



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)
EM GRANJAS DE SUÍNOS

SILVANA CRISTINA LIMA DOS SANTOS

AREIA-PB
FEVEREIRO-2015

SILVANA CRISTINA LIMA DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)
EM GRANJAS DE SUINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Prof. Dr. Leonardo Augusto Fonseca Pascoal

Prof. Dr^a. Patrícia Emília Naves Givisiez

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB

S237p Santos, Silvana Cristina Lima dos.

Prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) em granjas de suínos / Silvana Cristina Lima dos Santos. – Areia - PB: CCA/UFPB, 2015.

57 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Celso José Bruno de Oliveira.

1. Suínos – Doenças 2. Suinocultura – *Staphylococcus aureus* 3. Granjas de suínos – Prevalência estafilocócica I. Oliveira, Celso José Bruno de (Orientador) II. Título.

UFPB/BSAR

CDU: 636.4(043.3)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) em granjas de suínos”.

AUTORA: Silvana Cristina Lima dos Santos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

J U L G A M E N T O

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Leonardo Augusto Fonseca Pascoal
Presidente

Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Felício Garino Junior
Examinador

Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Lauro Santos Filho
Examinadora

Universidade Federal da Paraíba

Areia, 25 de fevereiro de 2015

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SILVANA CRISTINA LIMA DOS SANTOS–ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba no ano de 2008, diplomando-se em Março de 2013.

Durante a Graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq de 2011 a 2012 no Setor de Suinocultura. Realizou trabalho de conclusão de curso intitulado: Avaliação nutricional do subproduto do arroz vermelho e da farinha de varredura de mandioca para suínos em terminação, sob a orientação da professora Dr^a Ludmila da Paz Gomes da Silva.

No ano de 2013 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba na área de concentração em Produção animal, tendo como linha de pesquisa Segurança alimentar sob a orientação do professor Dr^o Celso José Bruno de Oliveira.

**À família LAPOA em especial a Drº Denis Spricigo ao
Veterinário Mauro Saraiva e a Zootecnista Candice Maria.
À amizade, ao companheirismo e por não medirem esforços para
auxiliar-me na rotina laboratorial e no conhecimento científico.**

Dedico

O Tempo

A vida é o dever que nós trouxemos para fazer em casa.

Quando se vê, já são seis horas!

Quando se vê, já é sexta-feira!

Quando se vê, já é natal...

Quando se vê, já terminou o ano...

Quando se vê perdemos o amor da nossa vida.

Quando se vê passaram 50 anos!

Agora é tarde demais para ser reprovado...

Se me fosse dado um dia, outra oportunidade, eu nem olhava o relógio.

Seguiria sempre em frente e iria jogando pelo caminho a casca dourada e inútil das horas...

Seguraria o amor que está a minha frente e diria que eu o amo...

E tem mais: não deixe de fazer algo de que gosta devido à falta de tempo.

Não deixe de ter pessoas ao seu lado por puro medo de ser feliz.

A única falta que terá será a desse tempo que, infelizmente, nunca mais voltará.

“Mario Quintana”

AGRADECIMENTOS

Durante a realização de qualquer caminhada sempre contamos com a competência, o carinho, a dedicação e a amizade de inúmeras pessoas. Nesta que agora termina, quero agradecer a todos embora difícil relacionar os nomes. Tentarei:

Inicialmente, agradeço a Deus por permitir a minha existência, ser a fortaleza nas lutas diárias por sustentar e levantar-me diante as quedas da vida.

Aos meus familiares, a base de tudo em minha vida. À minha mãe, mulher corajosa, guerreira e simples. Mãe, seu amor, carinho, dedicação e força, inspiram e me fazem acreditar que mesmo nas duras batalhas da vida, devemos ser de “ferro”; ao meu pai, por todos os ensinamentos; a minhas irmãs, pela preocupação e por entenderem minha ausência; ao meu irmão, meus cunhados e, a minha sobrinha, linda flor que embeleza o meu jardim.

A todos da família LAPOA, os quais nunca mediram esforços para ajudar, compreender e incentivar. Nunca esquecerei o companheirismo, dedicação e conselhos. Vocês tornaram meus dias menos árduos e mais alegres. E, acima de tudo, se tornaram bons amigos, aos quais sempre serei grata: Candice, Mauro, Denis, Alexandre, Leidy, Andreia, Adriano e Fatima.

À minha amiga Elivania Vieira por sua amizade, dedicação e companheirismo ao longo dos anos.

Aos amigos de longa data que deixaram um pouco de si e levaram um pouco de mim: Clariana, Heraldo e Luana Paula.

Ao meu orientador Celso José Bruno de Oliveira pelo incentivo e dedicação.

Ao professor Dr. Leonardo Augusto Fonseca Pascoal, pela disponibilidade e atenção.

À todos os professores do Centro de Ciências Agrárias (CCA) por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia e a CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade Federal da Paraíba, agradeço pela oportunidade e privilégio de estudar nessa instituição.

Sumário

ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE QUADROS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. A suinocultura no Nordeste Brasileiro	16
2.2. <i>Staphylococcus</i> spp.	17
2.2.1. Caracterização do gênero	17
2.2.2. Identificação fenotípica e genotípica.....	18
2.2.3. Resistência aos beta-lactâmicos	18
2.2.4. MRSA em sistemas de produção de suínos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Amostragem e critérios de inclusão	22
3.2. Isolamento microbiológico e identificação	23
3.3.1. Extração de DNA Total bacteriano	24
3.3.2. Detecção dos genes de <i>Staphylococcus aureus</i> e de resistência antimicrobiana por Reação de Polimerase em cadeia multiplex (mPCR)	25
3.4. Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> método de Disco-difusão (Kirby-Bauer)	26
3.6. Genotipificação dos isolados.....	27
3.6.1. Extração por Fenol: clorofórmio: álcool isoamílico.....	27
3.6.2. Método de eletroforese em campo pulsátil (PFGE)	28
3.6.3. Rep-PCR (<i>Repetitive Extragenic Palindromic Sequences</i>).....	30
3.7. Análise dos dados.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
4.2. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.3. Genotipificação de <i>S. aureus</i> por PFGE.....	42
4.4. Genotipificação de <i>S. aureus</i> por Rep-PCR	43
5. CONCLUSÃO	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição do número de amostras colhidas nas Granjas 1 (Areia), 2 (Santa Rita) e 3 (Itapetim), de acordo com as diferentes fases de criação entre as granjas estudadas.....	23
Tabela 2	Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição aos antimicrobianos testados de acordo com o CLSI, (2013).....	27
Tabela 3	Presença de <i>S. aureus</i> entre as diferentes granjas estudadas.....	32
Tabela 4	Identificação de <i>S. aureus</i> entre os setores de produção de suínos avaliados.....	33
Tabela 5	Prevalência de <i>S. aureus</i> entre os setores de produção de suínos nas Granjas 1 (G1) e 3 (G3).....	34
Tabela 6	Perfis de amplificação dos genes <i>coa</i> , <i>nuc</i> e <i>femA</i> para identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos das granjas 1, 2 e 3.....	37
Tabela 7	Perfis de resistência encontrados entre os 22 <i>S. aureus</i>	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma do protocolo de isolamento e identificação (SZABO <i>et al.</i> , 2012).....	24
Figura 2	Esquema para identificação fenogenotípica de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. aureus</i> e <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (MRSA).....	26
Figura 3	Produtos de amplificação dos genes A: 16S rRNA 756 pb (1, 2, 3, 4 e 5: isolados positivos) e dos genes <i>nuc</i> 279 pb (1 e 2 isolados negativos; 3, 4 e 5 isolados positivos), <i>femA</i> 132 pb (1, 2 e 3 isolados negativos; 4 e 5 isolados positivos); M= marcador de 100pb; e B: <i>coa</i> variável 400-1000pb (1 e 7: isolados negativos 2, 3, 4, 5 e 6: isolados positivos) M= marcador de 100pb.....	35
Figura 4	Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos 22 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figura 5	Teste de difusão em disco. A: Isolado de <i>S. aureus</i> resistente à penicilina. B: Isolado de <i>S. aureus</i> resistente a clindamicina e gentamicina. C: Isolado de <i>S. aureus</i> sensível a cefoxitina e oxacilina. D: Isolado de <i>S. aureus</i> resistente a cefoxitina e oxacilina.....	41
Figura 6	Perfis de PFGE utilizando a enzima de restrição <i>smaI</i> . Linha 1 a 6 isolados de <i>S. aureus</i> não tipificados por <i>smaI</i> ; 7 e 8 controle USA 400 e linha 9 marcador <i>Salmonella Braenderup</i> H9812.....	43
Figura 7	Gel de agarose com produtos de Rep-PCR gerados a partir de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de <i>swabs</i> nasais de suínos. (M: marcador molecular; 1 a 24: amostras; 21- amostra de isolado humano).....	43
Figura 8	Dendograma gerado a partir dos dados de tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de suínos. Os números no eixo <i>x</i> indicam a similaridade genética gerada a partir do coeficiente de Dice (2% de tolerância).....	45
Figura 9	Dendograma gerado a partir dos dados de tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a cefoxitina. Os números no eixo <i>x</i> indicam a similaridade genética gerada a partir do coeficiente de Dice (2% de tolerância).....	46

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. <i>Primers</i> e ciclos empregados para identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA).....	25
Quadro 2. Critérios para avaliação dos valores de concordância Kappa de <i>Cohen</i>	31
Quadro 3. Coeficiente Kappa de <i>Cohen</i> para concordância entre os marcadores, coagulase <i>in vitro-nuc</i> , coagulase <i>in vitro-femA</i> , coagulase <i>in vitro-coa</i> , <i>nuc-femA</i> , <i>nuc-coa</i> e <i>femA-coa</i> utilizados para identificação de <i>S. aureus</i>	36

RESUMO

SANTOS, SILVANA CRISTINA LIMA DOS. **Prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em granjas de suínos.** 2015. 57 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2015.

Objetivou-se investigar a prevalência, o perfil de resistência antimicrobiana e a relação genotípica entre *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolados de suínos em diferentes fases de criação. Com base no cálculo do tamanho amostral, foram colhidos *swabs* nasais de 282 animais de três diferentes granjas no Nordeste, localizadas nos municípios de Areia e Santa Rita (Paraíba) e Itapetim (Pernambuco). Considerando a emergente importância em saúde pública dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), foi realizado protocolo paralelo para isolamento desses microrganismos em todas as amostras. Após isolamento microbiológico convencional e realização de testes fenotípicos e genotípicos para identificação do gênero *Staphylococcus*, foi realizada PCR para identificação de marcadores moleculares específicos de *S. aureus*. Dentre as amostras analisadas, 48,9% (138/282) foram positivas para *Staphylococcus* spp., dentre as quais 15,94% (22/138) foram positivas para *Staphylococcus aureus*. A prevalência de *S. aureus* na Granja 1 foi de 2,07% (IC=0,71;5,91) e na Granja 3 de 2,97% (IC=1,91;4,59). Não foi isolado *S. aureus* dos animais da granja 2. Dentre os marcadores para a espécie *S. aureus*, o gene *femA* foi o mais frequentemente encontrado. Resistência a pelo menos um antimicrobiano foi detectada em todos os *S. aureus* investigados, sendo as maiores taxas de resistência observadas para clindamicina (100%), ampicilina (100%) e penicilina (100%), seguidos de clorafenicol (95,45) e azitromicina (90,91%). De todos os *S. aureus*, 63,64% (14/22) apresentaram resistência à cefoxitina, confirmando serem resistentes à meticilina (MRSA). A análise de similaridade genética por Rep-PCR indicou o agrupamento das bactérias em função de sua origem. Além disso, isolados de diferentes setores de produção apresentaram-se indistinguíveis, indicando que cepas de *S. aureus* podem infectar animais em diferentes fases de criação.

Palavras-chave: gene *mecA*, resistência antimicrobiana, segurança alimentar

ABSTRACT

SANTOS, SILVANA CRISTINA LIMA DOS. **Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in pig farms.** 2015. 57 p. Dissertation (Master in animal Science).

Aimed to investigate the prevalence, the pattern of antimicrobial susceptibility and the genotypic ratio of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolated from pigs in different age groups. Based on calculation of sample size, were collected 282 nasal swabs of pigs from three different farms in Northeast, located in the cities of Areia and Santa Rita (Paraíba State) and Itapetim (Pernambuco State). Considering the emerging public health significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), parallel protocol was performed to isolate these microorganism in all samples. After conventional microbiological isolation and conducting tests for phenotypic and genotypic identification of *Staphylococcus* genus, PCR was conducted to identify molecular markers specific of *S. aureus*. Among the samples analyzed, 48.9% (138/282) were positive for *Staphylococcus* spp., among with 15.94% (22/138) were positive for *S. aureus*. The prevalence of *S. aureus* in the Farm 1 was 2.07% (CI = 0.71, 5.91) and Farm 3 was 2.97% (CI = 1.91, 4.59). It was not isolated *S. aureus* from the animals of Farm 2. Among the markers for the *S. aureus* species, *femA* gene was the most frequently found. Resistance to at least one antimicrobial agent was detected in all investigated *S. aureus*, with the highest rates observed to clindamycin (100%), ampicillin (100%) and penicillin (100%), followed by chloramphenicol (95.45%) and azithromycin (90.91). Of all *S. aureus*, 63.64% (14/22) were resistant to ceftiofur, confirming be resistant to methicillin (MRSA). The genetic similarity analysis by Rep-PCR indicated the grouping of bacteria due to its origin. Also, isolates from different sectors of production have become indistinguishable, indicating that *S. aureus* strains can infect pigs at different age groups.

Keywords: antimicrobial resistance, food safety, *mecA* gene

1. INTRODUÇÃO

Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são hospedeiras naturais tanto no homem como em animais. Estes microrganismos colonizam as mucosas e podem causar infecções oportunistas. Dentro deste gênero estão os *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) espécie com maior potencial patogênico por apresentar inúmeros fatores de virulência, principalmente a capacidade de expressar vários genes de resistência a antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (KONEMAM *et al.*, 2010).

Com maior relevância dentro da espécie, destaca-se *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), considerado por muito tempo um patógeno nosocomial, ou seja, encontrado exclusivamente em ambiente hospitalar e responsável por infecções em seres humanos nesse ambiente. Entretanto, a sua presença tem sido relatada em animais de produção (PERSOONS *et al.*, 2009; DUIJKEREN, VAN *et al.*, 2010; AKINEDEN *et al.*, 2011), com o suíno, considerado um reservatório deste patógeno (OPPLIGER *et al.*, 2012).

De acordo com WEESE *et al.*, (2006), as pessoas que estão em contato direto com suínos portadores de MRSA apresentam maior risco de contaminação, ou seja, já há comprovação de que trata-se de um patógeno ocupacional. Apesar do gênero *Staphylococcus* ser reconhecidamente um dos principais causadores de intoxicação alimentar (OLIVINDO *et al.*, 2009), ainda não existe comprovação de que MRSA seja transmitido pelo consumo de alimentos. Contudo, sabe-se que as cepas multirresistentes influenciam negativamente a saúde humana tornando-se necessário o seu monitoramento em sistemas de produção animal. É importante salientar que a emergência de bactérias resistentes a antimicrobianos tem sido associada a crescentes taxas de mortalidade e prejuízos econômicos em decorrência dos elevados custos com saúde (COHN & MIDDLETON, 2010).

O conhecimento da epidemiologia do MRSA em sistemas de produção tem sido obtido principalmente em criações intensivas, altamente tecnificadas e com elevado número de animais, diferentemente dos sistemas de criação na região Nordeste do Brasil. Nesta região, os suínos são criados com baixa tecnificação e, geralmente, coabitam com outras espécies. Neste contexto, salienta-se a ausência de informações sobre o estado sanitário dos rebanhos no Nordeste, pela baixa importância que a suinocultura representa no cenário regional. Por outro lado, a carne suína produzida na região é praticamente destinada ao consumo interno e,

não há trabalhos que estudem a presença de MRSA em granjas de suínos no Nordeste, justificando assim, pesquisas sobre a segurança deste alimento.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar a prevalência de *Staphylococcus aureus* e MRSA em três granjas na região Nordeste, avaliar o perfil de resistência antimicrobiana e comparar o perfil genotípico dessas bactérias isoladas de animais em diferentes fases de criação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A suinocultura no Nordeste Brasileiro

No Brasil, existem granjas de suínos que utilizam tecnologia avançada, apresentando níveis indistinguíveis aos praticados nos países desenvolvidos. Porém, no Nordeste Brasileiro, uma limitada atenção tem sido voltada à criação de suínos, pois esta é considerada apenas uma atividade de subsistência familiar. Apesar deste papel secundário, a suinocultura no Nordeste apresenta uma grande importância socioeconômica, sobretudo para os pequenos produtores rurais contribuindo com a renda (SILVA FILHA *et al.*, 2008).

A região Nordeste é detentora do terceiro maior rebanho nacional (15,91%) com uma importância social e econômica significativa para alguns estados desta região, como o estado do Pernambuco que abrange 401.944 mil cabeças e a Paraíba com 133.875 mil cabeças (IBGE, 2012). Nos sistemas de criação observa-se uma flexibilidade da gestão dos rebanhos, onde se criam diversas espécies, como bovinos, caprinos, ovinos, suínos e aves, em subsistemas com baixo controle sanitário. Já que, muitos criadores de suínos deixam o fator sanidade em segundo plano, sem atentarem ao fato que a produtividade de uma granja é dependente de fatores, como genética, nutrição, manejo, ambiente e sanidade (PAIVA *et al.*, 2005).

Em teoria, esses sistemas são mais susceptíveis a infecções, ou mesmo enfermidades, causadas por microrganismos circulantes entre diferentes espécies. Segundo GREEN *et al.*, (2006) produtores de suínos devem usar máscaras, mudarem de roupa e tomar banho antes de saírem das baias, para evitar a exposição das populações mais vulneráveis (crianças, idosos, indivíduos imunodeprimidos) a aderência de bactérias oriundas da espécie suína, a suas

roupas e pele. Além disso, SASAKI *et al.*, (2010) comentam que *S. aureus* está presente na microbiota nasal destes animais.

2.2. *Staphylococcus* spp.

2.2.1. Caracterização do gênero

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. São microrganismos imóveis, pequenos com 0,5-1,5 μ de diâmetro e, quando observados ao microscópio, pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados aos pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente (“cachos de uva”) (KONEMAM, *et al.*, 2010).

Os *Staphylococcus* spp., são produtores da enzima catalase, a qual tem capacidade de modificar o peróxido de hidrogênio (BAIRD PARKER, 1963). Além disso, apresentam fatores de virulência como cápsula, peptidoglicano, proteína A, adesinas, enzimas extracelulares, leucocidinas e hemolisinas (SPANU *et al.*, 2012). Para o isolamento de *Staphylococcus* spp., o meio seletivo mais utilizado é o manitol salgado, o qual é aproveitado aerobiamente e anaerobiamente por cepas produtoras de coagulase (BAIRD PARKER, 1963). É capaz de formar colônias amarelas em meio enriquecido além de produzir α e beta-hemólise em placas de ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5% (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010).

Existem 49 espécies descritas e 26 subespécies pertencentes a este gênero (LPSN, 2014), colonizando diferentes ambientes e espécies animais. As espécies que compõem o gênero *Staphylococcus* são divididas de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase em dois grupos: coagulase positivos (SCP) e coagulase negativos (SCN). A produção de coagulase está ligada à virulência dos SCP, pois, liga-se a proteína plasmática e catalisa a transformação de fibrinogênio em fibrina, formando uma rede de proteção, mecanismo este que, impede a fagocitose (KONEMAM *et al.*, 2010).

Atualmente, existem oito espécies de SCP identificadas: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, e *S. agnetis* e *S. aureus* (FRENEY *et al.*, 1999; DEVRIESE *et al.*, 2005; TAPONEN *et al.*, 2012). *Staphylococcus*

aureus é a espécie mais estudada, pois é a mais envolvida em infecções em humanos e em animais (SILVA; GANDRA, 2004; SAKAI *et al.*, 2004).

2.2.2. Identificação fenotípica e genotípica

A identificação de *Staphylococcus* spp. tem sido tradicionalmente realizada através de métodos fenotípicos, com base em suas características morfofisiológicas e bioquímicas. Para a identificação do gênero, utiliza-se a coloração de Gram para observar as características morfotintórias; e por meio do teste de produção de catalase. A identificação das espécies é realizada através de painel de fermentação de açúcares e testes bioquímicos, como a prova de produção de coagulase. No entanto, bactérias com comportamento bioquímico atípico representam um problema na acurácia da identificação realizada apenas através de testes fenotípicos (KONEMAM *et al.*, 2010).

Os avanços na área molecular tem proporcionado o desenvolvimento de testes genotípicos importantes para a adequada identificação e caracterização dos *Staphylococcus* spp. A taxonomia do gênero foi esclarecida nos últimos anos devido à utilização de técnicas moleculares que permitiram relacionar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos (LANGE *et al.*, 2011).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) possibilitou a detecção de microrganismos que não podiam ser cultivados, assim como aqueles que eram fastidiosos ou de crescimento lento. A técnica também tem sido utilizada para identificação de microrganismos, incluindo *Staphylococcus* spp. (SASAKI *et al.*, 2010). Dessa forma, na última década, a PCR tornou-se o método genético mais utilizado em diagnóstico microbiológico (MALORNY *et al.*, 2003). Várias modificações da PCR foram descritas, dentre essas, destaca-se a Multiplex PCR (mPCR), através da qual é possível a identificação de dois ou mais genes concomitantemente (TANG; PROCOP; PERSING, 1997).

2.2.3. Resistência aos beta-lactâmicos

O mecanismo de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. é bastante complexo. Conceitualmente, a resistência ocorre quando os microrganismos de uma população são

expostos a uma pressão de seleção por meio da presença de determinado antimicrobiano, onde apenas as bactérias mais resistentes persistem, proporcionando o surgimento de vários clones resistentes ao respectivo antimicrobiano. Acredita-se que a expressão da resistência microbiana tem aumentado em função da utilização exacerbada de antimicrobianos, principalmente os beta-lactâmicos, como as penicilinas e seus derivados sintéticos (KONEMAM *et al.*, 2010; FIOL *et al.*, 2010). Por sua grande variedade, representam a classe mais amplamente utilizada seja na medicina humana quanto na medicina veterinária, tornando-se um grave problema de saúde pública em todo mundo (LOWY, 2003).

De acordo com CHAMBERS, (2001), a disseminação de clones resistentes surgiu logo após a introdução da penicilina. Esta proliferação ocorre através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias Gram-positivas, dentre as quais destacam-se o gênero *Staphylococcus* (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Inicialmente, em 1940, todas as infecções por *Staphylococcus aureus* eram efetivamente curadas através da penicilina. No entanto, em meados de 1942, já haviam surgidas cepas resistentes (CASSETTARI *et al.*, 2005). Diante disso, introduziu-se em 1959 a meticilina, a qual foi à primeira das penicilinas modificadas e projetadas para resistir à ação da beta-lactamase. Após dois anos, relatou-se o primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, mais comumente chamado de MRSA (JEVONS, 1961; FITZGERALD *et al.*, 2001).

A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos pode ocorrer devido a dois mecanismos distintos: a produção da enzima beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção da proteína ligante de penicilina de baixa afinidade por beta lactâmicos (PBP2a), a qual é codificada pelo gene *mecA* (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000; GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011). No primeiro mecanismo, a enzima em questão atua na ruptura do anel beta-lactâmico do antimicrobiano. Já a PBP2a não permite que o anel beta lactâmico se fixe na parede celular e que autolisinas sejam ativadas e degradem a mesma, conduzindo à morte da célula bacteriana (LYON; SKURRAY, 1987).

Desta forma, as bactérias resistentes multiplicaram-se sofrendo mutação e trocando material genético entre linhagens de mesma espécie e/ou diferentes (GUIMARÃES *et al.*, 2010), comprovando, a elevada capacidade adaptativa frente a fatores ambientais, possuindo assim alta capacidade de adaptação a diversos fatores (FERNANDES, 2006).

A princípio, MRSA eram considerados exclusivos de hospitais (HA-MRSA), representando a principal causa de infecção nosocomial em pacientes imunodeprimidos (DUIJKEREN, VAN *et al.*, 2004; JIMÉNEZ *et al.*, 2012; ESPADINHA *et al.*, 2013; OTTER *et al.*, 2013). Entretanto, um fenômeno mais preocupante começou a ser observado a partir da década de 1990: a identificação de MRSA em pessoas sem histórico de exposição ao ambiente hospitalar (MATTEO BASSETTI, 2009). Dessa forma, foram reconhecidos na comunidade os chamados *Staphylococcus aureus* meticilina resistente comunidade-adquirida ou CA-MRSA (LEE, 2003; WEESE *et al.*, 2006; MORGAN, 2008; CUNY *et al.*, 2010).

Mais recentemente, foi identificada uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à cefoxitina colonizando populações animais, possivelmente favorecida pela ampla utilização de antimicrobianos (RICH *et al.*, 2005). Denominada MRSA associada a rebanhos (“*livestock-associated MRSA*”), ou LA-MRSA, foi detectada primeiramente em suínos (SERGIO *et al.*, 2007; KHANNA *et al.*, 2008; SUNDE *et al.*, 2011; OPPLIGER *et al.*, 2012; SZABÓ *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2013), sendo estes considerados reservatórios deste patógeno.

Vários estudos demonstram que MRSA em humanos podem ser originados de animais, incluindo suínos (JAMROZY *et al.*, 2012; KÖCK *et al.*, 2013; SCHINASI *et al.*, 2014), equinos (EEDE, VAN DEN *et al.*, 2009; DUIJKEREN, VAN *et al.*, 2010), cães e gatos (BOOST; O'DONOGHUE; SIU, 2007; FAIRES; TATER; FERREIRA *et al.*, 2011) e frangos (PERSOONS *et al.*, 2009).

A grande preocupação sobre MRSA decorre do fato dessas bactérias apresentarem resistência a diversos outros antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos, conferindo grande dificuldade de tratamento em caso de infecção (ITO *et al.*, 2001; COHN; MIDDLETON, 2010).

2.2.4. MRSA em sistemas de produção de suínos

Existe uma grande preocupação relacionada ao fato de que os suínos são animais de produção e considerados reservatórios de MRSA (LIM *et al.*, 2012). No entanto, não há indícios de transmissão de MRSA através do consumo ou manipulação de alimentos infectados. Por outro lado, alguns estudos já confirmaram os suínos portadores assintomáticos (BOSCH *et al.*, 2010). Os agentes envolvidos são geralmente associados ao complexo clonal

CC (CC398), o qual é considerado uma ameaça à saúde pública como motivo de infecções clínicas em seres humanos. Portanto, trata-se de um agente causador de doença ocupacional (CROMBÉ *et al.*, 2013). Vale salientar que, a colonização nasal em suínos por MRSA não resulta, geralmente, em sinais clínicos. Por isso, o termo colonização em vez de infecção é utilizado atualmente (SZABO *et al.*, 2012).

Elevada prevalência de MRSA pode representar um risco para a saúde pública, tendo em vista que, as razões para altos índices de colonização permanecem incertas (KHANNA *et al.*, 2008). WEESE *et al.*, (2011) encontraram MRSA em 4,6% dos suínos pesquisados, em 5 de 46 fazendas (11%). Apesar de limitados, os dados comparando fases de criação de suínos são sugestivos que a prevalência pode ser maior em leitões desmamados (SMITH *et al.*, 2009).

A prevalência de MRSA na produção de suínos pode variar de acordo com muitos fatores, incluindo as regiões geográficas, setor de produção e idade de suínos testados, bem como, metodologias de amostragem (KHANNA *et al.*, 2008). Contudo, sabe-se que o MRSA não está ocorrendo de forma estática, existem variantes que confirmam que este patógeno continua evoluindo e se adaptando (WAGENAAR *et al.*, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem e critérios de inclusão

O número total de amostras a serem colhidas foi determinado segundo fórmula estatística para cálculo do tamanho amostral (THRUSFIELD, 2012), composta pelos seguintes elementos:

$$n = z^2 \cdot p(1-p) / (D^2)$$

Onde:

n = número de amostras a serem colhidas

z = valor da distribuição normal padrão ao nível de confiança desejado

p = estimativa de prevalência

D = erro máximo aceitável

Para o presente estudo, utilizou-se uma estimativa de prevalência de *Staphylococcus* spp., em suínos de 22%, com base em um estudo prévio, sobre prevalência do agente (MASSON; FERREIRA; CARVALHO, 2012), nível de confiança de 95%, calculado de acordo ARMITAGE & BERRY (1994), e erro máximo aceitável de 5%, o que resultou num mínimo de 264 amostras.

Foram colhidas amostras a partir de 282 *swabs* nasais de suínos em três propriedades localizadas nos municípios de Santa Rita-PB, Areia-PB e Itapetim-PE no período de Fevereiro a Agosto de 2014. Do total de 145 suínos na granja 1 colheram-se 32 *swabs*, de 496 na granja 2 foram colhidos 109 e na granja 3 do total de 640 animais colheram-se 141 *swabs* nasais. Em cada propriedade, colheu-se amostras de animais de diferentes fases de criação, estimando-se 22%, do total de animais em cada fase de produção, incluindo-se maternidade (leitões não desmamados), creche, terminação (engorda), marrãs, porcas em lactação e cachaços (reprodutor). Os animais foram selecionados de forma aleatória. As amostras foram acondicionadas ao meio *Stuart* e mantidas em refrigeração até seu processamento no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA-UFPB), que ocorreu em um período máximo de 12 horas após a colheita. A Tabela 1 apresenta a distribuição entre as fases de criação, das amostras colhidas nas três propriedades (Granja 1, Granja 2 e Granja 3).

Tabela 1. Distribuição do número de amostras colhidas nas Granjas 1 (Areia), 2 (Santa Rita) e 3 (Itapetim), de acordo com as diferentes fases de criação entre as granjas estudadas

Categoria	Granja1	Granja2	Granja3
Creche	10	37	36
Maternidade (Leitão não desmamado)	8	4	13
Marrãs	8	13	26
Porcas em Lactação	-	4	8
Reprodução (Cachaços)	-	3	5
Terminação (Engorda)	4	48	55
Total	32 ^I /145 ^{II}	109 ^I /496 ^{II}	141 ^I /640 ^{II}

I= n total de *swabs* nasais colhidas;

II= n total de suínos na granja;

3.2. Isolamento microbiológico e identificação

As amostras foram submetidas a isolamento microbiológico convencional (SZABO *et al.*, 2012) com modificações. O fluxograma de isolamento utilizado é mostrado na Figura 1. Como enriquecimento primário, os *swabs* foram inoculados em caldo Mueller-Hinton (MHB) (BD[®]-Inglaterra) com 6,5% de NaCl, com 24h de incubação a 37°C. Posteriormente, uma alíquota foi submetida a enriquecimento secundário em caldo de Triptona de soja (TSB) (BD[®]-Inglaterra) contendo 3,5 mg/litro de cefoxitina. Este caldo seletivo foi incubado durante 17h à 37°C.

Paralelamente, uma alçada de MHB foi repicada para os ágares manitol salgado (MSA) (BD[®]-Inglaterra) e ágar cromogênico MRSA (HIMEDIA[®]-Índia) para posterior observação das características das colônias típicas de *Staphylococcus* spp. Após incubação do TSB, foi retirada uma alçada e repicada em MSA, contendo 3,5 mg/litro de cefoxitina e em ágar MRSA, ambos seguidos por incubação a 37°C durante 24 e 48 h. Realizada a identificação presuntiva das colônias em ágar, retirou-se cinco colônias com características do gênero *Staphylococcus*, as quais foram repicadas em ágar Baird-Parker (BP) (BD[®]-Inglaterra) submetidas à coloração de Gram, para confirmação das suas características morfotintórias. Em seguida, realizado o teste de catalase, dos quais os isolados positivos foram selecionados e encaminhados para prova de produção de coagulase. Em contrapartida, os negativos à prova da coagulase foram armazenados a -80°C em caldo de infusão em cérebro e coração (BHI) (BD[®]-Inglaterra) e acrescido de 40% de glicerol, até o momento das análises moleculares.

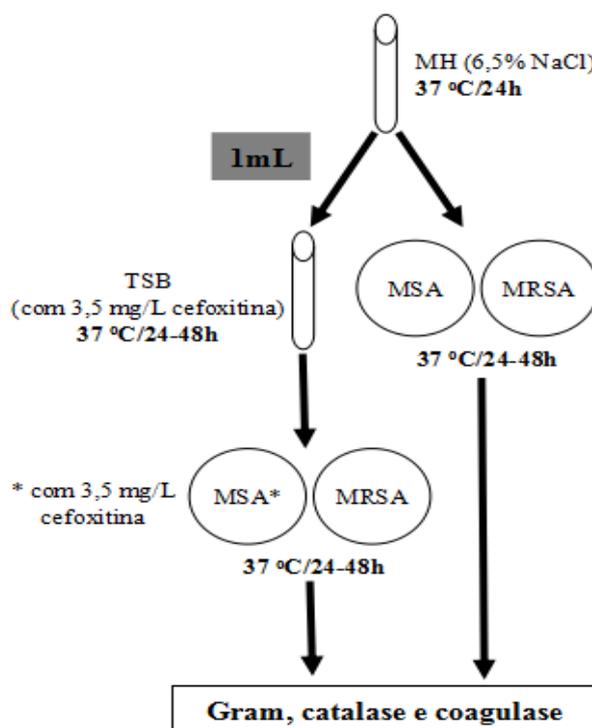


Figura 1. Fluxograma do protocolo de isolamento e identificação (SZABO *et al.*, 2012)

3.3. PCR para identificação de marcadores moleculares em *Staphylococcus* spp e *S. aureus*

3.3.1. Extração de DNA Total bacteriano

A extração do DNA genômico dos isolados de *Staphylococcus* spp., foi realizada pelo método de fervura-centrifugação, de acordo com ADWAN (2014) com modificações.

Para extração, uma colônia de cada isolado foi suspensa em 100 μ L de água ultra pura, congeladas por 10 minutos e em seguida fervidas a 100°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas brevemente, por 3 minutos a 12000 rpm à 4°C para remoção de detritos celulares. O sobrenadante foi retirado para outro tubo (aproximadamente 70 μ L) e estocado a 4°C até à sua utilização.

3.3.2. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus* e de resistência antimicrobiana por Reação de Polimerase em cadeia multiplex (mPCR)

A mPCR foi utilizada para detecção de MRSA, através da confirmação da espécie *S. aureus* concomitantemente à identificação dos gene *mecA*, associado à resistência a meticilina. Foram utilizados iniciadores (*primers*) específicos para a investigação da presença dos genes 16S rRNA, *nuc*, *femA*, *coa* e *mecA* (Quadro 1).

Quadro 1. *Primers* e ciclos empregados para identificação de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

Gene (pb)	Espécie	Sequência (5'-3')	Ciclo ¹	Referência
16S (rRNA) (756pb)	<i>Staphylococcus</i> spp	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	II	ZHANG <i>et al.</i> , (2004)
<i>nuc</i> (279pb)	<i>S. aureus</i>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	II	CIFTCI <i>et al.</i> , (2009)
<i>femA</i> (132pb)	<i>S. aureus</i>	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	II	MEHROTRA <i>et al.</i> , (2000)
<i>coa</i> (variável)	<i>S. aureus</i>	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	I	HOOKEY <i>et al.</i> , (1998)
<i>mecA</i> (162pb)	<i>S. aureus</i> (MRSA)	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA AA	II	OLIVEIRA; LENCASTRE, (2002)

I-94°C 4 min (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5 min; II-94°C 5 min (94°C 40s, 58° 40s, 72°C 1 min) x10 (94°C 1 min, 50° 1min, 72°C 2 min) x 25 e 72°C 10 min

Para a mistura da PCR utilizou-se 23 µL de reação, contendo, 1 U de *Taq* DNA polimerase (LGC Biotecnologia, USA), 2mM de MgCl₂, 1X tampão *taq*, 200 µM de cada dNTPs (Thermo Fisher Scientific), água mili-Q para completar o volume total da reação e 2 µL do DNA extraído. Já para o gene *coa* foi realizada uma nova PCR de todos os isolados que amplificaram somente 16S rRNA e *mecA* (indicador de resistência) bem como aqueles que foram apenas positivos para 16S rRNA, a fim de identificar *S. aureus*, conforme descrito na Figura 2.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (Techne TC5000, Inglaterra). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 2% corado com o GelRed (Biotium, USA) e visualizados com auxílio de transiluminador em UV (Carestream Molecular Imaging Software - Version 5.0, ©Carestream Health, Inc, EUA). Utilizou-se como controle positivo a *S. aureus* USA 400 quanto à presença de todos os genes.

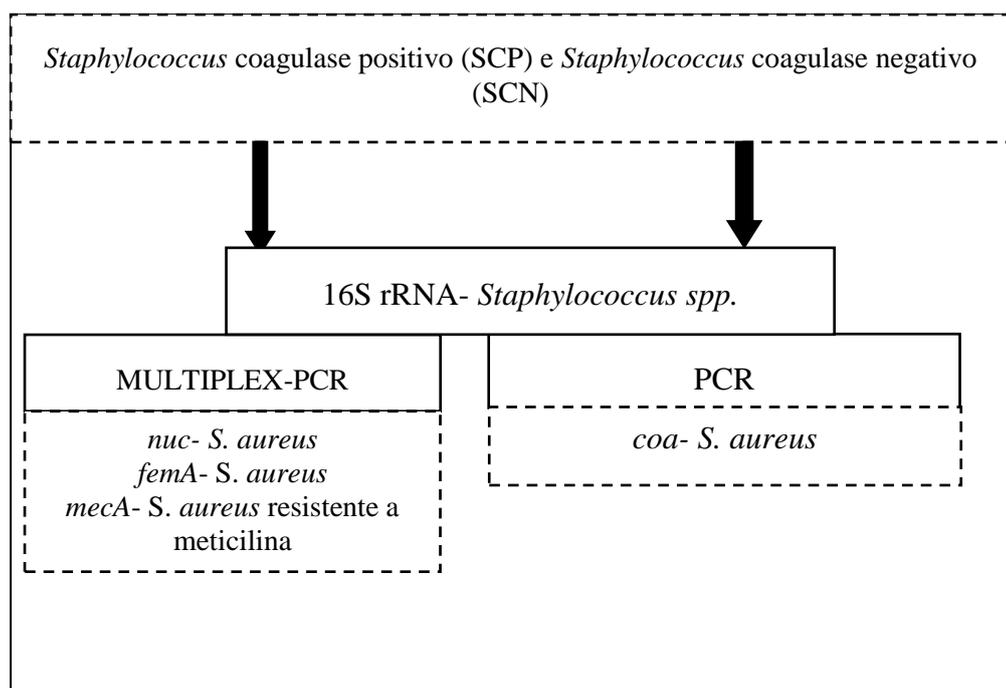


Figura 2. Esquema para identificação fenogenotípica de *Staphylococcus* spp., *S. aureus* e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)

3.4. Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* método de Disco-difusão (Kirby-Bauer)

Os testes de detecção fenotípica de resistência foram executados conforme as recomendações do *Clinical and laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Primariamente, as culturas foram semeadas em placas de TSA (ágar Triptase de soja) e incubadas em estufa bacteriológica à 37°C. Após 24h de incubação, o cultivo foi suspenso em solução salina estéril (0,9%) em tubo, de forma a obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland o que corresponde a uma turvação equivalente a aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (CLSI VET01-A4, 2013). Em seguida, as culturas foram semeadas em placas de ágar Muller-Hinton, com auxílio de *swabs*, seguido da disposição dos discos.

Foram utilizados discos com os seguintes antimicrobianos: ampicilina (AMP 30 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), penicilina G (PEN 10 UI), clorafenicol (CLO 30 µg), gentamicina (GEN 10 µg), oxacilina (OXA 1 µg), clindamicina (CLI 2 µg), tetraciclina (TET 30 µg), amoxicilina + clavulanato (AMC 10 µg), azitromicina (AZI 15 µg), vancomicina (VAN 30 µg) e enrofloxacin (ENO 10 µg) (CECON®, São Paulo, Brasil). Por fim, as placas foram incubadas à 37°C/24h e realizadas leituras dos resultados, através da medição dos halos de inibição formados por cada antimicrobiano, conforme descrito na Tabela 2. Para o teste de

controle, foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

Tabela 2. Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição aos antimicrobianos testados de acordo com o CLSI, (2013)

Discos de antimicrobianos	Halos de inibição (mm)		
	S	I	R
CFO (30 µg)	≥22	-	≤ 21
OXA (1 µg)	≥ 18	-	≤ 17
PEN (10 UI)	≥ 29	-	≤ 28
CLO (30 µg)	≥ 18	13-17	≤ 12
AMP (30 µg)	≥ 29	-	≤ 28
TET (30 µg)	≥ 19	15-18	≤ 14
GEN (10 µg)	≥ 15	13-14	≤ 12
CLI (2 µg)	≥ 21	25-20	≤ 14
AMC (10 µg)	≥ 20	-	≤ 19
ENO (10 µg)	-	-	-
VAN (30 µg)	-	-	-

3.6. Genotipificação dos isolados

As bactérias identificadas como *S. aureus* foram genotipificadas através de Rep-PCR e macrorestrição do DNA cromossomal, pelo método de eletroforese de campo pulsátil (PFGE).

3.6.1. Extração por Fenol: clorofórmio: álcool isoamílico

A extração do DNA genômico dos isolados de *S. aureus* foi realizada por Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), descrito por Sambrook *et al.*, (1989), com modificações. Culturas bacterianas (1,4 mL) crescidas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* obtido foram adicionados 500 µL de tampão TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1mM de EDTA), 10 µL de lisozima (10 mg/mL) (USB Corporation, EUA) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL) (BioLabs®, EUA), para lise da parede celular. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada a 60° C *overnight*.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão STE (2,5% SDS, 10mM Tris-HCl, pH 8, 0,25M EDTA) com incubação a 60°C por 15 minutos, para solubilização dos lipídios. A

solução foi mantida em repouso a temperatura ambiente e em gelo durante 5 minutos (cada). Adicionou-se 130 μL de acetato de amônio (7,5 M) (Amresco[®], EUA), com incubação em gelo por 15 minutos, neutralizando a reação.

Sequencialmente, a solução foi centrifugada em rotação supracitada por 5 minutos, com sobrenadante ($\pm 700\mu\text{L}$) transferido para novo tubo (1,5 mL) e a este adicionado volume igual de Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Sigma-Aldrich, EUA), sendo novamente centrifugado por 5 minutos. O fenol:clorofórmio precipita as proteínas, revelando-as na interface entre as fases orgânica e aquosa.

O sobrenadante ou fase aquosa (onde se encontra os ácidos nucleicos) ($\pm 400 \mu\text{L}$) foi transferido para um novo tubo (1,5 mL, livre de RNase e DNase) e a este adicionado 420 μL de Etanol absoluto gelado (Amresco[®], EUA), com incubação a -20°C por 24 horas para precipitação do DNA extraído.

Após 24 horas, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante descartado. O pellet (translúcido) foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspenso em 30 μL de água (deionizada e autoclavada), com incubação a -20°C por 24 horas. Por fim, o DNA genômico extraído foi avaliado quali-quantitativamente por espectrofotometria, através do uso de biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf[®], Alemanha).

Admitiram-se limites de quantidades de DNA acima de 300 ng/ μL e absorbâncias ($A_{260/280}$) entre 1,7 a 1,9. Para realização das análises moleculares seguintes foi realizada uma padronização de DNA para 50 ng/ μL em 40 μL de água DDA (destilada, deionizada e autoclavada).

3.6.2. Método de eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

A macrorestrição por eletroforese em campo pulsátil foi realizada de acordo com MULVEY *et al.*, (2001) com modificações. As cepas foram repicadas em ágar não seletivo (TSA) e incubadas a 37°C por 16-24 horas. Posteriormente, inoculadas em BHI e novamente e incubadas a 37°C por 16-24 horas. Repicou-se uma cepa de *Salmonella Braenderup* H9812, a qual foi utilizada como marcador de tamanho molecular. E procedeu-se a preparação dos reagentes (500 mL de TE; 500 mL de água bidestilada autoclavada; 5 mL de lisozima a

50mg/mL; 5 mL de Proteinase K 20 mg/mL; 20 mL de agarose 1% em TE; 1 mL de Lisostafina solução estoque de 1mg/mL).

Os *plugs* foram preparados e identificados, colando fita adesiva na parte inferior. Foi pipetado 1000 μ L de caldo em um microtubo e centrifugado (7.000 rpm/2 min) descartado o sobrenadante e ressuspenso em 300 μ L de TE. Pipetou-se rapidamente 300 μ L de agarose no microtubo com a suspensão, homogeneizar e pipetar nos *plugs*. Foram feitos 5 plugs para cada amostra (fundir a agarose e deixa-la no banho a 55-60°C por pelo menos 15 minutos antes de usar). Os *plugs* foram deixados em temperatura ambiente por 15 minutos e colocados 5 minutos na geladeira a 4°C quando em dias quentes.

O *plugs* foram imersos em 4 mL de solução de lise contendo adicionalmente adicionados 8 μ L de lisostafina (1mg/mL) (no. L-7386, Sigma) e 70 μ L de lisozima (50mg/mL) e incubados a 55°C em banho-maria. A solução de lise foi removida dos tubos e os *plugs* foram lavados com 4 mL de água bidestilada estéril sob incubação a 37°C por 15 minutos em estufa de agitação orbital. Passados 15 min, foi removida a água bidestilada dos tubos e adicionados 4 mL de TE novamente sob incubação a 37°C por 15 minutos em estufa de agitação orbital. Este passo foi repetido por mais três vezes.

Sequencialmente, os *plugs* foram imersos em solução de restrição contendo enzima *Sma*I (10U/ μ L), tampão de restrição (10x), BSA (*Bovine Serum Albumin* - Albumina de soro bovino) e água destilada, com solução final de 100 μ L por amostra. A cepa padrão controle utilizada, *Salmonella Braenderup* ATCC H9812, foi clivada com a enzima *Xba*I (10U/ μ L), sendo a solução de restrição a mesma utilizada para *Sma*I. As amostras foram incubadas durante 3h a 25°C e por 5h a 37°C, respectivamente para restrição com *Xba*I e *Sma*I.

Após o período de restrição, preparou-se o gel de agarose a 1% (Mega base *pulse-field*) e as condições de corrida eletroforetica dispendo de, tempo inicial de 5s; tempo final de 40 s; voltagem 6 V; e tempo de corrida total de 21h. O sistema de eletroforese de campo pulsado utilizado foi o CHEF-III (Bio-Rad, Laboratories, USA).

Os subtipos de PFGE gerados foram corados com Gel Red (Biotium, EUA) e visualizados com auxílio do transiluminador em UV Gel Logic 212 PRO (Carestream Molecular Imaging Software - Version 5.0, ©Carestream Health, Inc, EUA).

3.6.3. Rep-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences*)

A reação de amplificação para a Rep-PCR foi realizada segundo protocolo descrito por Van Der Zee *et al.*, (1999), com modificações. Preparou-se reação com volume total de 25 μ L, contendo tampão (x1), $MgCl_2$ (3 mM), dNTPs (200 μ M de cada), primer RW3A (5'-TCG CTC AAA ACA ACG ACA CC-3') (1 pmol), *Taq* DNA polimerase (1U invitrogen), água DDA (deionizada, destilada e autoclavada) e DNA alvo.

A mistura reacional foi incubada em Termociclador (TPersonal Thermocycler, Biometra[®], Alemanha) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 50° C por 1 minuto e polimerização a 72° C por 2 minutos) e extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os *amplicons* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Gel Red (Biotium, EUA) e visualizados com auxílio do transiluminador em UV Gel Logic 212 PRO (Carestream Molecular Imaging Software - Version 5.0, [®]Carestream Health, Inc, EUA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por comparação com um padrão de massa molecular de 100 pb e 1 kb (Ludwig Biotec, Brasil). Como controle positivo foi utilizado cepa padrão USA 400 e um isolado de humano.

3.7. Análise dos dados

Os dados de prevalência fenotípica e genotípica foram analisados utilizando-se estatística descritiva convencional, com o uso de planilha eletrônica (Microsoft Excel[®]). Para avaliar possíveis associações entre a presença de *Staphylococcus* spp., *S. aureus* e MRSA, e variáveis independentes (fases de criação) realizou-se um teste de qui-quadrado, adotando o nível de 5% de significância. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SAS – *Statistic Analysis System* (SAS versão 9.1, 2003).

O nível de concordância dos genes utilizados para identificação de *S. aureus* foi calculado pelo coeficiente de Kappa de *Cohen*, de acordo com Landis & Koch (1977) (Quadro 2).

Com relação à genotipificação, a similaridade entre as cepas de *S. aureus* foi determinada com base na presença e ausência de *amplicons* no gel, com imagens processadas pelo software BioNumerics® (Versão 7.1, Applied Maths, Bélgica). Para expressão da similaridade entre os diferentes genótipos, foi utilizado coeficiente de Dice (2% de tolerância) e construção de dendograma através da obtenção das médias aritméticas de grupos em pares de dados combinados (UPGMA), onde diferentes *clusters* foram determinados automaticamente pelo software utilizando coeficiente de Correlação Ponto Bissériado.

Adicionalmente, o poder discriminatório da Rep-PCR foi avaliado pelo cálculo do valor *D*, conforme previamente descrito por Hunter & Gaston (1990).

Quadro 2. Critérios para avaliação dos valores de concordância Kappa de *Cohen*

Valores Kappa	Interpretação
<0	Sem concordância
0-0.20	Baixa
0.21-0.40	Razoável
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Substancial
0.81-1.00	Ótima

Fonte: LANDIS e KOCH, 1977. The measurement of observer agreement for categorical data

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de *Staphylococcus aureus*

A presença de *S. aureus* em cada uma das granjas encontra-se demonstrada na Tabela 3. Dentre as amostras analisadas, 48,94% (138/282) foram positivas para a presença de *Staphylococcus* spp., cuja confirmação foi realizada pela amplificação do gene 16S rRNA. Desse total, 15,94% (22/138) foram identificadas como *S. aureus* por apresentarem pelo menos algum dos três marcadores para a espécie (*nuc*, *femA* e *coa*). Complementarmente, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à presença de *S. aureus* entre as granjas investigadas, sendo a granja 3 com maior número de isolados positivos para *S. aureus* ou seja, 24,05% (19/22).

Tabela 3. Presença de *S. aureus* entre as diferentes granjas estudadas

Granja	Presença (%)		P	X ²
		n (total)		
1	15	20		
2	0	39	0.0035	11.2859
3	24,05	79		

P= 5% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado;
X²= qui-quadrado

O maior número de suínos, bem como o contato com animais de outras espécies podem explicar a maior presença de *S. aureus* na granja 3. Outras falhas no manejo, a exemplo da não realização da quarentena de animais recém-chegados contribuem para uma elevada frequência de *S. aureus*, caracterizando como um reservatório para infecções oportunistas nos suínos. Além disso, estes resultados de ocorrência de *S. aureus* entre as granjas estudadas refletem que este microrganismo está presente na microbiota nasal destes animais (SASAKI *et al.*, 2010) de maneira inata, independente da presença de quadros de enfermidades.

Os valores de presença de *S. aureus* nas diferentes fases de criação estão apresentados na Tabela 4, onde observou-se ausência de diferença estatística ($P>0,05$). Apesar do teste qui-quadrado ser indicado para análise de dados desuniformes, a variabilidade do número de isolados em cada setor de produção pode ter influenciado na análise ($P>0,05$) pelo teste qui-quadrado.

Tabela 4. Identificação de *S. aureus* entre os setores de produção de suínos avaliados

Setor de produção	Presença n (%)	n (total)	P	X ²
Creche	9 (18,75)	48	0,0177	16,9481
Engorda	6 (13,64)	44		
Maternidade	4 (26,67)	15		
Lactação	2 (25,0)	8		
Marrã	1 (5,26)	19		
Reprodutor	0	4		

P= 5% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado;
X²= qui-quadrado;

A prevalência de *S. aureus* foi bastante similar entre a Granja 1 [2,07% (IC=0,71;5,91)] e Granja 3 [2,97% (IC=1,91;4,59)], apesar da diferença de tamanho dos plantéis. E na Granja 2 não obteve-se prevalência. Diferentemente, alguns autores sugerem que o tamanho de rebanhos influencia a prevalência de MRSA. Rebanhos maiores parecem ser mais propensos a ser MRSA-positivos em comparação com rebanhos menores (BROENS *et al.*, 2011). Esta discordância pode ter ocorrido devido a Granja 1 ser menos tecnificada, e bem como, observou-se condições precárias de higiene, o que pode explicar uma alta prevalência independente do tamanho do rebanho.

Em contrapartida, em um trabalho realizado em Ontario no Canadá por Khanna *et al.*, (2007) encontraram prevalência de 25% (71/285). Os autores comentam que em muitas granjas avaliadas todos ou a maioria dos suínos estavam colonizados e, em outras, apenas um pequeno número de suínos. No entanto, sugerem uma nova colheita para avaliar se esta baixa prevalência em algumas propriedades não estaria associada a uma recente introdução de MRSA ou as práticas de manejo distintas entre as granjas contribuem para redução da colonização de MRSA.

A avaliação comparativa entre a prevalência de *S. aureus* nos diferentes setores de produção das granjas 1 e 3 podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Prevalência de *S. aureus* entre os setores de produção de suínos nas Granjas 1 (G1) e 3 (G3)

CATEGORIA	GRANJAS			
	G1	P % (IC)	G3	P % (IC)
CRECHE	0	0	9/164	5,49 (2,91;10,10)
MATERNIDADE	3/37	8,11 (2,80;21,30)	1/59	1,69 (0,30;9,0)
LACTAÇÃO	0	0	2/8	25,0 (7,15;59,07)
MARRÃ	0	0	1/118	0,85 (0,15;4,64)
TERMINAÇÃO	0	0	6/250	2,40 (1,10;5,14)

P= prevalência;
IC=95% de confiança

É interessante notar que, na Granja 1, *S. aureus* foi isolado no setor de maternidade, apenas [8,11% (IC=2,80;21,30)], enquanto na Granja 3 foi isolado de todos os setores de produção, exceto reprodução. Adicionalmente, ao contrário do que foi observado na Granja 1, o setor maternidade e de marrãs, apresentaram menor prevalência de *S. aureus* dentre todas as categorias de produção. Esses resultados indicam que a compreensão dos fatores de risco associados à colonização de suínos por *S. aureus* pode representar um caminho para redução da prevalência pela bactéria. Os principais fatores de risco conhecidos para MRSA em explorações de suínos são o tamanho do rebanho, tipo de produção e aquisição de suínos (BROENS *et al.*, 2011; CROMBÉ *et al.*, 2012).

Sabe-se também que o MRSA pode ser transmitido de animais para humanos. No entanto, o mecanismo exato de como a transmissão ocorre ainda necessita de alguns estudos, uma vez que não está totalmente elucidado (LEE, 2003). A elevada prevalência de *S. aureus* nos setores maternidade (Granja 1) e creche (Granja 3) ressaltam a possível ocorrência de contaminação cruzada, uma vez que são as fases de maior manejo, portanto, presença do ser humano. Outro fator importante é que, embora a maternidade seja considerada a fase de menor prevalência na Granja 3, pode sugerir que está ocorrendo contaminação no ambiente e um manejo sanitário ineficiente tornando a instalação de maternidade uma fonte de transmissão de *S. aureus* já que os animais de creche que apresentaram alta prevalência, passaram pelo ambiente da maternidade e foram colonizados por *S. aureus*.

A elevada prevalência deste patógeno em animais de creche pode ser relacionada também, às maiores condições de estresse aos quais esses animais são submetidos, tais como mudança de ambiente, separação da progenitora, mudança brusca na alimentação, coabitação com animais de outros lotes, sendo assim, mais susceptíveis a infecções devido a uma baixa no sistema imune. Outro fator importante pode ser relacionado ao fato do sistema imune não ser completamente desenvolvido nos leitões, tornando-os mais susceptíveis à infecção por *S. aureus*. Sabe-se que, por se tratar de um patógeno oportunista, o *S. aureus* é comumente isolado causando infecções em humanos imunossuprimidos (DUIJKEREN, VAN *et al.*, 2004).

A Figura 3 ilustra os produtos de amplificação dos genes 16S rRNA, utilizado para confirmar o gênero *Staphylococcus*, e dos genes *nuc*, *coa* e *femA*, marcadores de *S. aureus*. Dentre os marcadores para a espécie *S. aureus*, o gene *femA* foi o mais frequentemente encontrado em 10,9% (15/138) dentre as bactérias positivas para o gene 16S rRNA. Os outros genes, *nuc* e *coa*, foram identificados em 10,1% (14/138) e 8,7% (12/138) dos isolados confirmados pelo gene 16S rRNA, respectivamente.

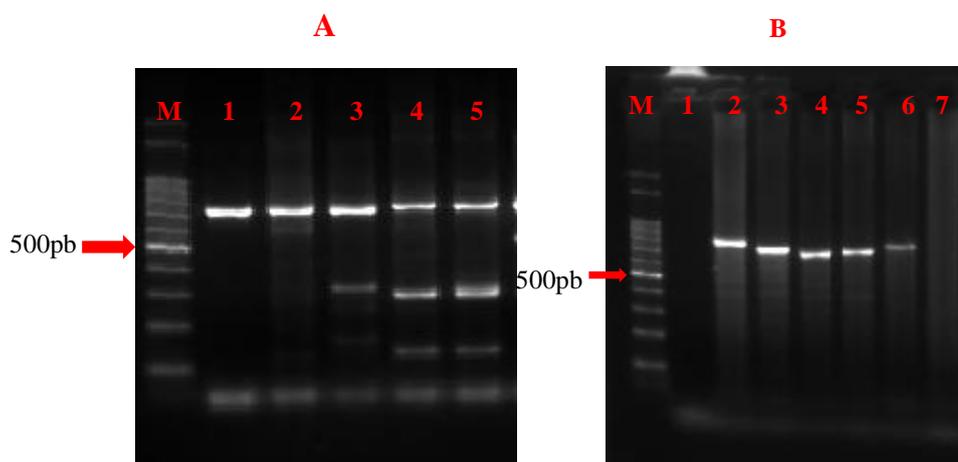


Figura 3. Produtos de amplificação dos genes A: 16S rRNA 756 pb (1, 2, 3, 4 e 5: isolados positivos) e dos genes *nuc* 279 pb (1 e 2 isolados negativos; 3, 4 e 5 isolados positivos), *femA* 132 pb (1, 2 e 3 isolados negativos; 4 e 5 isolados positivos); M= marcador de 100pb; e B: *coa* variável 400-1000pb M= marcador de 100pb (1 e 7: isolados negativos; 2, 3, 4, 5 e 6: isolados positivos)

O cálculo do coeficiente Kappa de *Cohen*, que ajusta a concordância para decisões específicas positivas e negativas, permitiu identificar um valor geral entre os marcadores *nuc-femA* de 65,3%, indicando uma concordância substancial. Os valores de concordância entre os marcadores podem ser vistos no Quadro 3. Apesar de ter existido concordância substancial

entre os marcadores moleculares, os resultados do presente estudo indicam a necessidade de utilização de mais de um marcador para confirmação de *S. aureus*.

Quadro 3. Coeficiente Kappa de *Cohen* para concordância entre os marcadores, coagulase *in vitro-nuc*, coagulase *in vitro-femA*, coagulase *in vitro-coa*, *nuc-femA*, *nuc-coa* e *femA-coa* utilizados para identificação de *S. aureus*

Marcador	Kappa Geral	P- valor geral	Intervalo de 95% de confiança do Kappa
Coagulase <i>in vitro-nuc</i>	0,451	< 0,001	sup: 0,595 inf: 0,307
Coagulase <i>in vitro-femA</i>	0,434	< 0,001	sup: 0,581 inf: 0,287
Coagulase <i>in vitro-coa</i>	0,242	0,001	sup: 0,38 inf: 0,104
<i>nuc-femA</i>	0,653	< 0,001	sup: 0,82 inf: 0,487
<i>nuc-coa</i>	0,576	< 0,001	sup: 0,742 inf: 0,409
<i>femA-coa</i>	0,549	< 0,001	sup: 0,715 inf: 0,383

Na amplificação dos três genes (*nuc*, *femA* e *coa*) para identificação de *S. aureus*, foi observada uma variação, a qual permitiu a formação de diferentes perfis (Tabela 6).

Deste modo, foram obtidos sete perfis distintos de acordo com a amplificação de um ou mais dos três genes em estudo que caracterizam a espécie. Independentemente do perfil obtido, estes isolados foram genotipicamente caracterizados como *S. aureus*. O perfil 1, com resultado positivo para os três genes foi encontrado em 31,8% (7/22) dos isolados.

No presente trabalho, foi observada uma maior frequência de amplificação do gene *femA* em relação ao *nuc*. Diversos autores utilizam o gene *nuc* como marcador para identificação molecular de *S. aureus*. KALOREY *et al.*, (2007) visando caracterizar genotipicamente 37 isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica, obtiveram a amplificação do gene *nuc* em 36 dos isolados e estes autores descrevem que este gene codifica termonuclease.

TAMARAPU; MCKILLIP; DRAKE (2001) desenvolveram um mPCR para detecção de *Staphylococcus aureus* em leite e derivados através da amplificação dos genes *nuc* e também verificaram elevada especificidade de sequências do gene *nuc* para detecção dessa bactéria. Contudo, foram escolhidos os três genes para a caracterização de *S. aureus* devido à dificuldade encontrada na identificação deste agente quando se utiliza apenas um deles. Assim

como foi confirmado no presente estudo, pois, observa-se a presença de um gene isolado ou deste em conjunto.

Tabela 6. Perfis de amplificação dos genes *coa*, *nuc* e *femA* para identificação de *Staphylococcus aureus* obtidos das granjas 1, 2 e 3

Perfis (nº de isolados)	(%)	<i>nuc</i>	<i>femA</i>	<i>Coa</i>
1 (7)	31,8	+	+	+
2 (4)	18,2	-	+	-
3 (3)	13,6	+	+	-
4 (3)	13,6	-	-	+
5 (3)	13,6	+	-	-
6 (1)	4,5	-	+	+
7 (1)	4,5	+	-	+
Total (22)	100			

+ = positivo;

- = negativo;

É importante destacar que 2,3% (5/22) dos isolados identificados como *S. aureus* apresentaram-se como coagulase negativos fenotipicamente. A produção de coagulase é um dos principais fatores de virulência dos SCP, mecanismo que ocorre através da ligação ao fibrinogênio do plasma sanguíneo, o que resulta numa aglutinação dos organismos ou na coagulação do plasma, impedindo a fagocitose (KONEMAM *et al.*, 2010). Observou-se, neste estudo, a não expressão da coagulase, pois trata-se de um mecanismo de sobrevivência quando agredido pelo sistema imune do hospedeiro. Sendo assim, existem cepas de *S. aureus* que não se apresentam positivas a prova da coagulase, podendo ser identificados erroneamente como SCN.

Os mesmos autores citados acima identificaram dois isolados de *S. aureus*, oriundos do leite de uma vaca com mastite subclínica, que não expressavam fenotipicamente a produção da coagulase, mas que foram genotipicamente caracterizados como *S. aureus* com base na amplificação dos genes *coa* e *nuc*. Estes resultados corroboram a necessidade de submeter os isolados negativos ao teste de coagulase a uma ferramenta molecular, neste caso a PCR, para comprovar a presença ou ausência dos genes específicos para *S. aureus* (*nuc*, *femA* e *coa*).

4.2. Susceptibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus*

Os resultados do teste de susceptibilidade demonstraram que todos os *S. aureus* foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. As taxas de resistências mais frequentes foram observadas para as drogas clindamicina (100%), ampicilina (100%) e penicilina (100%), seguidos de clorafenicol (95,45) e azitromicina (90,91%), respectivamente. De todos os *S. aureus*, 63,64% (14/22) apresentaram resistência a cefoxitina (Figura 4).

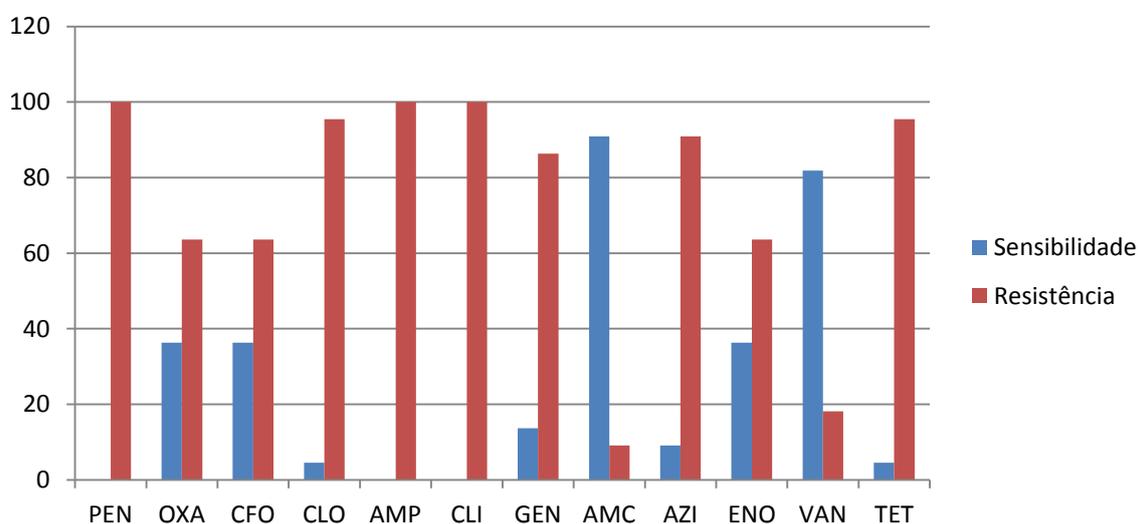


Figura 4. Susceptibilidade *in vitro* dos 22 isolados de *Staphylococcus aureus* PEN= penicilina, OXA= oxacilina, CFO= cefoxitina, CLO= clorafenicol, AMP= ampicilina, CLI= clindamicina, GEN= gentamicina, AMC= amoxicilina + ácido clavulânico, AZI= azitromicina, ENO= enrofloxacina, VAN= vancomicina, TET= tetraciclina

No presente estudo observa-se que todas as cepas foram multirresistentes, ou seja, resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Taxas elevadas de resistência em *S. aureus* de suínos também foram relatadas por Liu *et al.* (2012), os quais detectaram as seguintes taxas de resistência: penicilina (78,5%), tetraciclina (75,2%), sulfametoxazol (94%), clorafenicol (78,5%) e a oxacilina (5,4%). De acordo com Chambers, (2001) a resistência antimicrobiana à penicilina, meticilina, ou vancomicina é uma consequência inevitável da seletiva pressão da exposição aos antibióticos.

De acordo com Cohn & Middleton (2010), os *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) tendem a apresentar multirresistência, e não são resistentes apenas aos antibióticos beta-lactâmicos, mas também a uma variedade de classes de antibióticos, como fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrolídeos, lincosamidas e aminoglicosídeos. O conhecimento do perfil de resistência de cepas multirresistentes é de grande importância tendo em vista que, é o ponto de partida para estabelecer uma melhor estratégia terapêutica (SAKWINSKA *et al.*, 2011).

De todos os isolados estudados 100% foram resistentes a ampicilina e penicilina G. Estes são antimicrobianos de baixa onerosidade e fácil acesso no mercado, o que pode indicar um elevado uso na região e, conseqüentemente, o alto número de cepas resistentes.

A resistência a clindamicina por parte de 100% dos isolados de *S. aureus* no presente estudo é bastante preocupante. Já que, este antimicrobiano é o tratamento terapêutico escolhido quando MRSA é isolado. Assim, todos os isolados resistentes a cefoxitina 63,64% (14/22), considerados sugestivos para MRSA foram resistentes também a clindamicina. Além disso, é um antimicrobiano frequentemente utilizado como estratégia terapêutica no tratamento de uma variedade de infecções estafilocócicas incluindo, pele e tecidos, pneumonia e cavidade oral. Contudo, a grande preocupação relacionada à terapia com este antimicrobiano é devido a sua expressão de resistência induzível (PATEL *et al.*, 2006). No entanto, a resistência induzível é apenas expressa quando um agente indutor estiver presente, a eritromicina pode funcionar como tal agente *in vitro* (RICH; DEIGHTON; ROBERTS, 2005).

Para o perfil de resistência ao clorafenicol (95,45%), cujo uso em medicina veterinária foi proibido pelo Ministério da Agricultura em 2003, para animais de produção pelo alto poder residual dessa droga. Percebeu-se uma resistência se assemelhando a dados obtidos por MASSON; FERREIRA; CARVALHO, (2012), onde 27% dos isolados de *S. aureus* foram resistentes. A principal causa de resistência observadas no campo está relacionada entre outros fatores, ao uso inadequado de drogas como sub-dosagem e interrupção do tratamento causando uma pressão de seleção entre cepas mais resistentes (CHAMBERS, 2001). A Tabela 7 apresenta os perfis de resistência observados.

Tabela 7. Perfis de resistência encontrados entre os 22 *S. aureus*

ISOLADO	SETOR DE PRODUÇÃO/ORIGEM	ISOLAMENTO	PERFIL DE RESISTÊNCIA
1	Marrã G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	PenCloAmpTetCliGenAziEno
2	Creche G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAzi
3	Creche G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	PenCloAmpTetCliGenAzi
4	Creche G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	PenCloAmpTetCliGenAzi
5	Terminação G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAzi
6	Terminação G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	PenCloAmpTetCliGenAziVan
7	Maternidade G1	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEno
8	Maternidade G1	Manitol +3,5mg de cefoxitina	PenCloAmpTetCliGenAziEno
9	Maternidade G1	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEno
10	Creche G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEno
11	Creche G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliAziEno
12	Terminação G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEnoVan
13	Terminação G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEno
14	Creche G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenEnoVan
15	Terminação G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEnoVan
16	Lactação G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEnoVan
17	Lactação G3	Manitol	OxaPenCfoCloAmpTetCliAmcVan
18	Maternidade G3	Manitol	OxaPenCfoCloAmpTetCliAmcAziVan
19	Creche G3	Manitol	PenCloAmpTetCliGenAziEno
20	Creche G3	Manitol	OxaPenCfoCloAmpTetCliGenAziEnoVan
21	Creche G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	PenCloAmpTetCliGenAzi
22	Terminação G3	Manitol +3,5mg de cefoxitina	PenCloAmpTetCliGenAziVan

Na Figura 5 pode-se verificar isolados de *S. aureus* resistentes à penicilina (A), cefoxitina, oxacilina (D), clindamicina e gentamicina (B) bem como, outro isolado suscetível a cefoxitina e oxacilina (C).

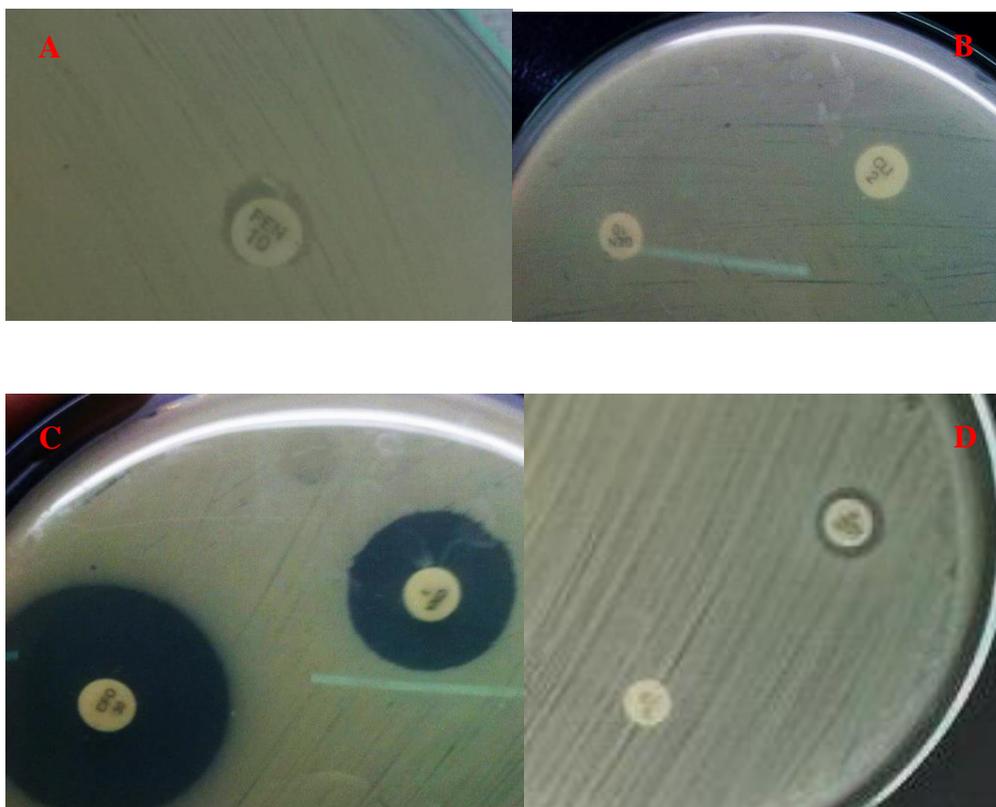


Figura 5. Teste de difusão em disco. A: Isolado de *S. aureus* resistente à penicilina. B: Isolado de *S. aureus* resistente a clindamicina e gentamicina. C: Isolado de *S. aureus* sensível a cefoxitina e oxacilina. D: Isolado de *S. aureus* resistente a cefoxitina e oxacilina

Nestas bactérias, não foi identificado o gene *mecA*, frequentemente observado em MRSA. O fato do gene não ter sido identificado indica que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos. Atualmente, o gene *mecC* vem sendo apontado como um variante de *mecA*. Segundo LAURENT *et al.*, (2012) em um caso de infecção em 2007 na França em um paciente humano, não foi detectado a presença de *mecA*, mas sim do gene *mecC*.

A resistência à metilina é mediada por uma proteína de ligação à penicilina com baixa afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos (PBP2a) codificada pelo *mecA* (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000; GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011).

Da mesma forma, vale ressaltar que, quatorze isolados de *S. aureus* resistentes fenotipicamente a cefoxitina, não amplificaram o gene *mecA*, o que também foi relatado por outros pesquisadores (FREY *et al.*, 2013).

MASSON; FERREIRA; CARVALHO, (2012) avaliaram 458 amostras, as quais foram colhidas em cinco granjas suínolas e dois frigoríficos no Brasil. Não foi possível o isolamento de MRSA em ágar Oxacilin Resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) suplementado com oxacilina. Nem tampouco foi observada a presença do gene *mecA* para meticilina confirmando o resultado encontrado no isolamento microbiológico.

Em trabalho realizado na Holanda (NEELING, DE *et al.*, 2007), encontrou-se uma alta prevalência de MRSA em 209 (39%) dos 540 suínos saudáveis estudados, porém não foi possível inferir sobre origem ou transmissão desses microrganismos, pois nessas granjas, os agricultores produzem leitões na própria granja ou compram para engorda em fazendas de criação. Além disso, cerca de 20% dos suinocultores são portadores de MRSA. Ocasionalmente, estas cepas de suínos podem causar infecções em humanos (LEWIS *et al.*, 2008).

Possíveis fontes do gene *mecA* são *Staphylococcus* spp., coagulase negativo pertencente à microflora normal do suíno. Acredita-se que, tais cepas transmitiram o gene *mecA* a uma cepa de *S. aureus* suscetível, assim, os suínos são apenas hospedeiros de MRSA (NEELING, DE *et al.*, 2007).

4.3. Genotipificação de *S. aureus* por PFGE

Escolheu-se 13 isolados de *S. aureus* positivos na mPCR para caracterização através do PFGE. Pode-se observar que todos os isolados não foram tipificados pela *smalI* (Figura 6). Trabalhos sugerem que existe uma linhagem clonal de MRSA, à sequência multilocus tipo complexo clonal (CC) 398, a qual não é tipificável através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) com *SmaI*, que foi originalmente chamado de NT-MRSA (NEELING, DE *et al.*, 2007). Posteriormente as pesquisas confirmaram o fato de que as cepas cujo DNA cromossomal não é clivado por a *smalI* pertencem ao complexo clonal 398 (BOSCH *et al.*, 2010; ARGUDÍN *et al.*, 2010). Recentemente, VOSS *et al.*, (2005) descreveram uma possível ligação entre MRSA não tipificável de origem suína.



Figura 6. Perfis de PFGE utilizando a enzima de restrição *smaI*. Linha 1 a 6 isolados de *S.aureus* não tipificados por *smaI*; 7 e 8 controle USA 400 e linha 9 marcador *Salmonella Braenderup* H9812

4.4. Genotipificação de *S. aureus* por Rep-PCR

De todos os 22 isolados positivos para *S. aureus*, foram obtidos 21 perfis pela Rep-PCR utilizando o *primer* RW3A. Os produtos de amplificação variaram de 200 a 2.000 pares de bases (pb). O método apresentou poder discriminatório de $D=0,97$.

A Figura 7 ilustra os perfis genotípicos dos isolados de *S. aureus* obtidos através da Rep-PCR no presente estudo. Os dendogramas gerados a partir da análise de similaridade genética de *S. aureus* e de *Staphylococcus aureus* resistente a cefoxitina são apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

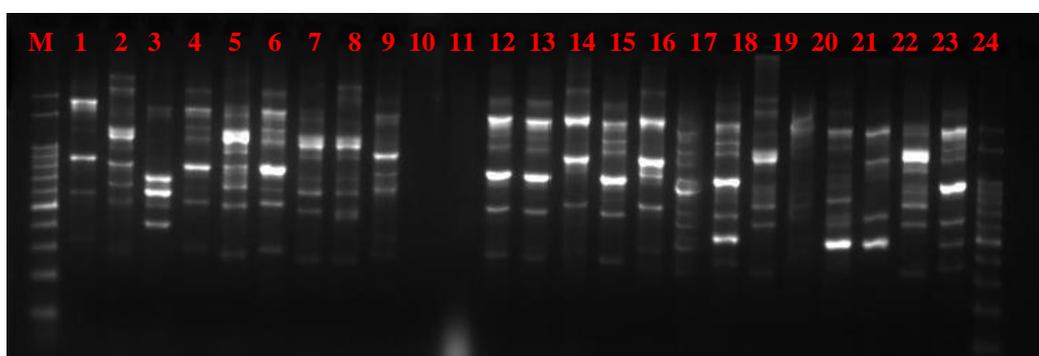


Figura 7. Gel de agarose com produtos de REP-PCR gerados a partir de *Staphylococcus aureus* isolados de *swabs* nasais de suínos. (M: marcador molecular; 1 a 24: amostras; 21- amostra de isolado humano)

Utilizando-se o limite de 80% de similaridade genética como ponto de corte, observou-se a formação de seis *clusters* (A a F), conforme visto na Figura 8. Nesses *clusters*, podem ser observadas cepas com elevada similaridade presentes em diferentes fases de criação, como engorda e creche (Cluster A), engorda e maternidade (Cluster C), marrã e lactação (Cluster D), engorda e creche (Cluster E). O Cluster F foi formado por bactérias da Granja 1. Esses resultados sugerem que as mesmas cepas de *S. aureus* estão presentes em diferentes fases de criação, sugerindo disseminação dentro da granja. A transmissão entre setores de produção é esperada, uma vez que todas as granjas tem fluxo contínuo de produção. Adicionalmente, o elevado trânsito de pessoas e a presença de outros animais nas propriedades podem contribuir para disseminação do agente, uma vez que *S. aureus* é frequentemente encontrado em diversos hospedeiros e no meio ambiente, assim como sugerido por SUNDE *et al.*, (2011).

Contudo, um resultado relevante é que um isolado de leitão na maternidade da Granja 1 e um outro na creche da Granja 3 (Cluster B), apresentaram genótipos indistinguíveis. Este achado reforça que existem cepas de *S. aureus* que colonizam diferentes ambientes.

Os mesmos achados se repetem quando são analisadas apenas cepas resistentes à meticilina (Figura 9), inclusive a presença de cepas indistinguíveis da creche e engorda (Cluster C), comprovando a circulação das mesmas cepas em diferentes setores de produção.

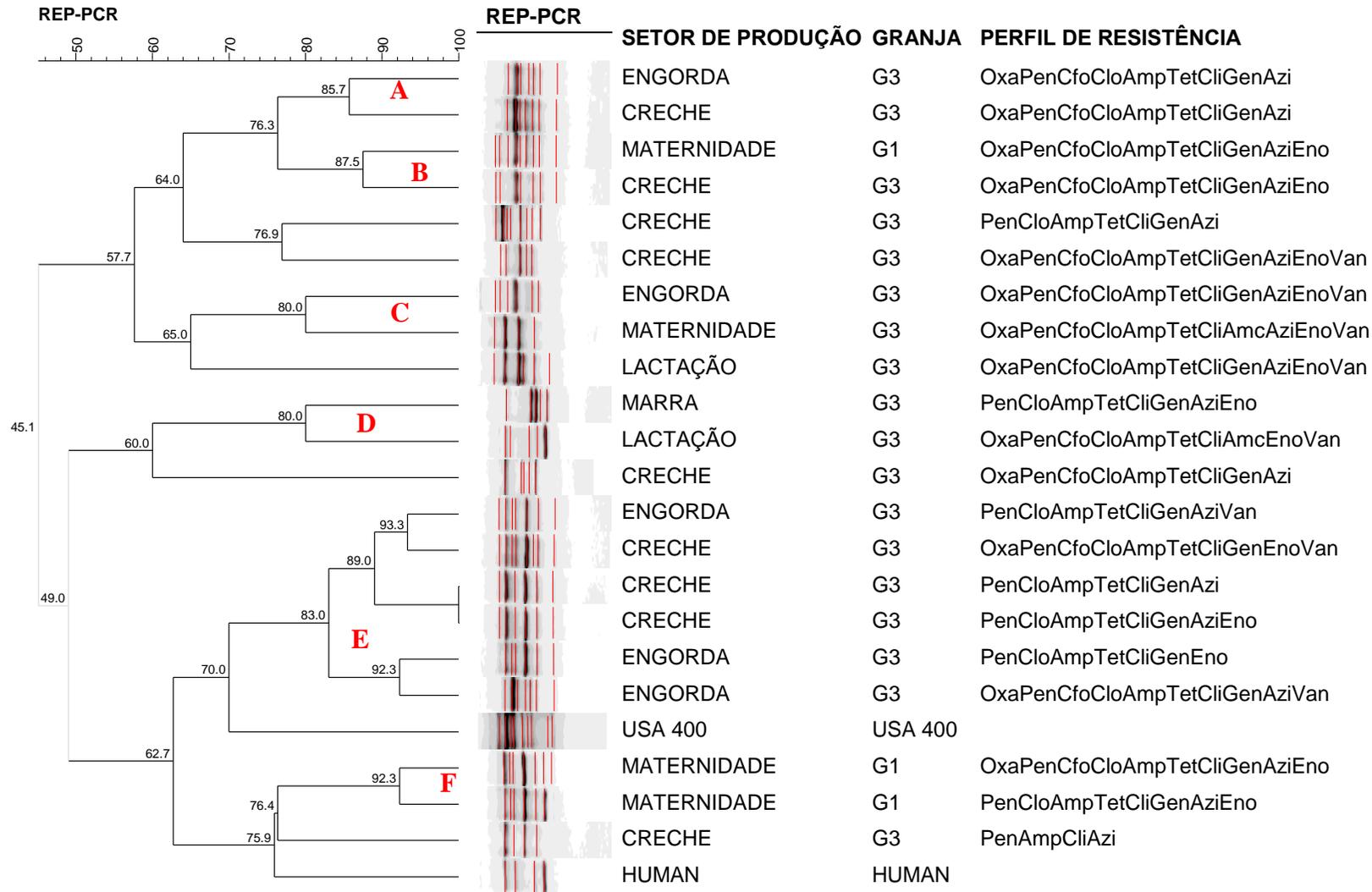


Figura 8. Dendrograma gerado a partir dos dados de tipagem de *Staphylococcus aureus* isolados de suínos. Os números no eixo *x* indicam a similaridade genética gerada a partir do coeficiente de Dice (2% de tolerância)

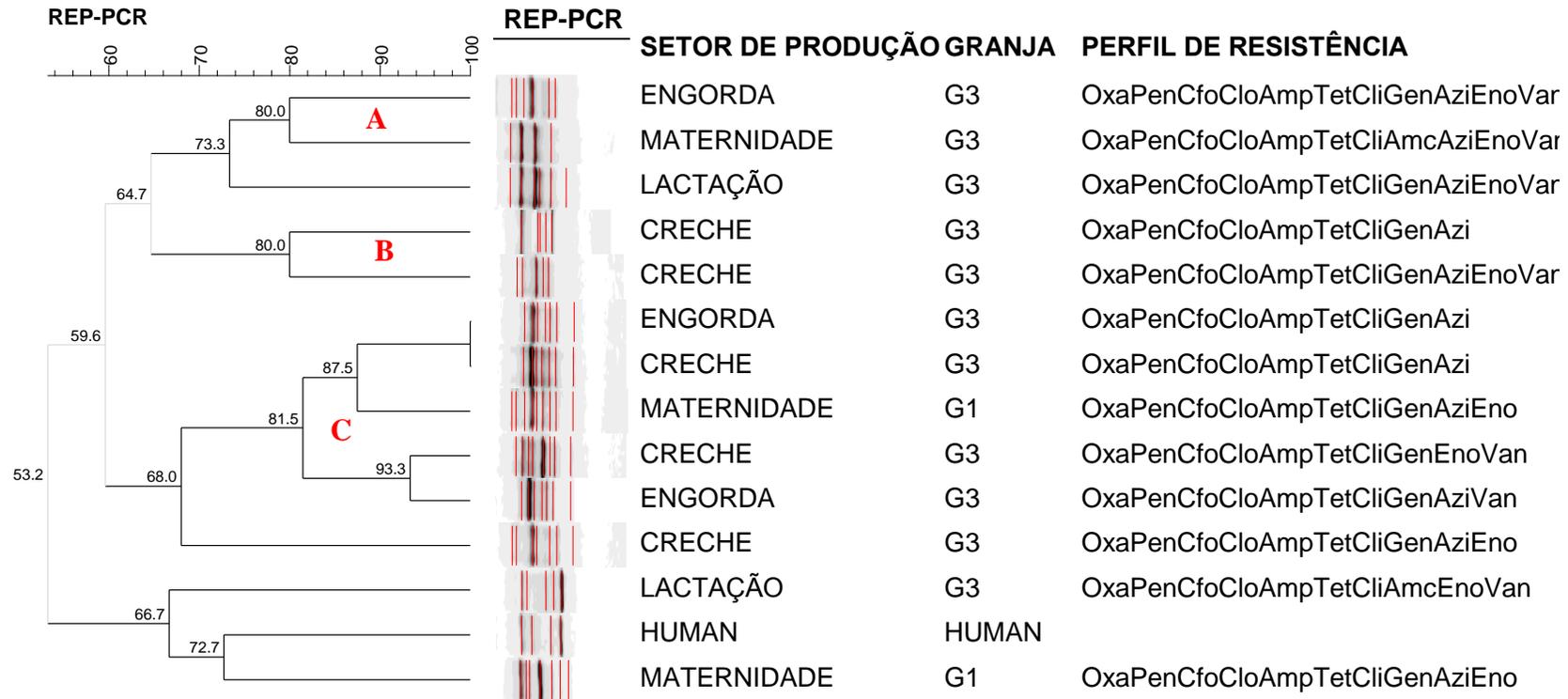


Figura 9. Dendrograma gerado a partir dos dados de tipagem de *Staphylococcus aureus* resistente a cefoxitina. Os números no eixo x indicam a similaridade genética gerada a partir do coeficiente de Dice (2% de tolerância)

5. CONCLUSÃO

O presente estudo indica a presença de MRSA (prevalência < 3%), em suínos sadios de três granjas do Nordeste, o que pode ser um motivo de preocupação em saúde pública, principalmente do ponto de vista ocupacional, uma vez que as cepas apresentaram elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos.

A genotipificação indicou que *S. aureus* de mesma origem podem ser encontrados em diferentes fases de criação, indicando ser comum a contaminação cruzada por *S. aureus* dentro de uma mesma granja. As diferenças na ocorrência de *S. aureus* entre granjas e setores de produção sugere a existência de fatores de risco associados à ocorrência de *S. aureus* e MRSA. O conhecimento desses fatores pode ser a chave para o controle da colonização de suínos por MRSA.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, são necessárias pesquisas genotípicas, incluindo outros genes marcadores de resistência, como o *mecC*, para comprovar a expressão fenotípica e melhor compreender os mecanismos de resistência genotípica. Além disso, estudos epidemiológicos com o objetivo de avaliar a transmissão, os principais fatores de risco e os possíveis carreadores deste patógeno são necessários.

Sendo este, o primeiro trabalho relacionado com a identificação e caracterização de MRSA em granjas de suíno no Nordeste, sugere-se o monitoramento da prevalência de MRSA em suínos e seus tratadores, pois, tem grande importância na segurança de alimentos e, conseqüentemente, na saúde pública.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADWAN, K. Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. **Folia Microbiologica**, 1 jan. 2014. v. 59, n. 1, p. 5–8.

ARGUDÍN, M. A. *et al.* High heterogeneity within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates, defined by Cfr9I macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and spa and SCCmec types. PMID: 20023093 PMCID: PMC2813030: **Applied and Environmental Microbiology**, fev. 2010. v. 76, n. 3, p. 652–658.

ARMITAGE. BERRY. *Statistical Methods in Medical Research* (3rd ed.). London: Blackwell, p 131) 1994. The relative risk reduction and its confidence limits are 1 minus the relative risk and its confidence limits. Confidence interval calculator 2013. Disponível em: <Http://www.Pedro.org.au/Portuguese/downloads/confidence-interval-calculator/>. Acesso em: 07 Fev. 2015.

AKINEDEN, Ö. *et al.* A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Research**, 2011. v. 78, n. 01, p. 38–42.

BAIRD-PARKER, A. C. A Classification of Micrococci and Staphylococci Based on Physiological and Biochemical Tests. PMID: 13969076: **Journal of General Microbiology**, 3 jan. 1963. v. 30, n. 3, p. 409–427.

BOSCH, T. *et al.* PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. PMID: 20144202: **BMC Microbiology**, 9 fev. 2010. v. 10, n. 1, p. 40.

BOOST, M. V.; O'DONOGHUE, M. M.; SIU, K. H. G. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners. PMID: 17484762: **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, jul. 2007. v. 13, n. 7, p. 731–733.

BROENS, E. M. *et al.* Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA positive pig herds in The Netherlands. PMID: 21733585: **Preventive Veterinary Medicine**, 1 out. 2011. v. 102, n. 1, p. 41–49.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, fev. 2005. v. 9, n. 1, p. 70–76.

CIFTCI, A. *et al.* Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, jun. 2009. v. 40, n. 2, p. 254–261.

COHN, L. A.; MIDDLETON, J. R. A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. PMID: 20230433: **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex.: 2001)**, fev. 2010. v. 20, n. 1, p. 31–45.

CUNY, C. *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. PMID: 20005777: **International journal of medical microbiology: IJMM**, fev. 2010. v. 300, n. 2-3, p. 109–117.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? PMID: 11294701 PMCID: PMC2631711: **Emerging Infectious Diseases**, 2001. v. 7, n. 2, p. 178–182.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards - Fourth Edition. CLSI document VET01-A4 (ISBN 1-56238-878-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 2013.

CROMBÉ, F. *et al.* Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs. PMID: 23518663 PMCID: PMC3602589: **Frontiers in Microbiology**, 20 mar. 2013. v. 4. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3602589/>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

DEVRIESE, L. A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. PMID: 16014483: **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 7 jan. 2005. v. 55, n. 4, p. 1569–1573.

Disponível em: [http <www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/mrsa>](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/mrsa). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. The center for food security & public health. Iowa state University. Última atualização: 2011. Acesso em: 09/10/2014.

DUIJKEREN, E. VAN *et al.* Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PMID: 15663871 PMCID: PMC3323405: **Emerging Infectious Diseases**, dez. 2004. v. 10, n. 12, p. 2235–2237.

DUIJKEREN, E. VAN *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: An investigation of several outbreaks. **Veterinary Microbiology**, 24 fev. 2010. v. 141, n. 1–2, p. 96–102.

EEDE, A. VAN DEN *et al.* High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. **Veterinary Microbiology**, 1 jan. 2009. v. 133, n. 1–2, p. 138–144.

ESPADINHA, D. *et al.* Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA. PMID: 23593155 PMCID: PMC3617237: **PLoS ONE**, 3 abr. 2013. v. 8, n. 4.

FAIRES, M. C.; TATER, K. C.; WEESE, J. S. An investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in people and pets in the same household with an infected person or infected pet. PMID: 19719444: **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 1 set. 2009. v. 235, n. 5, p. 540–543.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature Biotechnology**, dez. 2006. v. 24, n. 12, p. 1497–1503.

FERREIRA, J. P. *et al.* Transmission of MRSA between Companion Animals and Infected Human Patients Presenting to Outpatient Medical Care Facilities. PMID: 22102871 PMCID: PMC3213111: **PLoS ONE**, 10 nov. 2011. v. 6, n. 11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3213111/>>.

FIOL, D. *et al.* Prescription patterns and antibiotic use in community-based infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, fev. 2010. v. 43, n. 1, p. 68–72. . Acesso em: 31 ago. 2014.

FRENEY, J. *et al.* Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. PMID: 10319469: **International Journal of Systematic Bacteriology**, abr. 1999. v. 49 Pt 2, p. 489–502.

FREY, Y. *et al.* Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**, abr. 2013. v. 96, n. 4, p. 2247–2257. Acesso em: 22 out. 2014.

FITZGERALD, J. R. *et al.* Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: Insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. PMID: 11447287: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 17 jul. 2001. v. 98, n. 15, p. 8821–8826.

GANDRA, E. A. Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado. 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, ago. 2011. v. 11, n. 8, p. 595–603.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): **Química Nova**, 2010. v. 33, n. 3, p. 667–679.

GREEN, C. F. *et al.* Bacterial plume emanating from the air surrounding swine confinement operations. PMID: 16482973: **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, jan. 2006. v. 3, n. 1, p. 9–15.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA Sequence Analysis of the Coagulase Gene. PMID: 9542942: **Journal of Clinical Microbiology**, 4 jan. 1998. v. 36, n. 4, p. 1083–1089.

HUNTER, P. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. PMID: 2229371 PMCID: PMC268075: **Journal of Clinical Microbiology**, set. 1990. v. 28, n. 9, p. 1903–1905.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Efetivo dos rebanhos de médio porte segundo as grandes regiões e as unidades da federação**. 2012. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 04 Fev. 2015.

ITO, T. *et al.* Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. PMID: 11302791: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 5 jan. 2001. v. 45, n. 5, p. 1323–1336.

JAMROZY, D. M. *et al.* Comparative Genotypic and Phenotypic Characterisation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Isolated from Animals and Humans. **PLoS ONE**, 11 jul. 2012. v. 7, n. 7, p. e40458.

JEVONS, M. P. “Celbenin” - resistant Staphylococci. PMID: null PMCID: PMC1952888: **British Medical Journal**, 14 jan. 1961. v. 1, n. 5219, p. 124–125.

JIMENEZ, J. N. *et al.* CC8 MRSA Strains Harboring SCCmec Type IVc are Predominant in Colombian Hospitals. PMID: 22745670 PMCID: PMC3380008: **PLoS ONE**, 20 jun. 2012. v. 7, n. 6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380008/>>.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. PMID: 10817707: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 6 jan. 2000. v. 44, n. 6, p. 1549–1555.

KÖCK, R. *et al.* Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as Causes of Human Infection and Colonization in Germany. **PLoS ONE**, 13 fev. 2013. v. 8, n. 2, p. e55040.

KONEMAN. C. *et al.* Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1565 p. ISBN 976-85-277-1377-1./ (10ex.) / 616.01 / W776d / 6.ed.

KHANNA, T. *et al.* Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary Microbiology**, 30 abr. 2008. v. 128, n. 3–4, p. 298–303.

LANGE, C. C. *et al.* Identification of *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis by PCR and 16S rDNA sequencing. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, jan. 2011. v. 31, n. 1, p. 36–40.

LAURENT, F. *et al.* MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. PMID: 22932400 PMCID: PMC3437715: **Emerging Infectious Diseases**, set. 2012. v. 18, n. 9, p. 1465–1467.

LANDIS JR, KOCH GG. *The measurement of observer agreement for categorical data*. *Biometrics* 1977; **33**: 159-174.

LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. PMID: 14602604 PMCID: PMC262320: **Applied and Environmental Microbiology**, nov. 2003. v. 69, n. 11, p. 6489–6494.

LEWIS, H. C. *et al.* Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, set. 2008. v. 14, n. 9, p. 1383–1389. Acesso em: 24 out. 2014.

LIU, D. *et al.* Formation and transmission of *Staphylococcus aureus* (including MRSA) aerosols carrying antibiotic-resistant genes in a poultry farming environment. **Science of The Total Environment**, 1 jun. 2012. v. 426, p. 139–145.

LIM, S.K. *et al.* The first detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs in Korea. **Veterinary Microbiology**, 24 fev. 2012. v. 155, n. 1, p. 88–92. . Acesso em: 10 fev. 2015.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, 1 maio. 2003. v. 111, n. 9, p. 1265–1273.

LYON, B. R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. PMID: 3031442 PMCID: PMC373094: **Microbiological Reviews**, mar. 1987. v. 51, n. 1, p. 88–134.

LPSN, *List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature*– Genus *Staphylococcus*. Disponível em <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>> Acesso em 25 de Dez. 2014.

MALORNY, B. *et al.* Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. PMID: 12672591: **International Journal of Food Microbiology**, 25 maio. 2003. v. 83, n. 1, p. 39–48.

MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G. S.; CARVALHO, L. F. DE O. E S. PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE GRANJAS E FRIGORÍFICOS DE SUÍNOS. **Archives of Veterinary Science**, 5 jun. 2012. v. 17, n. 1. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/veterinary/article/view/22959>>.

MATTEO BASSETTI, E. N. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? **International journal of antimicrobial agents**, 2009. v. 34 Suppl 1, p. S15–9.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. PMID: 10698991 PMCID: PMC86330: **Journal of Clinical Microbiology**, mar. 2000. v. 38, n. 3, p. 1032–1035.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? PMID: 18819971: **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, dez. 2008. v. 62, n. 6, p. 1181–1187.

MULVEY, M. R. *et al.* Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. PMID: 11574559 PMCID: PMC88375: **Journal of Clinical Microbiology**, out. 2001. v. 39, n. 10, p. 3481–3485.

NEELING, A. J. DE *et al.* High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. PMID: 17367960: **Veterinary Microbiology**, 21 jun. 2007. v. 122, n. 3-4, p. 366–372.

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. DE. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. PMID: 12069968 PMCID: PMC127318: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, jul. 2002. v. 46, n. 7, p. 2155–2161.

OLIVINDO, C. S.; CHAPAVEL, L.; VILLARROEL, A. B. S.; ALVES, F. S. F.; SOUSA, F. G. C.; FERNANDES, F. E. P. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2009. v.38, n.7, p.1317-1321.

OPPLIGER, A. *et al.* Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains Acquired by Pig Farmers from Pigs. PMID: 22961904 PMCID: PMC3485952: **Applied and Environmental Microbiology**, nov. 2012. v. 78, n. 22, p. 8010–8014.

OTTER, J. A. *et al.* Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage at hospital admission: implications for risk-factor-based vs universal screening. **Journal of Hospital Infection**, fev. 2013. v. 83, n. 2, p. 114–121.

PAIVA, F.P. *et al.* Lisina em rações para fêmeas suínas primíparas em lactação. **Rev. Bras. Zoot.**, 2005. v.34, p.1971-1979.

PATEL, M. *et al.* Prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates. PMID: 16825368 PMCID: PMC1489468: **Journal of Clinical Microbiology**, jul. 2006. v. 44, n. 7, p. 2481–2484.

PERSOONS, D. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry. PMID: 19239762 PMCID: PMC2666289: **Emerging Infectious Diseases**, mar. 2009. v. 15, n. 3, p. 452–453.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, 18 ago. 2010. v. 2, n. 8, p. 2177–2197.

RICH, M.; DEIGHTON, L.; ROBERTS, L. Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, 20 dez. 2005. v. 111, n. 3–4, p. 237–240. . Acesso em: 9 fev. 2015.

SAKAI, H. *et al.* Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in Positive Blood Cultures by Real-Time PCR with Two Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Sets. PMID: 15583307: **Journal of Clinical Microbiology**, 12 jan. 2004. v. 42, n. 12, p. 5739–5744.

SAKWINSKA, O. *et al.* Link between Genotype and Antimicrobial Resistance in Bovine Mastitis-Related *Staphylococcus aureus* Strains, Determined by Comparing Swiss and French Isolates from the Rhône Valley. PMID: 21421793: **Applied and Environmental Microbiology**, 15 maio. 2011. v. 77, n. 10, p. 3428–3432.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 1989. Cold Spring Harbor laboratory, New York, v.3, p. 235.

SASAKI, T. *et al.* Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. PMID: 20053855 PMCID: PMC2832457: **Journal of Clinical Microbiology**, mar. 2010. v. 48, n. 3, p. 765–769.

SERGIO, D. M. B. *et al.* Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. PMID: 17644720: **Journal of Medical Microbiology**, 8 jan. 2007. v. 56, n. 8, p. 1107–1109.

SILVA FILHA, O. L. *et al.* Caracterização do sistema de produção de suínos locais na microrregião do Curimataú Paraibano. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 1 abr. 2008. v. 9, n. 1. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/915>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SILVEIRA, G. P. *et al.* Recent achievements to combat bacterial resistance. **Química Nova**, jul. 2006. v. 29, n. 4, p. 844–855.

SUNDE, M. *et al.* Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 8 in Pigs, Production Environment, and Human Beings. PMID: 21398461: **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 1 mar. 2011. v. 23, n. 2, p. 348–350.

SCHINASI, L. *et al.* A case control study of environmental and occupational exposures associated with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients admitted to a rural tertiary care hospital in a high density swine region. PMID: 24958086: **Environmental Health**, 23 jun. 2014. v. 13, n. 1, p. 54.

SMITH, T. C. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain ST398 Is Present in Midwestern U.S. Swine and Swine Workers. **PLoS ONE**, 23 jan. 2009. v. 4, n. 1, p. e4258.

SMITH, T. C. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs and Farm Workers con Conventional and Antibiotic-Free Swine Farms in the USA. **PLoS ONE**, 7 maio. 2013. v. 8, n. 5, p. e63704.

SPANU, V. *et al.* Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. PMID: 22094181: **International Journal of Food Microbiology**, 1 fev. 2012. v. 153, n. 1-2, p. 53–57.

SZABO, I. *et al.* Colonization Kinetics of Different Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Types in Pigs and Host Susceptibilities. PMID: 22081568 PMCID: PMC3255747: **Applied and Environmental Microbiology**, jan. 2012. v. 78, n. 2, p. 541–548.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. PMID: 11347997: **Journal of Food Protection**, maio. 2001. v. 64, n. 5, p. 664–668.

TANG, Y.-W.; PROCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. PMID: 9365385: **Clinical Chemistry**, 11 jan. 1997. v. 43, n. 11, p. 2021–2038. Acesso em: 3 set. 2014.

TAPONEN, S. *et al.* *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. PMID: 21335502: **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 1 jan. 2012. v. 62, n. 1, p. 61–65.

THRUSFIELD, M. Veterinary epidemiology. 2012. 2ISBN-13: 978-0-632-06397-0 (hardback: alk. paper). ISBN-10: 0-632-06397-1

VAN DER ZEE, A.; VERBAKEL, H.; VAN ZON, J. C.; FRENAY, I.; VAN BELKUM, A.; BUITING, A.; BERGMANS, A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 342-349, 1999.

VOSS, A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. **Emerging Infectious Diseases**, dez. 2005. v. 11, n. 12, p. 1965–1966.

WAGENAAR, J. A. *et al.* Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. **Veterinary Microbiology**, 18 nov. 2009. v. 139, n. 3–4, p. 405–409.

WEESE, J. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Horses and Horse Personnel, 2000-2002. PMID: 15757559 PMCID: PMC3298236: **Emerging Infectious Diseases**, mar. 2005. v. 11, n. 3, p. 430–435.

WEESE, J. S. *et al.* Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, 15 jun. 2006. v. 115, n. 1–3, p. 148–155.

WEESE, J. S. *et al.* Longitudinal investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in piglets. PMID: 20586995: **Zoonoses and Public Health**, jun. 2011. v. 58, n. 4, p. 238–243.

ZHANG, K. *et al.* New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. PMID: 15528678: **Journal of Clinical Microbiology**, 11 jan. 2004. v. 42, n. 11, p. 4947–4955.