco que possam de alguma forma transferir ou vinculá-los. Um estudo realizado por Voss et al. (2005) relata a presença de um mesmo MRSA ST398, proveniente de animais, em um caso de presença do agente observado em um suinocultor e outro caso em um paciente cujo o pai era veterinário, indicando um risco aumentado de transporte de MRSA. Fatores como veiculação aérea, transporte de animais, circulação dos produtores, promovem esta circulação. Schulz et al., (2012) relataram a presença do mesmo LA-MRSA em galpões de suínos diferentes, com uma distância entre elas de 50, 150 e 300 metros.

Quanto à presença dos genes de resistência nos *clusters PFGE*, observamos que existe uma distribuição, sendo a maioria dos grupos positvos para o gene *mec*A. PFGE G3,4,5 e 6, possuem pelo menos um isolado positivo para *mec*A. Estes achados não são comparáveis com os encontrados por Harveri et al.

(2008) e McMillan et al. (2016), que não obtiveram positividade em nenhum dos isolados que se encotram na análise de PFGE.

Em relação à presença ou ausência de resistência a antibióticos e presença dos genes *mec*A e *bla*Z, o Dendograma PFGE GENES ATB (Figura 08), apresenta dois tipos de padrão, de forma geral. Estes padrões dividem-se em “sensíveis” e “resistentes”.

FIGURA 08 – ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Staphylococcos aureus* DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, SEGUNDO PERFIL DOS GENES E ANTIBIOGRAMAS TESTADOS. AS CORES NAS COLUNAS DO ANTIBIÓTICO E GENES, QUANDO EM AZUL = AMOSTRAS NEGATIVAS E QUANDO EM VERMELHOS = AMOSTRAS POSITIVOS.



Fonte: O autor (2017)

Os *clusters* G1 e 4 são identificados, quase que homogeneamente, como um padrão sensível. Quanto à diversidade de populações genéticas encontradas no PFGE, este agrupamento apresenta majoritariamente o *cluster* PFGE G6 (68,18%), e o restante (31,82%) representados por PFGE G2 e G5 com três amostras cada e PFGE G4, por uma amostra (Figura 07).

Portanto o *cluster* PFGE G6 (Figura 07), possui uma poplulação clonal mais sensível, com presença dos genes de resistência, sendo representado por 15 isolados (83,33%) sensíveis à maioria dos antibióticos, sendo o inverso também verdadeiro, com a presença de 68,18% do total de isolados dentro do agrupamento "sensível", seguido dos *clusters* PFGE G2 e G5 (Figura 07), que possuem juntos, 27,27% dos representantes do grupo "sensível".

Em relação à característica "sensível", observamos 50% dos isolados provenientes da propriedade 69 foram considerados sensíveis, seguidos pela propriedade 27 com 27,27% (Figura 08). Diversos fatores podem ter influênciado esses resultados como: forma de manejo; raça dos animais, uma vez que a raça predominantemente encontrada foi a Gir, considerada fortes frente a diversos patógenos (RANGEL et al. 2004); a baixa quantidade de vacas em lactação, com até 10 animais, levando a um melhor manejo; e realização de pré e pós *dipping,* como preconizado pela EMBRAPA (2017) e Arcanjo et al. (2017). Quanto ao tratamento dos animais doentes, os proprietários afirmaram uma baixa ocorrência de enfermidades além de nunca terem observado problemas no tratamento dos poucos animais que vieram a adoecer, mostrando o provável cuidado dentro da propriedade com o manejo, além de animais mais resistentes naturalmente.

Quanto à classificação dos isolados obtidos de locais específicos de colheita, a maioria foi proveniente de animais, com 63,63% do total e os dois (100%) isolados obtidos dos tanques de expansão, somente encontram-se neste agrupamento (Figura 08).

Mesmo com uma homogeneidade, existem exceções dentro deste grupo "sensível", como as observadas em quatro amostras com presença de resistência ao antibiótico ampicilina, e uma amostra (14) com resistência a oxacilina. Já para a presença do gene *mec*A, obtivemos três resultados positivos. Pensando ainda nas exceções, temos o *cluster* G4, que possui um único representante, sendo este *mecA* e *bla*Z positivos, e fenotipicamente resistente à ampicilina, diferente da maioria dos isolados deste grupo. Este isolado apresentou um pulsotipo que está localizado no

cluster PFGE G6, tendo similaridade clonal com outros pulsotipos mesmo que fenotipicamente e no PCR apresente um padrão diferente e por isso, isola-se na clusterização do Dendograma Antibióticos e Genes (Figura 08).

Os *clusters* G5,6,7,8,9 e 10 são agrupados no padrão que consideramos mais “resistentes”, observado no Dendograma PFGE GENES ATB (Figura 07). Quanto à diversidade de populações clonais encontradas no PFGE, este agrupamento é representado por 50% de isolados com pulsotipo do *cluster* PFGE G5, e o restante representados pulsotipos dos *clusters* PFGE G1,3,4 e 6, respectivamente com 1,2,4 e 3 amostras cada.

Assim, o *cluster* PFGE G5 (Figura 07), possui uma população clonal mais resistente, com presença de genes, representada por 10 isolados (50%) resistentes, sendo o inverso também verdadeiro, com um total de 76,92% (10 amostras) do *cluster* PFGE G5 que apresentam resistência. Em seguida o cluster PFGE G4 (Figura 07), possui 80% de seus representantes neste “complexo resistente”.

Em relação às propriedades neste padrão, a propriedade de maior prevalência é a 27, com 35%; em seguida observamos uma igual representação pela 23 e 69, com 30% cada (Figura 08). Uma exceção ocorre para propriedade 23, que apresentou um único padrão, o de “resistência”, porém possui populações clonais distintas. Isso nos leva a pensar que este local, tende a ter micro-organismos distintos e mais resistentes, talvez relacionados com o tipo de manejo adotado na propriedade. Esta propriedade possuía um local não específico para a retirada do leite, sendo a propriedade com maior número de animais em lactação; possui vacas predominantemente holandesas , relatado por Rangel et al. (2004) como animais com maior susceptiilidade a doenças, e a forma de criação dos animais é semiestabulada, meio este de criação, relatado por Krewer et al. (2013) como fator de risco para aquisição de enfermidades. Quanto ao pré e pós *dipping*, segundo o ordenhador eles são realizados, porém não fazem a secagem dos tetos. O que pode proporcionar uma contamição da teteira, que será utilizada em outros animais, pois a água que respinga no úbere durante a lavagem do teto, pode escorrer, carreando micro-organismos, além da possibilidade de deslizar a teteira, entrando ar e micro-organismos (Arcanjo et al 2017).

O ordenhador nesta propriedade não lavava as mãos como recomendado pela EMBRAPA (2017). Na propriedade já foram observados animais com difícil

convalescença, persistindo a doença mesmo mediante a utilização de vários antibióticos, caracterizando a possível presença de patógenos com resistência.

Quanto ao local de colheita, 45% (9) das amostras eram provenientes de animais, seguido por 40% (8) de isolados obtidos das teteiras.

Neste agrupamento de “resistência” foram observados três *clusters* (G5, 6 e 7) (Figura 08) que possuem um único isolado cada. Dentre estes, dois (G6 e G7) são sensíveis à ciprofloxacina, representando 66,67% dos três únicos isolados com sensibiliadade a ela; possui pulsotipos clusterizados no PFGE G5, sendo portanto assemelhantes a outros isolados considerados, de forma geral, resistentes. O cluster G6 caracteriza-se por possuir resistência somente à vancomicina e ceftiofur, com sensibilidade aos demais antibióticos, com presença do gene *mec*A. Pu et al. (2014) relataram em seus estudos, estirpes com características a sensibilidade similares, onde amostras positivas para *mec*A foram susceptíveis à ciprofloxacina.

Quanto à gentamicina, para o grupo de “resistência”, a sensibilidade ocorreu em 95% (19) das cepas. Observando todo o Dendograma (Figura 08), a sensibilidade para este antibiótico ocorreu em 97,61%, sendo assim o antibiótico com maior eficácia sobre as cepas testadas. Dentre os outros antibióticos que apresentaram padrões de resistência/sensibilidade mais variável dentro do agrupamento “resistente”, a tetraciclina apresentou maior número de isolados, com 11 amostras sensíveis (55%).

A sensibilidade à oxacilina foi relatada em duas amostras (47 e 24), que encontram-se nos *clusters* G6 e G5 (Figura 08) mencionados acima, sendo uma das duas positivas para o gene *mec*A, caracterizando um isolado OS-MRSA, como discutido no item 4.2.1.3. Para Ampicilina, cinco amostras (25%) apresentaram sensibilidade, todos com positividade para o gene *bla*Z.

Um isolado, representado pela amostra 45, presente no *cluster* G8 (Figura 08), faz parde do padrão “resistentes”, sendo o únido destes que possui resistência à gentamicina. Sua característica é de multiresistência, com crescimento na presença de todos os antibióticos testados e presença dos genes de resistência *mec*A e *bla*Z. Este achado não corrabora com o encontrado por Pu et al. (2014), que relatam a susceptibilidade à gentamicina em todos os seus isolados positivos para *mec*A.

Ainda em relação à resistência, o único isolado que representa o *cluster* do PFGE G1 (Figura 07), encontra-se neste complexo. Este não apresenta os genes

testados para resistência mas possui resistência à maioria dos antibióticos; do total de nove antibióticos testados, apresentou somente sensibilidade à gentamicina, característica que pode ser explicada pela grande versatilidade quanto aos mecanismos de defesa frente aos desafios ambientais que lhes são expostos (ANTONIO et al. 2009).

Marques et al. (2017) relataram um isolado que era negativo quanto aos genes de resistência, mas possuía uma alta resistência fenotípica à cefoxitina; sua explicação baseia-se na alta produção de biofilme, confirmadas por testes fenotípicos e genotípicos em seu trabalho. *S.aureus* possui inúmeros fatores que promovem sua virulência e resistência (produção de enzimas lactamases, PBP2a, produção de biofilme, enzimas de degração, toxinas), mas não existe um único fator que explicaria tal ocorrência. Sua capacidade de desenvolver diversos mecanismos, faz com que estas bactérias tenham grande potencial de provocarem doenças e resistir ao obstáculos que lhes são apresentados (SILVA et al., 2015).

5 CONCLUSÕES

- As linhagens genéticas dos isolados provenientes das propriedades da região de Cascavel – PR são heterogêneas;
- A variabilidade genética existente em populações naturais de *S.aureus* faz com que ocorra uma presença de variadas características fenotípicas e genotípicas nos isolados obtidos;
- O perfil de similaridade encontrado no PFGE demonstra que em cada propriedade existe uma heterogeneidade quanto a variedade genética dos isolados encontrados, sugerindo que propriedades diferentes possuem micro-organismos similares, implicando em uma possível circulação destes agentes em diferentes regiões e até mesmo entre locais, como dos animais aos seres humanos ou vice-versa;
- Houve uma variedade quanto as possibilidades de resistência dos micro-organismos, com isolados apresentando somente a resistência fenotípica, outros com resistência genotípica e outras com resistência genotípica e fenotípica;
- Analisando os possíveis fatores de risco, observa-se vários pontos dentro da cadeia de produção do leite na região de Cascavel – PR, com possíveis falias

em sua rotina de ordenha e manejo, como tratamento dos animais doentes e uma falta de conhecimento dos produtores no que utilizam, além de forma de criação dos animais, higiene pessoal, capacidade de produção de leite da propriedade, armazenamento entre outros fatores, que levam ao aumento dos riscos e possível disseminação e/ou desenvolvimento de agentes MRSA.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A crescente biodiversidade de MRSA e a presença destes em vários nichos, sugerem que o agente não possa ser erradicado facilmente. É de grande valia o estudo sobre os fatores atuais que possam observar as vantagens a estes micro-organismos, para que possam ser de alguma forma transformada em uma desvantagem para eles. Assim, o transporte de *mecA*, *bla*Z e das inúmeras características de resistência, precisam ser reprimidos e destruídos para mediação de controle destes genes.

Devido ao seu grande potencial de evolução de HA-MRSA e CA-MRSA, as estirpes de MRSA relacionadas à pecuária representam uma grande ameaça para a Saúde Pública. A variabilidade genética de MRSA está cada vez maior, e isso permite uma circulação facilitada entre nichos, desde locais controláveis, como hospitais e pequenas comunidades, até dentro da pecuária e grande metrópole, consequentemente, já não pode ser considerado um problema exclusivo associado ao hospital. Isto é observado no presente trabalho, onde encontramos essa “possível circulação”, frente aos vários pulsotipos encontrados em localidades diferentes.

Podemos inferir que a utilização de antibióticos β-lactâmicos, bem como outras classes, deveriam ser utilizados quando comprovadamente eficazes, diminuindo as chances de bactérias portadoras de genes resistentes ou genes “facilitadores” de sua aquisição, expressassem suas características frente aos desafios ambientais provocados pelo uso destes medicamentos ineficazes e até mesmo de forma errada; transformando cepas OS- MRSA/MSSA em cepas MRSA, causando prejuízos e problemas à Saúde Pública.

As pesquisas apontam que o MRSA CC398 tem um alto potencial de transmissão e também uma alta probabilidade de persistir na população animal. Além disso, estas bactérias sobrevivem nos ambientes onde vivem o que

pode funcionar como uma fonte adicional de contaminação por MRSA. A grande problemática quanto à circulação destes micro-organismos, principalmente para o homem, faz com que a presença de MRSA em rebanhos leiteiros da região de Cascavel-PR, venha a ser dados importantes para tomadas de medidas e pesquisas. De fato, as pessoas em contato direto com os animais, no caso os ordenadores, estão em maior risco de serem colonizados com MRSA e uma vez que foram isolados *S.aureus* provenientes de animais, e estes também possuíam pulsotipos iguais aos encontrados nos ordenadores.

A análise das possibilidades de fatores de risco associados à presença dos genes de resistência e a observação de animais com ocorrência da mastite, fornece subsídios para a elaboração de programas de prevenção e controle adequados para a resistência em questão, melhorando a produtividade dos animais envolvidos e, consequentemente, a lucratividade do sistema de produção, e principalmente à prevenção em relação a circulação ou mutação dos micro-organismos resistentes.
Considerando isso, MRSA parece ser uma ameaça de Saúde Pública, já que somente a presença do gene facilita o aparecimento de resistência aos tratamentos antimicrobianos. O potencial de capacidade do MRSA para adquirir genes de virulência e resistência incorpora a potencial adaptação em estirpes mais virulentas, e no estudo aqui realizado, observamos que praticamente todos os tipos de pulsotípos, possuíam algum tipo de resistência, seja ela genotípica ou fenotípica, provocando preocupação, já que nada impede destas informações serem expressas ou transferidas a outros isolados. Mais importante ainda, estas bactérias associadas a animais são um reservatório de genes de resistência. Assim, enquanto os programas de erradicação enfrentam um alto potencial de falha, pode ser mais sábio pesquisar continuamente a evolução (incluindo a presença de virulência e genes de resistência) de MRSA associado a animais entre o gado leiteiro (e outros animais).

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: Principles and limitations. **Journal of Veterinary Medicine Séries B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health,** v.51, n.8-9, p. 380-388, 2004**.**

ADKINS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R. E FOX, L. K. Comparison of Virulence Gene Identification, Ribosomal Spacer PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of Staphylococcus aureus Strains Isolated from Cases of Subclinical Bovine Mastitis in the United States**. Journal of Clinical Microbiology,** v.*54, n.*7, p.1871–1876. 2016. DOI: http://doi.org/10.1128/JCM.03282-15

ANDRÉ, M.C.D.P.B.; CAMPOS, M.R.H.; BORGES, L.J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F.C.; SERAFINI, Á.B; Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *Sma*I digestion. **Food Control.** v.19, p. 200-207, 2008.

ANGELO F.F. Detecção de genes de enterotoxinas em staphylococcus spp. isolados de leite cru refrigerados e de leite de vacas com mastite**. Tese apresentada para título de doutorado.** Viçosa – MG, 2010.

ANTONIO, N.S.; OLIVEIRA, A.C.; CANESINI, R.; ROCHA, J.R. Mecanismos De Resistência Bacteriana. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária.** N. 12. 2009. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/UuBDHbHjev9rGKV_2013-6-21-11-52-49.pdf. Acesso em: janeiro de 2015.

ANVISA, RESISTÊNCIA MICROBIANA – Mecanismos e Impacto Clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm. Acesso em: 2017.

ARAÚJO, W.P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.35, n.4, p. 161-165, 1998. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v35n4/35n4a03.pdf>. Acesso em: fevereiro de 2015.

ARCANJO A.H.M.; OLIVEIRA P.C.S.; MOREIRA L.C.; JAYME C.G.; SOARES N.A.; OLIVEIRA A.R.; PEREIRA K.A.; NOGUEIRA M.A.R. Programa Dos Seis Pontos De Controle Da Mastite Em Rebanhos Leiteiros. Global. **Science and Technology**, Rio Verde, v.10, n.01, p.78 – 88, 2017.

ARMAND-LEFEVRE, L.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls and pigs. **Emerging Infectious Diseases journal.** ed. *11*, p. 711-714, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320358/ >. Acesso em: março de 2015.

ARRIOLA, C.S; GÜERE, M.E.; LARSEN J.; SKOV, R.L.; GILMAN, R.H.; GONZALEZ, A.E.; SILBERGELD, E.K. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs in Peru. **PLoS ONE***,* ed. *6,* 2011. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028529>. Acesso em: fevereiro de 2015

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, n.4, p. 384-407, 2011. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984469>. Acesso em: maio de 2015.

BENSON.E.; PRINCE D.B.; MUTCHLER V.T.; CURRY K.A.; HO A.M.; RONALD W.; SARVER; HAGADORN J.C.; CHOI G.H.; GARLICK L.R. X-Ray Crystal Structure Of *Staphylococcus Aureus* Fema. **Structure.** V.10, P.1107-1115. 2002.

BOSCH T.; NEELING A.J.; SCHOULS L.M; VAN DER ZWALUW K.W.; KLUYTMANS A.J.W; GRUNDMANN H. E HUIJSDENS X.W. Pfge Diversity Within The Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clonal Lineage St398. **Bmc Microbiology.** 2010. **Doi:** 10.1186/1471-2180-10-40 . Disponível Em : Https://Bmcmicrobiol.Biomedcentral.Com/Articles/10.1186/1471-2180-10-40#Declarations

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

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de Produção, Identificação e Qualidade do leite tipo A; Regulamento técnico de Produção e qualidade do Leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de dezembro de 2011. Seção 1, p. 6-11.

BROWN, D.F.J.; REYNOLDS, P.E. Intrinsic resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **FEBS Lett.** *ed.122*, p. 275-278. 1980.

CAPURRO A.; ASPÁN A.; ERICSSON UNNERSTAD H.; PERSSON WALLER K.; ARTURSSON K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.180-191. 2010.

CAVALCANTI S.M.M.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M. A.; Montenegro F.M.D. & Medeiros Â.C.R. Prevalence of Staphylococcus aureus introduced into intensive care units of a University Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases,** v.*9, n.*1, p.56-63. 2005. https://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702005000100010

CAN, H. Y., ELMALI, M., & KARAGÖZ, A. Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus*Strains Isolated from Raw Milk, Cheese, Minced Meat, and Chicken Meat Samples. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.*37, n.*2, p. 175–180, 2017. http://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.175

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureu.* Disponível em: < http://www.cdc.gov/mrsa/healthcare/>. Atualizado 2016. Acesso em: junho de 2016.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172944/ >. Acesso em: abril de 2015.

COELHO S.M.O.; REINOSO E.; PEREIRA I.A.; SOARES L.C.; DEMO M.; BOGNI C. e SOUZA M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro**. Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.5, p369-374. 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n5/02.pdf

CREMONESI P.; CASTIGLIONI B.; MALFERRARI G.; BIUNNO I.; VIMERCATI C.; MORONI P.; MORANDI S; LUZZANA M. Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **Journal Dairy Sciencie**. v.9, n.11, p.163-9. 2006.

DEURENBERG, R.H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E.E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 13, n.3, p. 222–35. 2007.

DIAS, N.L., SILVA, D.C.B., OLIVEIRA, D.C.B.S., FONSECA JUNIOR, A.A., SALES, M.L., & SILVA, N. Detecção dos genes de Staphylococcus aureus, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária *e Zootecnia***. v.63, n.6, p.1547-1552. 2011. https://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000600036

ECDC/EMEA **- European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency. Technical report. The bacterial challenge: time to react.** 2009. Disponível em: <ecdc.europa.eu/en/publications/publications/0909_ter_the_bacterial_challenge_time_to_react.pdf>. Acesso em: abril de 2015.

EL FEGHALY R.E.E; STAMM J.E; FRITZ S.A.; BURNHAM B.D. Presence of the *bla*Z beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.74, n.4, p.388 – 393. 2012.

EMBRAPA. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/sistemaproducao/book/export/html/276 > acesso em março de 2017

ENRIGHT, M. D; DAVIES C.n.; PEACOCK, S.; SPRAT, B. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus***. Journal of Clinical Microbiology**. *ed. 38, p. 1008*-1015, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86325/>. Acesso em: março de 2015.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H.; Brian, G. S. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA**). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 11, p. 7687–92. 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124322/>. Acesso em: junho de 2015.

ÉVA JUHÁSZ-KASZANYITZKY, SZILÁRD JÁNOSI, PÁL SOMOGYI, ÁDÁM DÁN, LINDA VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, ENGELINE VAN DUIJKEREN e JAAP A. WAGENAAR. MRSA Transmission between Cows and Humans. Emerging Infectious Diseases. In: www.cdc.gov/eid,v. 13, n. 4, Abril 2007.

FARIA, N.A., CONCEIÇÃO, T., MIRAGAIA, M., BARTELS, M.D., DE LENCASTRE, H. & WESTH, H. Nasal carriage of Methicillin Resistant Staphylococci. **Microbial Drug Resistance**. v. 20, n.2, p.1-10. 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000300021>. Acesso em: maio de 2015.

FARIA, O. A. C.; ELÍDIO, J. C. A.; LAZZARI, A. M. Etiologia da mastite bovina e suscetibilidade dos agentes isolados no Distrito Federal (DF) e entorno, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p. 71-72, dec. 2016. ISSN 2179-6645. Disponível em: <http://189.126.110.61/recmvz/article/view/34836>. Acesso em: 25 apr. 2017.

FEBLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRICHT, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n.4, p. 619-625, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164198>. Acesso em: fevereiro e 2015.

FERREIRA A.M.; MARTINS K.B.; SILVA V.R.; MONDELLI A.L.; CUNHA M.L.R.S. Correlation of phenotypic tests with the presence of the *bla*Z gene for detection of beta-lactamase**. Brazilian Journal Microbiology**. v.48, n. 1, p.159-166. 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822017000100159&lng=en. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.011.

FERREIRA, A. M.; MARTINS, K. B.; SILVA, V. R. DA; MONDELLI, A. L.; & CUNHA, M. DE L. R. DE S. . Correlation of phenotypic tests with the presence of the *bla*Z gene for detection of beta-lactamase. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.48, n.1, p.159–166. 2017. http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.011

FIDLER, D. P. **Legal Issues Associated with Antimicrobial Drug Resistance.** Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 169 - 177, 1998.

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The Multifaceted Resources and Microevolution of the Successful Human and Animal Pathogen Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus.* **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. V.109, n.3, p. 265–278. 2014. Disponível Em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4131778/. acesso em maio de 2015.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, p.175 , 2001.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Journal of Veterinary Dermatology,** v. 20, n.5-6 p. 456-470, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20178484>. Acesso em: junho de 2015.

FUSCO, V.; QUERO, G. M.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. Rapid and reliable identification of Staphylococcus aureus harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiol,** v. 144, n. 3, p. 528-537, 2011.

GALIANA, V. A. **Infecciones por *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad**. Archivos de Pediatria del Uruguay; v.74, p.26-9, 2003.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; MATTHEW, T.G.H.; HEATHER, L.; CERIAN, R.W.; DEREK, B.F.J.; MARTIN D. C.; ENID, W.; KAREN, B.; DEREK, J. P.; CHRISTOPHER, T.; JULIAN, P.; STEPHEN, D.B.; GILES, F.E.; KIRSTY, G.; ANGELA, M. K.; DE BRUNO, P.; ROBERT, L.R.C.; ANDERS, L.R.; ROBERT L.S.; SHARON J.P.; DUNCAN, M.; MARK, A.H.; Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel *mec*A homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases.** v.11, n.8 p. 595– 603, 2008. Disponível em: <http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(11)70126-8/fulltext>. Acesso em: junho de 2015.

GHARIB, Ahlam A., ATTIA, Adel M.A.; BENDARY, M.M. Detection of the Coa Gene in Staphylococcus aureus from Different Sources by Polymerase Chain Reaction. International **Journal of Microbiological Research**. v.4, n.1, p.37-42, 2013. Disponível em: https://www.idosi.org/ijmr/ijmr4(1)13/7.pdf

GOH, S. H., BYRNE, S. K., ZHANG, J. L., & CHOW, A. W. Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology,** v.30, *n.*7, p.1642–1645.1992. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265357/

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

GUERREIRO P.K.; MACHADO M.R.F.; BRAGA G.C.; GASPARINO E.; MARTINEZ FRANZENER A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. ***Ciência e Agrotecnologia.*** v.29, n.1, p. 216-222. 2005. https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000100027

GUINANE C.M.; STURDEVANT D.E.; HERRON-OLSON L; OTTO M.; SMYTH D.S.; VILLARUZ A.E.; KAPUR V.; HARTIGAN P.J; SMYTH C.J; FITZGERALD J.R. Pathogenomic Analysis Of The Common Bovine Staphylococcus Aureus Clone (Et3): Emergence Of A Virulent Subtype With Potential Risk To Public Health. **Journal Infectios Diseases**. v.197, n.2, p.205-13. 2008. DOI: 10.1086/524689

HAENNI, M. SARAS, E. CHÂTRE, P. MÉDAILLE, C. BES, M. MADEC, J.Y. LAURENT, F. A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains infecting cats and dogs in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. *67,* p. 326-329, 2012. Disponível em: <http://jac.oxfordjournals.org/content/67/2/326.long>. Acesso em: janeiro de 2015.

HALASA, T.; HUIJPS K.; ØSTERÅS O.; HOGEVEEN H. Economic effects of bovine mastitis management: a review. **Veterinary Quarterly**, v.29, p.18-31, 2007. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.2007.9695224. doi: 10.1080/01652176.2007.9695224.

HAVERI M., SUOMINEN S., RANTALA L., HONKANEN-BUZALSKI T. E PYÖRÄLÄ S. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**,v.106, p.97–102, 2005.

HAVERI M.; HOVINEN M.; ROSLOF A. E PYORALA S. Molecular tyes and genetic profiles of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. Jornal Clinic Microbiology. V. 46, 2008.

HIRAMATSU, KEIICHI. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, n.3, p.147 – 155. 2001.

HIROSE M.; KOBAYASHI N.; GHOSH S.; PAUL S.K.; SHEN T.; Urushibara N.; Kawaguchiya M.; Shinagawa M.; Watanabe N. Identification of staphylocoagulase genotypes I-X and discrimination of type IV and V subtypes by multiplex PCR assay for clinical isolates of Staphylococcus aureus. **JApAn Journal Infectic Disease.** V.63, n.4, p.257-63. 2010. Disponível em: http://www0.nih.go.jp/JJID/63/257.pdf

HUYGENS F.; INMAN-BAMBER J.; NIMMO G.R; MUNCKHOF W.; SCHOONEVELDT J.; HARRISON4 B.; MCMAHON J.A.; GIFFARD P.M. Staphylococcus Aureus *Genotyping Using Novel Real-Time Pcr Formats.* **Journal Clinic Microbiology.** *v.*44 , n.10, p.3712-3719. 2006. DOI: 10.1128/JCM.00843-06

HWANG, S. Y.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; PARK, Y. H. *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, p. 125-131, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873812/>. Acesso em: abril de 2015.

IKONOMIDIS, A., MICHAIL, G., VASDEKI, A., LABROU, M., KARAVASILIS, V., STATHOPOULOS, C., … POURNARAS, S. In: Vitro and In Vivo Evaluations of Oxacillin Efficiency against *mecA*-Positive Oxacillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.52, n.11, p.3905–3908. 2008. http://doi.org/10.1128/AAC.00653-08

IWG-SCC - International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements. Disponível em: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_aboutIWG-SCCEN.html. Acesso em: julho de 2016.

JOBIM, M. B. et al. Patógenos associados à mastite bovina em rebanhos leiteiros na Região Sul do Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v. 67, n. 2, p. 175–181, 2010. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/bia/article/view/7649>

KADLEC K.; EHRICHT R.; MONECKE S.; STEINACKER U.; KASPAR H.; MANKERTZ J.; SCHWARZ S. Diversity Of Antimicrobial Resistance Pheno- And Genotypes Of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus St398 From Diseased Swine. **Journal Antimicrobial Chemotherpy**. V.64, N.6, P.1156-64. Doi: 10.1093/Jac/Dkp350. Disponível Em:Https://Academic.Oup.Com/Jac/Article-Lookup/Doi/10.1093/Jac/Dkp350

KALMUS P., VILTROP A., AASMÃE B. & KASK K. Occurrence of clinical mastitis in primiparous Estonian dairy cows in different housing conditions. **Acta Vet. Scand**. V.48, p.21. 2006.

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

KATAYAMA, Y., ITO, T., & HIRAMATSU, K. Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS*431*-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin- Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v.*45, n.*7, p.1955–1963. http://doi.org/10.1128/AAC.45.7.1955-1963.2001.

KÉROUANTON A.; HENNEKINNE J.A.; LETERTRE C.; PETIT L.; CHESNEAU O.; BRISABOIS A.; DE BUYSER M.L. Characterization Of Staphylococcus Aureus Strains Associated With Food Poisoning Outbreaks In France. **International Journal Food Microbiology**. V.115, N.3, P.369-75. 2007.

KONEMAN, E.; JUNIOR W.W.; ALLEN S.; JANDA W.; PROCOP G.; SCHRECKANBERGER P.; WOODS G. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.

KRAKER. M.E.A; DAVEYP.G.; GRUNDMANN H. E BURDEN STUDY GROUP. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. Outubro, 2011. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001104

KRZIWANEK, K.; METZ-GERCEK, S.; & MITTERMAYER, H. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ST398 from Human Patients, Upper Austria. **Emerging Infectious Diseases,** v.15, n.5, p.766–769. 2009. DOI: http://doi.org/10.3201/eid1505.080326

LENCASTRE, H., OLIVEIRA, D., & TOMASZ, A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.5, p.428–435. 2007. http://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.003

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.9, p.1265–1273. 2003. http://doi.org/10.1172/JCI200318535

MA, X. X.; GALIANA, A.; PEDREIRA, W.; MOWSZOWICZ, M.; CHRISTOPHERSEN, I.; MACHIAVELLO, S.; HIRAMATSU, K. Community-acquired Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.6, p.973–976. 2005. http://doi.org/10.3201/eid1106.041059

MARQUES V. F.; MOTTA C. C.; SOARES B.S.; MELO D. A.; COELHO S. M.O.L; COELHO I. S.; BARBOSA H. S.; SOUZA M. M. S. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.*48, n.*1, p.118-124. 2017. https://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.001

MCMILLAN K.; MOORE S.C.; MCAULEY C.M.; FEGAN N.; AND FOX E.M. Characterization of Staphylococcus aureus isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. **BMC Microbiology**. v.16, n.1, p.1. 2016. Published online 2016 Jul 29. Doi: 10.1186/s12866-016-0789-1

MISTRY H.; SHARMA P, MAHATO S, SARAVANAN R, KUMAR PA, BHANDARI V. Prevalence and Characterization of Oxacillin Susceptible *mecA*-Positive Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis in India. **PLoS ONE.** v.11, n.9. 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162256

MONDAY S.R., BOHACH G.A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. Journal Clinic Microbiologic, v. 37, p.3411–3414, 1999.

MURCHAN, S.; KAUFMANN, M. E.; DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M.; ZINN, C. E.; COOKSON, B. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spread of Related Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.*41, n.*4, p.1574–1585. 2003. http://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1574-1585.2003.

NADER FILHO, L.M.; FERREIRA, L.A.; DO AMARAL, O.D.; ROSSI J.R.P.O. Sensibilidade Antimicrobiana Dos Staphylococcus Aureus Isolados No Leite De Vacas Com Mastite. **Arquivo do Instituto Biologia**, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4. 2007. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_1/nader.pdf

NEWELL, D.G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFALL, J., SCHEUTZ, F., VAN DER GIESSEN, J., KRUSE, H. Food-borne diseases — the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **Inational Journal Food Microbiology**. v.139, n1, p.S3–S15. 2010.

OLSEN, J. E. et al. Diversity and Evolution of *blaZ* from Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450-460, 2006. Disponível em:< http://jac.oxfordjournals.org/content/57/3/450.long>. Acesso em: 2017. doi: 10.1093/jac/dki492.

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

PATERSON, G. K., HARRISON, E. M., & HOLMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Trends in Microbiology**, v.22, n.1, p.42–47. 2014. DOI: http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003

PASTEL J.B.; COCKERILL F.R.; ELIOPOULOS G.M.; JENKINS S.G.; LEWIS J.S.; LIMBAGO B.; NICOLAU D.P.; PATEL R.; POWELL M.; RICHTER S.S.; SWENSON J.M.; TRACZEWSKI M.M; TUNIDGE J.D.; WEINSTEINS M.P. E ZIMMER B.L. **Clinical and Laboratory Standards Institute***.* Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 25st Informational Supplement (M100-S25)*.* Wayne, PA: CLSI; 2015. Disponível em: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf

PEACOCK SJ, PATERSON GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus. **Annual Reviews Biochemistry.** n.84, p.577-601. Junho de 2015. Doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034516.

PETERSEN, A., STEGGER, M., HELTBERG, O., CHRISTENSEN, J., ZEUTHEN, A., KNUDSEN, L. K., URTH, T., SORUM, M., SCHOULS, L. E OTHER AUTHORS. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. **Clinical Microbiology Infections** v.19, n.1, p16– 22. 2013.

PICÃO, R.; SADER, H.; JONES, R. et al. Analysis of resistance and vancomycin “reverse creep” in Latin American *Staphylococcus aureus*: ten-year report of the Sentry Antimicrobial Surveillance Program (1997-2006). **Clinical Microbiology Infection.** v.14, n. 1; p. 173, 2008.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**. v.*2, n.*8, p.2177–2197. 2010. http://doi.org/10.3390/toxins2082177.

PU, W., SU, Y., LI, J., LI, C., YANG, Z., DENG, H., & NI, C. High Incidence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. ***PLoS ONE***. v.*9, n.*2. 2014. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0088134

PYÖRÄLÄ S. TREATMENT OF MASTITIS DURING LACTATION. IRISH VETERINARY JOURNAL. V62 SUPPLEMENT 4. 2009. DOI: 10.1186/2046-0481-62-S4-S40 DISPONÍVEL EM: HTTPS://IRISHVETJOURNAL.BIOMEDCENTRAL.COM/ARTICLES/10.1186/2046-0481-62-S4-S40

QUITOCO, I. M. Z., RAMUNDO, M. S., SILVA-CARVALHO, M. C., SOUZA, R. R., BELTRAME, C. O., DE OLIVEIRA, T. F., FIGUEIREDO, A. M. S. First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). **BMC Research Notes**, v.6, p.336. 2013.. http://doi.org/10.1186/1756-0500-6-336

RALLAPALLI S, VERGHESE S, VERMA R S. Validation of multiplex PCR strategy for simultaneous detection and identification of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Indian Journal Medicin Microbiology. n.26, p.361-4. 2008. Available from: http://www.ijmm.org/text.asp?2008/26/4/361/43580

RANGEL, P. N.; ZUCCHI, M. I.; FERREIRA, M. E. Similaridade genética entre raças bovinas brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.97-100, 2004.

RIBEIRO M.G.; GERALDO J.S.; LANGONI H.; LARA G.H.B.; SIQUEIRA A.K.; SALERNO T. e FERNANDES M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v,29, n.1, p.52-58, janeiro 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n1/a08v29n1

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M. C. *et al*. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal Clinical Microbiology**; v.43; n.4, p.1985-1988, 2005.

ROSATO, A. E.; KREISWIRTH, B. N.; CRAIG, W. A.; EISNER, W.; CLIMO, M. W. e ARCHER, G. L. *MecA-blaZ* Corepressors in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.4, p.1460–1463. 2003. http://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1460-1463.2003.

ROSSI F.; GARCÍA P.; RONZON B.; CURCIO D.; DOWZICKY M.J. Rates of antimicrobial resistance in latin america (2004-2007) and in vitro activity of the glycylcycline tigecycline and of other antibiotics. **Brazilian Journal Infections Diseases**. V.12, n.5, p.405-415. Disponivel em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702008000500012&lng=en. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702008000500012.

SAEED, K.; AHMAD, N.; DRYDEN, M.; CORTES N.; MARSH P.; SITJAR A.; WYLLIE S.; BOURNE, S.; HEMMING J.; JEPPESEN C.; GREEN S. Oxacillin-susceptible methicillin-resistant Staphylococcusaureus (OS-MRSA), a hidden resistant mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/UK**.** **Infection**. V.42, P. 843. 2014. doi:10.1007/s15010-014-0641-1

SAKOULAS G.; HOWARD S.; GOLD H.; VENKATARAMAN L.; PAOLA C.; DEGIROLAMI P.; GEORGE M.; ELIOPOULOS G.M.; QIAN Q. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Comparison Of Susceptibility Testing Methods And Analysis Of *Mec*A-Positive Susceptible Strains. **Journal Clininic Microbiology**. N.39, N.11, P. 3946-3951. 2001. Doi: 10.1128 / Jcm.39.11.3946-3951.2001

SAKWINSKA, O.; KUHN, G.; BALMELLI, C.: et al. Genetic diversity and ecological success of Staphylococcus aureus strains colonizing humans. **Appl Environ Microbiology**. v. 75, p. 175-183; 2009.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO L.C.; MENDONÇA M.B.O.C. Estafilococos Em Alimentos. **Arquivo Instituto Biologia**. São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, jul./set., 2010. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/santana.pdf.

SANTOS, N. Q.; **O Uso Indiscriminado De Antibióticos E A Ecologia Das Bactérias - Antibiótico - Resistentes Associadas À Problemática Da Infecção Hospitalar: A Luz Da Ética Da Responsabilidade De Hans Jonas;** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do titulo de Doutor em Enfermagem, área de concentração Filosofia, Saúde e Sociedade; 8 de julho de 2002. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/83700/187304.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acessado em: 20 de dezembro de 2015.

SANTOS, O.C.S.; E.M. BARROS, M.A.V.P. BRITO, M.C.F. BASTOS, K.R.N. SANTOS, M.G. Marval. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. **Veterinary Microbiology**. V.130, p.134–140. 2008.

SANTOS, O.C.S.; E.M. BARROS, M.A.V.P. BRITO, M.C.F. BASTOS, K.R.N. SANTOS, M.G. Marval. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. **Veterinary Microbiology.** 130:134–140, 2007.

SCHULZ, J., FRIESE, A., KLEES, S., TENHAGEN, B. A., FETSCH, A., RÖSLER, U., & HARTUNG, J. (2012). Longitudinal Study of the Contamination of Air and of Soil Surfaces in the Vicinity of Pig Barns by Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology,** v.78, n.16, p.5666–5671. 2012. http://doi.org/10.1128/AEM.00550-12

SCHWARZ S.; KADLEC K.; STROMMENGER B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004–2006 in Germany. **Journal Antimicrob Chemother**; n. 61; p.282–285, 2008.

SFACIOTTE R.A.P.; BORDIN J.T.; VIGNOTO V.K.C; MUNHOZ P.M.; PINTO A.A.; BARBOSA M.J.B.; CARDOZO R.M.; OSAKI S.C. E WOSIACKI S.R.; Antimicrobial resistence in bacterial pathogens of canine otitis. American Journal of Animal and Veterinary Sciences. v. 10, n. 3, p. 162-169, 2015.

SILVA L.H.C.; MONTEIRO A.A.; BELOTI V.; BARROS M.A.F.; NERO L.A.; SANTANA E.H.W.; MORAES L.B. Utilization of horse plasma in coagulase test for Staphylococci isolated from raw milk. ***Semina***. v.26, n.3.2005.

SILVA N.C.C.; GUIMARÃES F.F.; MANZI M.P.; FERNANDES A.; JR, GÓMEZ-SANZ E.; GÓMEZ P.; Methicillin-resistant Staphylococcus aureus of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Let Applied Microbiol**. v59, N.6, P.665–669. 2014

SILVA, E. R., & DA SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research,** v.69, n.4, p.260–264. 2005. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1250237/

SILVA, L.C.C; BELOTI V.; TAMANINI R.; D'OVIDIO L.; MATTOS, M.R.; ARRUDA, A.M.C.T.; PIRES, M.F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276, jan./mar. 2011.

SILVA, MÔNICA PACHECO DA. Identificação e caracterização de estirpes de Staphylococcus aureus e Streptococcus agalactiae associadas às mastites bovinas persistente e não persistente. Tese apresentada para obtenção do título de Doutorado. VIÇOSA, MG, 2015.

SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. Staphylococcus aureus host cell invasion and post-invasion events. International Journal of Medical Microbiology, v. 300, n. 2-3,p. 170-175, 2010.

SIT P.S; JU TEH C.S.; IDRIS N.; I-CHING SAM; OMAR S.F.S; SULAIMAN H.; THONG K.L.; KAMARULZAMAN A. E PONNAMPALAVANAR S. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. **BMC Infectious DiseasesBMC series – opEN.** v.**17**, p.274**.** 2017. **DOI:** 10.1186/s12879-017-2384-y

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. **Journal of Clinical Microbiology.** v.43, n.9, p.4731–4736.2005. http://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4731-4736.2005.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P., & SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.*61, n.*5, p.1015-1020. 2009. https://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000500001

SUNG, J. M.; LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* strains that are hypersusceptible to resistance gene transfer from enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2189–2191, 2007.

SUNG, J. M.; LLOYD, D. H.; LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Journal of Microbiology**, v. 154, n.7, p. 1949-1959, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599823>. Acesso em: maio de 2015

SZABÓ J. Molecular Methods in Epidemiology of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Advantages, Disadvantages of Different Techniques. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis.** v.3, n.147.2014. Doi:10.4172/2161-0703.1000147

TAVARES W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos *Anti-infecciosos***. 31ªed. São Paulo: Atheneu; 2001.

TEIXEIRA, J. P.; SILVA *N.;* FONSECA L.M*.;* COSTA G.M. Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *fem*A e *mec*A e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em Staphylococcus aureus isolados de leite cru. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 272-279, 2014.

TURLEJ A.; HRYNIEWICZ W.; EMPEL J. Staphylococcal Cassette Chromosome Mec (Sccmec) Classification And Typing Methods: An Overview. **Jornal Polaco De Microbiologia**. V. 60, N 2, P. 95-103. 2011. Disponível Em: Https://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/21905625

UDO E.E; AL-SWEIH N.; MOHANAKRISHNAN S.; WEST P.W.J. Antibacterial Resistance and Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Kuwaiti General Hospital**. Medical Principle and Practice.** V.15, p.39-45. 2006.

ÜNAL, N.; ASKAR, Ş.; MACUN, H.C.; SAKARYA, F.; ALTUN, B.; YILDIRIM, M. Panton–Valentine leukocidin and some exotoxins of Staphylococcus aureus and antimicrobial susceptibility profiles of staphylococci isolated from milks of small ruminants. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 3, p. 573-9, 2012. Disponível em : http://www.academia.edu/2635056/Panton_Valentine_leukocidin_and_some_exotoxins_of_Staphylococcus_aureus_and_antimicrobial_susceptibility_profiles_of_staphylococci_isolated_from_milks_of_small_ruminants.

VAN DUIJKEREN E.; JANSEN M. D.; FLEMMING S. C. et al**.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. **Emerging Infectious Diseases**; n.13, p. 1408–1410, 2007.

VAN HOEK, A. H. A. M., MEVIUS, D., GUERRA, B., MULLANY, P., ROBERTS, A. P., & AARTS, H. J. M. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. **Frontiers in Microbiology,** v.*2*, p.203. 2011. Doi: http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203

VANNUFFEL, P., GIGI, J., EZZEDINE, H., VANDERCAM, B., DELMEE, M., WAUTERS, G., & GALA, J. L. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR**. Journal of Clinical Microbiology,** v.33, *n.*11, p.2864–2867. 1995. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228596/

VASCONCELOS, V.C; PEREIRA, J.P.; ARAU´ JO JU´ NIOR E M. DE L.R.S. DA CUNHA.Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil N.G. **Journal of Applied Microbiology** v.111, p.749–76. 2011. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2011.05076.x/pdf.

VESTERHOLM-NIELSEN, M.; LARSEN, M. O.; OLSEN, J. E.; AARESTRUP, FRANK MOLLER. **Occurrence of the blaZ gene in penicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Denmark.** /. In: Acta Veterinaria Scandinavica, Vol. 40, No. 3, 1999, p. 279-286.

VOSS, A., LOEFFEN, F., BAKKER, J., KLAASSEN, C., & WULF, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, p.1965–1966. 2005. http://doi.org/10.3201/eid1112.050428

WILLIAMSON, D. A.; ROBERTS, S. A.; RITCHIE, S. R.; COOMBS, G. W.; FRASER, J. D. E HEFFERNAN, H. Clinical and Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in New Zealand: Rapid Emergence of Sequence Type 5 (ST5) -SCC*mec*-IV as the Dominant Community-Associated MRSA Clone. **PLoS ONE**, v.8, n.4, p.62020. 2013. DOI: http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062020.

WITTE W.; STROMMENGER B.; STANEK C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. **Emerging Infectious Diseases**; n.13, p. 255–258, 2007.

WULF, M.; VOSS, A. Mrsa In Livestock Animals – An Epidemic Waiting To Happen? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 519–521, 2008.

YANG Y.; XU-DONG SU.; YUAN Y.; KANG C.; LI Y.;. ZHANG W.; ZHONG X. Detection Of *Staphylococcus Aureus* In Dairy Products By Polymerase Chain Reaction Assay. **Agricultural Sciences In China**. V. 6, N. 7, P. 857-862. 2007.

ZAFALON, L. F.; LONGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por Staphylococcus aureus. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 56-65, 2008. Disponível em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48414/1/PROCILFZ2008.00008.pdf

ANEXO 1

RESULTADOS OBTIDOS DA TRIAGEM A PARTIR DO PCR PARA OS GENES *mec*A, *bla*Z E *fem*A, DAS AMOSTRAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ. P= AMOSTRAS POSITIVAS E N= AMOSTRAS NEGATIVAS.

PROPRIEDADE	*mec*A	*bla*Z	*fem*A	PROPRIEDADES	*mec*A	*bla*Z	*fem*A	PROPRIEDADES	*mec*A	*bla*Z	*fem*A	PROPRIEDADES	*mec*A	*bla*Z	*fem*A
1	N	P	P	20	P	P	P	38	N	P	P	56	P	P	N
2	N	N	N	21	N	P	P	39	N	P	P	57	N	P	P
3	N	P	P	22	N	P	N	40	N	P	N	58	N	P	P
4	N	P	P	23	P	P	P	41	N	P	P	59	N	P	P
5	N	P	P	24	P	P	P	42	P	P	P	60	N	P	P
6	P	P	P	25	N	P	P	43	N	P	P	61	P	P	P
7	P	P	P	26	N	P	P	44	P	P	P	62	N	P	P
8	N	P	P	27	P	P	P	45	P	P	N	63	N	P	P
9	N	P	P	28	N	P	P	46	N	P	P	64	N	P	P
10	N	P	P	29	P	P	P	47	P	P	P	65	P	P	P
11	N	P	P	30	N	P	P	48	P	P	N	66	P	P	P
12	P	P	P	31	N	P	P	49	N	P	N	67	N	P	P
13	P	P	P	32	N	P	P	50	N	P	P	68	N	P	P
14	N	P	P	33	P	P	P	51	P	P	P	69	P	P	P
16	N	P	P	34	N	P	P	52	N	P	P	70	P	P	P
17	N	P	P	35	N	P	P	53	N	P	N				
18	P	P	P	36	N	P	P	54	N	P	N				
19	N	P	P	37	P	P	P	55	P	P	N				

ANEXO 2

RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO PCR PARA OS GENES *mec*A, *bla*Z E *fem*A, DAS AMOSTRAS DE SUABE NASAL, MÃO E TETEIRAS, E ALÍQUOTAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO E DE VACAS COM CMT POSITIVAS, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ NA SEGUNDA COLHEITA. P1 E P2= *mec*A; P= POSITIVO E N= NEGATIVO; S= SENSÍVEL E R= RESISTENTE.

Propriedade	Lugar	Amp	Cefto	Tetra	Linco	Tilo	Vanco	Cipro	Erit	Gent	*femA*	*coagA*	*P1*	*P2*	*blaZ*
27	Animal	S	R	S	R	R	R	S	R	S	P	P	N	P	P
27	Animal	S	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
27	Teteira	S	R	R	S	R	S	R	S	S	P	P	N	N	N
27	Tanque	S	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
27	Animal	R	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
27	Animal	R	R	S	R	S	R	R	S	S	P	P	N	N	P
27	Animal	R	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
27	Animal	R	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
27	Animal	R	R	S	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
27	Teteira	S	R	S	R	R	R	R	S	S	P	P	N	N	P
27	Animal	S	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
27	Animal	R	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
27	Animal	S	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
7	Animal	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P	P	N	N	P
7	Teteira	R	R	S	R	R	R	R	R	S	N	N	N	N	N
7	Nasal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
7	Teteira	S	R	S	S	S	S	S	S	S	N	P	N	N	N
7	Animal	R	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	P	N	P
7	Teteira	R	R	S	S	S	S	R	S	S	N	P	N	N	N
7	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	N	N	N	N	P
7	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	N	P	N	N	N
7	Teteira	S	R	S	S	S	S	R	S	S	N	P	N	N	N
7	Teteira	S	R	R	S	S	S	R	S	S	N	N	N	N	P
7	Teteira	S	R	R	S	S	S	R	S	S	N	P	N	N	P

ANEXO 2 (CONTINUAÇÃO)

RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO PCR PARA OS GENES *mec*A, *bla*Z E *fem*A, DAS AMOSTRAS DE SUABE NASAL, MÃO E TETEIRAS, E ALÍQUOTAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO E DE VACAS COM CMT POSITIVAS, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ NA SEGUNDA COLHEITA. P1 E P2= *mec*A; P= POSITIVO E N= NEGATIVO; S= SENSÍVEL E R= RESISTENTE.

Propriedade	Lugar	Amp	Cefto	Tetra	Linco	Tilo	Vanco	Cipro	Erit	Gent	femA	coagA	P1	P2	blaZ
7	Animal	S	R	S	R	S	S	R	S	S	N	P	N	N	P
7	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
7	Teteira	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
7	Teteira	R	R	S	R	R	R	R	R	S	N	P	N	N	P
7	Animal	S	R	S	R	R	R	R	R	S	N	P	N	N	P
7	Teteira	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
7	Nasal	R	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	N
7	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	N	P	N	N	N
69	Tanque	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	N
69	Animal	S	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	N
69	Animal	S	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	P	N	P
69	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Animal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	P	N
69	Animal	S	R	R	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Nasal	S	R	S	S	S	S	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Nasal	R	R	S	R	R	R	R	S	S	P	P	N	N	P
69	Mão	R	R	S	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
69	Mão	R	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	N
69	Teteira	R	R	S	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
69	Teteira	R	R	S	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
69	Teteira	R	R	S	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	N
23	Teteira	R	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	N

ANEXO 2 (CONTINUAÇÃO)

RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO PCR PARA OS GENES *mec*A, *bla*Z E *fem*A, DAS AMOSTRAS DE SUABE NASAL, MÃO E TETEIRAS, E ALÍQUOTAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO E DE VACAS COM CMT POSITIVAS, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ NA SEGUNDA COLHEITA. P1 E P2= *mec*A; P= POSITIVO E N= NEGATIVO; S= SENSÍVEL E R= RESISTENTE.

23	Teteira	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P	P	N	P	N
23	Teteira	R	R	R	R	R	R	R	R	S	N	P	N	P	N
23	Teteira	R	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	P	N
23	Teteira	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	P	N	N	N
23	Animal	S	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	N	P
23	Animal	S	R	S	S	S	R	S	S	S	P	P	P	P	P
23	Animal	S	R	R	S	S	S	R	S	S	N	P	N	N	P
23	Animal	S	R	R	S	S	S	R	R	S	N	N	N	N	P
23	Teteira	R	R	R	R	R	R	R	R	S	P	P	N	P	N

ANEXO 3

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. Identificação

Entrevista feita em: / /. Realizada por: _____

Identificação do rebanho: _____

Propriedade e Proprietário:_____

Tel: _____

Endereço, Cidade: _____

2. Características Gerais do Rebanho

2.1 Número de vacas em lactação:

1. Até 5 ( )
2. 5 -I 10 ( )
3. 10 –I 20 ( )
4. + 20 ( )_____

2.2 Produção total de Leite por dia:

1. Até 100 L ( )
2. 100L-I 200 L ( )
3. 200L –I 400L ( )
4. + 400L ( ) _____

2.3 Sistema de produção: 1.( ) Semiestabulado 2.( ) Intensivo 3.( ) Pasto

2.4 Raça predominante no rebanho:

1. Girolanda ( )
2. Holandês ( )
3. Gir ( )
4. Jersey ( )
5. Sem raça ( )
6. Outros ( )

2.5 Tipo de ordenha: 1.( ) Mecânica 2.( ) Manual

2.6 Presença do bezerro na hora da ordenha: 1. Sim ( ) 2. Não ( )_____

3. Estrutura da Propriedade

3.1 Local da ordenha: 1. ( ) Curral 2. ( ) Sala de ordenha 3. ( ) Outros

3.2 Quando mecânica: 1. ( ) Balde ao pé 2. ( ) Sistema canalizado

3.3 Quantas ordenhas por dia: 1.( ) uma 2. ( ) duas 3. ( ) três

3.4 Armazenamento do leite:
1. ( ) Tanque de expansão 2. ( ) Baldes 3. ( ) Tanque comunitários

4. Controle de Prevenção de mastite

4.1 Há acompanhamento do rebanho por um técnico?
1. ( ) Veterinário 2. ( ) Agrônomo 3. ( ) Técnico agrícola 4. ( ) Zootecnista 5. ( ) Não há

4.2 Faz teste de CMT ou Fundo de caneco escuro ? 1. ( ) CMT 2. ( ) Caneco 3. ( ) Não faz

4.3 Lava/desinfeta os tetos antes da ordenha?
1. ( ) Sim 2. ( ) Não 3. ( ) Quando precisa

4.4 O que usa para secar os tetos?
1. ( ) Pano 2. ( ) Papel toalha 3. ( ) Não seca

4.5 Depois da ordenha, desinfeta os tetos ?
1. ( ) sim 2. ( ) não

4.6 As vacas são alimentas logo após a ordenha ? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não

4.7 Realiza o tratamento imediato de todos os casos clínicos de mastite?
1. ( ) Sim 2. ( ) Não

4.8 Existe descarte das vacas?
1. ( ) Sim 2. ( ) Não

4.9 Qual o critério(quando ocorre)?
1. ( ) animal doente 2. ( ) animal velho 3. ( ) baixa produção

4.10 Existem animais com infecções persistentes ?
1. ( ) sim 2. ( ) não

4.11 Qual tratamento utilizado e dose?
_____

4.12 Faz exames microbiológicos? 1. ( ) Sim 2.( ) Não

4.13 Qual a finalidade destes exames?
1. ( ) Patógeno 2. ( ) Resistência 3. ( ) ambos

5. Aplicação de antibióticos

5.1 Quais são os casos que utilizam antibióticos?
1.( ) Diarreia 2.( ) Metrite 3. ( ) Pneumonia 4. ( ) Doença do casco 5.()outros

5.2 Usa protocolos de tratamento para mastite? Qual ?
5.3 Quem recomenda os antimicrobianos ? _____

5.4 Faz controle (registra/anota) os tratamentos já realizados?
1. ( ) sim 2. ( ) não

5.5 Usa algum antimicrobiano que não seja veterinário?
1. ( ) sim 2. ( ) não

5.6 Qual é a quantidade de tratamentos feito por mês para mastite?
_____

5.7 Varia sempre os antibióticos(nome/ princípio ativo)? Quais utiliza?
_____

5.8 Produção orgânica ? anotar os compostos usados
_____

6. Verificação da disseminação de bactérias
6.1 Consumo de leite cru ? 1.( ) Sim 2. ( ) Não

6.2 O leite é usado para produçao de derivados na propriedade ?
1. ( ) Sim 2. ( ) Não

6.3 Vende animais frequentemente ? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não

6.4 Lava-se a mão para manipulação dos animais ? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não

6.5 Qual a frequência durante a ordenha? _____

6.6 O que usa para lavar as mãos? 1.( ) Sabão 2. ( ) Somente água 3.( ) Outros

6.7 Alguém já teve alguma doença de difícil tratamento com antibióticos ?

6.8 Houve internamento ou cirurgia no último ano ? 1.( ) Sim 2. ( ) Não

6.9 Se sim para a pergunta anterior, perguntar: houve dificuldades no processo? (tempo de internamento prolongado , complicações, infecções)

6.10 Usa/usou antibióticos nos últimos 6 meses ?
1. ( ) sim 2. ( ) não

6.11 E no último ano? qual ?

.....

Observações do avaliador quanto ao rebanho, manipulação e estado da propriedade:

.....