



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

JOANA TAVARES TALIM

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ZONÓTICO DE
***Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DE SUINOCULTURAS DO ESTA-**
DO DO RIO DE JANEIRO

Niterói, RJ

JOANA TAVARES TALIM

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ZONÓTICO DE
Staphylococcus aureus MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DE SUINOCULTURAS DO ESTA-
DO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto
Biomédico da Universidade Federal Fluminense como re-
quisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Bacteriologia

Orientador: Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves

Coorientadores: Prof. Dra. Renata Fernandes Rabello e Prof. Dr. Renato Luiz Silveira

NITERÓI

2021

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

T146c Talim, Joana Tavares
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
ZONÓTICO DE Staphylococcus aureus MULTIRRESISTENTES
ISOLADOS DE SUINOCULTURAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO / Joana
Tavares Talim ; Felipe Piedade Gonçalves Neves, orientador ;
Renata Fernandes Rabello, coorientadora. Niterói, 2021.
78 f.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGMPA.2021.m.01480956740>

1. Staphylococcus aureus. 2. LA-MRSA. 3. Suinocultura. 4.
Resistência a antimicrobianos. 5. Produção intelectual. I.
Neves, Felipe Piedade Gonçalves, orientador. II. Rabello,
Renata Fernandes, coorientadora. III. Universidade Federal
Fluminense. Instituto Biomédico. IV. Título.

CDD -

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

JOANA TAVARES TALIM

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DE SUÍNOS E SEUS CONTATOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense como parte dos requerimentos necessários para obtenção do grau de Mestre

Aprovada em _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Fábio Alves – Universidade Federal Fluminense

Profª. Dra. Márcia Giambiagi de Marval - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Niterói, RJ

2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família por todo o amor, incentivo e apoio nesses longos 3 anos de mestrado.

Agradeço a todas as pessoas e instituições envolvidas, que contribuíram para a realização deste trabalho:

Primeiramente a minha coorientadora e amiga Prof^a Renata Rabello, por toda a paciência, ensinamento e entusiasmo.

Ao meu coorientador Prof^o Renato Silveira por ajudar com a tarefa árdua de coleta de amostras e todo o ensinamento durante esse trabalho à campo.

Ao meu Orientador Prof^o Felipe Piedade pelo apoio, suporte e aprendizado.

Ao instituto de Microbiologia Paulo Góes, especificamente ao laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM). Meu agradecimento em especial a Prof^a Beatriz Meurer Moreira e a técnica de laboratório Larissa Botelho.

Ao meu amigo Cássio Toledo, companheiro de laboratório, pela alegria compartilhada durante os meses de término do seu doutorado.

A todas as amigas e companheiras de laboratório: Yasmin, Izabel, Luciana, Carol, Letícia, Nayara, Hellen, Milena, Bárbara, por todo o apoio e alegria em Congressos e no laboratório.

Aos técnicos de laboratório André Barbosa e Dona Laura por toda a ajuda.

Às minhas queridas amigas de turma, Simone, Aína, Yasmin, Marrara, Flávia, Mariana, Ariela e Karina uma amizade que ficará para sempre.

Pelo suporte financeiro, agradeço à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela bolsa proporcionada durante esses anos de pesquisa, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPPI/UFF) pelos auxílios obtidos.

Ao Laboratório de Multiusuários de Microbiologia e Parasitologia (LMMP) da Universidade Federal Fluminense. Aos Prof^{os} Bruno Penna, Aloysio Cerqueira, Júlia Peixoto e todos os professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia da UFF por todo o ensinamento.

E por último, mas não menos importante, a Deus pelas “conversas informais” que só me ajudaram a manter a fé em mim mesma.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser descoberta”

Carl Sagan

RESUMO

O uso de antimicrobianos na suinocultura é uma prática comum, visando manter a saúde animal e reduzir prejuízos na produção. Todavia, representa um potencial fator de risco para a seleção de cepas resistentes aos antimicrobianos. *Staphylococcus aureus* causa frequentemente diversos processos infecciosos tanto em humanos quanto em animais, além de poder colonizar indivíduos saudáveis. Cepas multirresistentes (resistentes a no mínimo três classes de antimicrobianos distintas), como MRSA (*S. aureus* resistentes a meticilina), são uma ameaça à saúde pública devido às opções limitadas de tratamento. Produtos de origem animal podem ser carreadores destes microrganismos, afetando a segurança alimentar. Embora o Brasil seja um dos maiores produtores e exportadores de carne suína, pouco se conhece sobre a circulação destas cepas em granjas no país. Além disto, o potencial zoonótico delas ainda não está devidamente esclarecido. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente e investigar o potencial zoonótico de *S. aureus* multirresistentes isolados de suinoculturas do estado do Rio de Janeiro. Para isso, foram coletadas secreções de mucosas nasais de 250 suínos (16 granjas) e 29 pessoas (9 granjas) que trabalhavam nas suinoculturas. Após identificação da espécie bacteriana por MALDI-TOF, foi realizada a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão, com a confirmação de MRSA através da detecção do gene *mecA*. A partir do sequenciamento do genoma completo foi realizada a análise das linhagens de MRSA, dos genes de resistência e do potencial zoonótico. A identificação dos fatores associados à colonização por cepas multirresistentes se deu pela análise de dados clínicos e demográficos. *S. aureus* foi isolado de 6% dos suínos e 24,1% dos humanos investigados. A maioria estava colonizada por amostras multirresistentes, sendo 20% de MRSA em suínos e 14,3% em humanos. As maiores taxas de resistência observadas dentre as amostras de suínos foram para clindamicina, cloranfenicol e eritromicina (53,3% para cada um dos antimicrobianos citados) enquanto que as amostras isoladas de humanos, observou-se a resistência a penicilina G (85,7%), clindamicina (71,4%), tetraciclina (71,4%) e eritromicina (57,1%). Foram isoladas amostras LA-MRSA ST398-SCC*mec* V-t011 tanto de suínos quanto de um contato humano. Uma grande variedade de genes de resistência foi identificada, sendo alguns não correspondentes ao perfil fenotípico. Nenhuma amostra carregou o gene de resistência à vancomicina *vanA*. Amostras multirresistentes da mesma linhagem foram detectadas entre humanos e suínos da mesma granja, sugerindo um potencial zoonótico. As granjas mais tecnificadas, com uso de desinfetantes na higienização das instalações, realização de vazios sanitários, uso de antimicrobianos para outros fins além do tratamento e uso de pelo menos três classes destes foram associadas ($p < 0,05$) à colonização de suínos por amostras multirresistentes. Já humanos colonizados por tais amostras não foram associados aos fatores observados na população geral, como hospitalização recente e contato com indivíduos hospitalizados ou que trabalham em unidades de saúde. Logo, o contato com suínos pode ser um fator relacionado à colonização por estas cepas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, LA-MRSA, resistência a antimicrobianos, suíno

ABSTRACT

The use of antimicrobials agents in pig farming is a common practice, aiming to maintain animal health and reduce production losses. However, it represents a potential risk factor for the selection of antimicrobial resistant strains. *Staphylococcus aureus* often causes several infectious in both humans and animals, in addition to its ability to colonize healthy individuals. Multidrug-resistant strains (resistant to at least three different classes of antimicrobials agents) such as MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*), are a public health threat due to limited treatment options. Animal products can carry these microorganisms, affecting food safety. Although Brazil is one of the largest producers and exporters of pork, little is known about the circulation of these strains on farms in the country. Furthermore, their zoonotic potential is not yet fully understood. Thus, this study aimed to genetically characterize and investigate the zoonotic potential of multiresistant *S. aureus* isolated from pig farms in the state of Rio de Janeiro. For this purpose, nasal mucosa secretions were collected from 250 pigs (16 farms) and 29 people (9 farms) who worked in the pig farms. After identifying the bacterial species by MALDI-TOF, the antimicrobial resistance profile was determined by the disk-diffusion method, with confirmation of MRSA through the detection of the *mecA* gene. From the sequencing of the complete genome, the analysis of MRSA strains, resistance genes and zoonotic potential was performed. The identification of factors associated with colonization by multiresistant strains was carried out through the analysis of clinical and demographic data. *S. aureus* was isolated from 6% of the swine and 24.1% of the investigated humans. Most were colonized by multiresistant samples, 20% of MRSA in pigs and 14.3% in humans.. The highest frequencies of resistance observed among the swine isolates were for clindamycin, chloramphenicol and erythromycin (53.3% for each one), while the isolates recovered from humans, there was resistance to penicillin G (85.7%), clindamycin (71.4%), tetracycline (71.4%) and erythromycin (57.1%). LA-MRSA ST398-*SCCmec* V-t011 isolates were detected from both swine and a human contact. A wide variety of resistance genes were identified, some of which did not correspond to the phenotypic profile. No isolates carried the vancomycin resistance gene *vanA*. Multidrug-resistant isolates from the same strain were detected between humans and pigs from the same farm, suggesting a zoonotic potential. The more technified farms, with the use of disinfectants in the cleaning of the facilities, carrying out a sanitary vacuum, use of antimicrobials agents for purposes other than treatment and the use of at least three classes of these were associated ($p < 0.05$) with pig colonization by multi-drug resistant isolates. Colonized humans were not associated with factors observed in the general population, such as recent hospitalization and contact with individuals hospitalized or working in health facilities. Therefore, contact with pigs can be a factor related to colonization by these strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, LA-MRSA, antimicrobial resistance, swine

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>aaD</i>	Gene de resistência à aminoglicosídeo
AMP	Ampicilina
<i>Aur</i>	aerolisina
<i>aac6'-aph2''</i>	6'-acetyltransferase-2''-phosphotransferase
<i>aac(6')-Ib</i>	6'-acetyltransferase-2'' Ib
<i>ant(4')-IIa</i>	4'-O-adenylyltransferases IIa
<i>aph(3')-IIIa</i>	O-phosphotransferase type IIIa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>blaZ</i>	Gene de resistência aos b-lactâmicos
<i>cat</i>	Gene de resistência a cloranfenicol
CA-MRSA	Community-acquired MRSA
CC	Complexo Clonal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
<i>cfr</i>	Gene de resistência à linezolida
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
D-Ala	D- Alanina
D-Ala-D-Lac	D- Alanina - D-Lactato
<i>dfrA, dfrB, dfrK dfrG</i>	Gene de resistência ao trimetropim
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
<i>dhps</i>	Gene de resistência a sulfametazole
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERI	Eritromicina
<i>ermC</i>	Gene de resistência a eritromicina ribossomal metilase C
<i>ermT</i>	Gene de resistência a eritromicina ribossomal metilase T
EMAs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

<i>fexA</i>	Gene de resistência aos fenicóis
GEN	Gentamicina
<i>grlA</i>	gene de resistência a fluoroquinolonas
<i>gyrA</i>	gene de resistência a fluoroquinolonas
H	Hora
HA-MRSA	Hospital-acquired MRSA
<i>hlgA</i>	Gene gama hemolisina A
<i>hlgB</i>	Gene gama hemolisina B
<i>hlgC</i>	Gene gama hemolisina C
IN	Instrução Normativa
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
LA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina em animais de produção
<i>Isa</i>	Gene de resistência às lincosamidas e à dalfopristina
LNZ	Linezolida
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidroga resistente (Multirresistente)
<i>mecA</i>	gene de resistência aos b-lactâmicos
MIC	Concentração mínima inibitória
MLST	Multilocus sequence typing
<i>mrpF</i>	Gene de resistência a daptomicina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<i>msr</i>	Gene de resistencia à streptomomicina
SCG	Sequenciamento do genoma completo
PBP	Penicillin binding protein
PBP-2a	Penicillin binding protein 2a
PCR	Reação de cadeia a polimerase
PEN	Penicilina
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
pH	Potencial hidroxiliônico
PVL	Panton-Valentine leucocidina

RIF	Rifampicina
<i>sal</i>	<i>Gene de resistencia à streptomicina</i>
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome mec
STR	Estreptomicina
ST	Sequência tipo
TBE	Tris-borato-EDTA
TET	Tetraciclina
<i>tet (K)</i>	Gene de resistência à teraciclina (K)
<i>tet (L)</i>	Gene de resistência à teraciclina (L)
<i>tet (M)</i>	Gene de resistência à teraciclina (M)
TSA	Agar Triptona de Soja
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>optrA</i>	Gene de resistencia à streptomicina
OS-MRSA	Oxacilin susceptible <i>mecA</i> -positive <i>S. aureus</i>
VAN	Vancomicina
<i>vanA</i>	Gene de resistência à vancomicina (A)
<i>vanB</i>	Gene de resistência à vancomicina (B)
<i>vga, vat e vgb</i>	Gene de resistencia à streptomicina
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> intermediária a vancomicina
VRE	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

Tabela 1 - Principais mecanismos e genes de resistência aos antimicrobianos descritos para <i>S. aureus</i>	28
Tabela 2 - Sequência e concentração de iniciadores utilizados para detecção de <i>mecA</i> e identificação do tipo de SCC <i>mec</i> , além do tamanho dos produtos esperados.....	38
Tabela 3 -Kits utilizados nas etapas antecedentes ao sequenciamento do genoma completo.....	40
Tabela 4 - Número de investigados, número de colonizados por <i>S. aureus</i> e número de amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de suínos e humanos de granjas localizadas no estado do Rio de Janeiro.....	43
Tabela 5 - Distribuição de amostras de <i>S. aureus</i> multirresistentes isoladas de suínos e contatos humanos em granjas localizadas no estado do Rio de Janeiro (2014-2019).....	45
Tabela 6 - Metodologias utilizadas na caracterização genotípica de amostras multirresistentes de <i>S. aureus</i> isoladas de suínos e contatos humanos de granjas do Estado do Rio de Janeiro.....	47
Tabela 7 - Genotipificação e distribuição de determinantes genéticos de resistência entre amostras de <i>S. aureus</i> selecionadas para análise por NGS.....	48
Tabela 8 - Percentual de identidade, fenótipo e número de acesso da sequência utilizada para detecção de genes de resistência a antimicrobianos e de virulência para aqueles com identidade inferior a 100%.....	49
Tabela 9 - Perfil fenotípico e genotípico de resistência aos antimicrobianos de cepas isoladas de suinoculturas no estado do Rio de Janeiro (2014-2019).....	51
Tabela 10 - Associação de características das granjas à colonização de suínos por <i>S. aureus</i> multirresistentes.....	52
Tabela 11 - Associação de características dos contatos humanos dos suínos à colonização por <i>S. aureus</i> multirresistentes.....	53

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Graus Célsius
®	Marca Registrada
<	Maior
>	Menor
%	Porcentagem
μ	Micro
T	Temperatura
U	Unidade

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas no estudo.....33
- Figura 2 - Percentual de suínos e humanos colonizados por cepas de *S. aureus* resistentes aos diferentes antimicrobianos testados pelo método de disco difusão no Rio de Janeiro (2014-2019).....44

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	17
1.1 Dados da suinocultura no Brasil e no mundo.....	17
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.2.1 Características do gênero.....	18
1.2.2 Importância clínica e aspectos epidemiológicos	19
1.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA).....	20
1.3 Uso de antimicrobianos na suinocultura.....	22
1.4 Resistência a outros antimicrobianos.....	26
II OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
III MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Desenho de estudo.....	32
3.2 Origem e coleta das amostras.....	34
3.3 Considerações éticas.....	34
3.4 Isolamento e identificação bacteriana.....	34
3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	35
3.5.1 Teste de disco difusão ou difusão em agar.....	35
3.6 Caracterização genética de amostras de MRSA	36
3.6.1 Obtenção de DNA.....	36
3.6.2 Detecção do gene <i>mecA</i> e determinação do tipo <i>SCCmec</i>	37
3.6.3 Detecção dos determinantes genéticos da PVL	39
3.7.2 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	39

3.7	Sequenciamento genoma completo (SGC).....	40
3.8	Análise Estatística.....	41
IV	RESULTADOS	42
4.1	Colonização de suínos e contatos humanos por <i>Staphylococcus aureus</i>	42
4.2	Determinação dos perfis de resistência aos antimicrobianos.....	43
4.3	Determinação de linhagens de cepas de MRSA e outras multirresistentes.....	46
4.4	Determinação de repertório de genes de resistência a antimicrobianos e virulência.....	49
4.5	Análise de dados dos questionários.....	51
V	DISCUSSÃO.....	54
5.1	Colonização de suínos e funcionários por <i>S.aureus</i> e MRSA em granjas do estado do RJ..	54
5.2	Perfil de resistência aos antimicrobianos de <i>S.aureus</i> isoladas nas granjas.....	56
5.3	Linhagens circulantes e compartilhamento de linhagens de MRSA entre suínos e funcionários de granjas do RJ.....	59
5.4	Repertório de genes de resistência aos antimicrobianos e de cepas multirresistentes, incluindo MRSA.....	60
VI	CONCLUSÃO.....	62
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
VIII	ANEXO.....	83

I. INTRODUÇÃO

1.1 *Dados da suinocultura no Brasil e no mundo*

A carne suína é a proteína animal mais produzida e consumida do mundo. (EMBRAPA, <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-suina>). O Brasil vem expandindo, nos últimos anos, seu consumo interno (SENAR <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/suinocultura-brasileira-deve-crescer-mais-de-20-nos-proximos-anos>; acesso em 12 julho 2021). Campanhas de marketing, informando sobre a qualidade e as vantagens da carne suína, têm ajudado para o aumento do consumo mundial e conseqüentemente para a sua produção.

O Brasil, no que diz respeito a suinocultura, apresenta hoje mais de 2 milhões de matrizes alojadas em todo o território nacional. (MAPA, <https://infogram.com/estatisticas-or-brasil-or-sui-nos-1gk92ed38kzrp16>; acesso 12 de julho 2021), com quase 4 milhões de toneladas produzidas ao ano, atingindo o quarto lugar na produção mundial. Houve um aumento de 11,37% na produção nacional em relação ao ano de 2019, onde o destino principal ainda é o mercado interno com 77% seguido pelo mercado externo com 23%.

O estado de Santa Catarina é o maior produtor do país e exportador correspondendo a 27,2% de toda a produção nacional, e responsável por 55,5% da exportação. Em seguida, o maior produtor é o estado do Paraná com 20,4% e com 15,8% da exportação nacional. Por sua vez o Rio Grande do Sul aparece como segundo maior exportador com 22,9% e responsável por 18,5% da produção nacional. (EMBRAPA <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/brasil>; acesso 12 julho 2021)

Quanto às exportações, o Brasil ocupa um expressivo quarto lugar com a exportação de 750 mil toneladas ao ano, com um aumento na exportação de 16% em 2019 comparado ao ano de 2018. (DADOS EMBRAPA, <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo>; acesso 9 agosto 2021). O maior produtor mundial da carne suína é a China com 42.550 milhões de kg/ano, seguido pela União Europeia com 23.935 milhões e os Estados Unidos com 12.522 milhões. Vale considerar que a China é a maior consumidora da carne suína e o Brasil ocupa o quinto lugar (DADOS EMBRAPA, <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo>; acesso 9 agosto 2021). A produção interna de carne suína na China sofreu drástica redução, por questões relacionadas à legislação ambiental, aumentando, portanto, a dependência do país ao comércio exterior, com quase 2.500 milhões importadas ao ano, para garantir o abastecimento doméstico. Devido a esses embargos sanitários sofridos pela China nos últimos anos, a União Europeia ocupa hoje o título

lo de maior exportador da carne suína, seguida por Estados Unidos e Canadá com o Brasil em quarto lugar.

1.2 *Staphylococcus aureus*

1.2.1 *Características do gênero*

Segundo EUZÉBI (2020) o gênero *Staphylococcus* é composto por 74 espécies e 30 subespécies (<https://lpsn.dsmz.de/search?word=staphylococcus>; acesso 12 jul 2021). *Staphylococcus* são bactérias em forma de cocos, com diâmetro variando de 0,5 a 1,5 µm, Gram positivas, imóveis e que fermentam glicose com produção de ácido. Podem se organizar de forma individual, aos pares, tétrades, cadeias curtas de três a quatro células ou em formato de um grupamento irregular semelhante a cacho de uva. Colônias de *Staphylococcus* apresentam coloração variando de branca a amarelo alaranjado pela presença de pigmentos carotenóides. Com exceção de *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *Staphylococcus saccharolyticus*, são produtores de catalase, enzima que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e anaeróbios facultativos (HERMANS *et al.*, 2010; GOMES, 2011).

Algumas espécies do gênero são produtoras de coagulase, ou seja, são capazes de produzir uma enzima que converte o fibrinogênio em fibrina. A formação de fibrina próxima à região onde está ocorrendo à infecção é importante, pois impede a ação de fagócitos. Estes microrganismos quando inoculados em meio de cultura ágar sangue podem ou não causar hemólise. A maior parte das espécies é negativa na prova da coagulase, sendo denominadas de *Staphylococcus* coagulase negativa. As espécies coagulase positiva são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* e algumas cepas de *Staphylococcus hyicus* (QUINN, 2011).

A faixa de temperatura em que *S. aureus* pode se multiplicar varia de 7°C a 48,5°C, sendo a temperatura ótima entre 35°C e 37°C, além de ser tolerante a altas concentrações de cloreto de sódio e a nitratos (10% e 20%). A variação de pH em que são capazes de se desenvolver situa-se entre 4,0 e 9,8 com pH ótimo entre 6,0 e 7,0 (HOLT, 1994).

Staphylococcus spp. estão presentes em várias superfícies e nos mais diversos ambientes desde a água até o solo. São também considerados simbiossiontes uma vez que compõem a microbiota da pele, do trato respiratório e, transitoriamente, do trato gastrointestinal de diversas espécies animais e inclusive de humanos (BIBERSTEIN *et al.*, 1999; BAKER *et al.*, 2008).

1.2.2 Importância clínica e aspectos epidemiológicos

Staphylococcus aureus figuram, mundialmente, entre as principais bactérias causadoras de infecções relacionadas à assistência à saúde IRAS e, também de infecções comunitárias em humanos, sendo que as IRAS representam maior risco de vida aos pacientes (CDC, 2019). A transmissão entre humanos ocorre comumente por contato direto, principalmente através das mãos, ou indireto e, talvez, os humanos sejam a principal fonte de infecção para os animais (SANTOS *et al.*, 2002). LEE *et al.* (2003) sugerem que *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *methicillin-resistant S. aureus*) pode ser transmitido de animais para humanos. No entanto, o mecanismo exato de como a transmissão ocorre não está totalmente elucidado (FELD *et al.*, 2018).

Em humanos, *S. aureus* pode causar infecções de pele (furunculoses, impetigo e abscessos), de tecidos moles, óssea, de corrente sanguínea, pneumonia, meningite, dentre outras. Também podem causar intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico, sendo estas mediadas por toxinas (CDC, 2019). Em animais, causa doenças em diferentes espécies como, por exemplo, mastite e lesões supurativas em bovinos, piodermite, otite e infecção urinária em cães, infecções de pele e artrite em aves e lesões supurativas em suínos (MASSON *et al.*, 2001). Além de causar doenças, pode colonizar, principalmente a mucosa nasal, de humanos e animais (JONES *et al.*, 2013; PENNA *et al.*, 2013). Para causar as doenças, esta bactéria possui um arsenal de fatores de virulência que permitem ao microrganismo evadir o sistema imune do hospedeiro, se instalar nos tecidos alvos e promover a infecção. Em virtude do potencial patogênico e da resistência a antimicrobianos dessa bactéria e do consumo de alimento desta origem, a presença da mesma nesse ambiente pode representar risco para a saúde pública (BISDORFF, 2012; GRAELLS, 2012; PANTOSTI, 2012).

Um importante aspecto a ser levado em consideração na epidemiologia de *S. aureus* é a sua frequente resistência a antimicrobianos. Em 1929, Alexander Fleming anunciou a descoberta de uma substância produzida pelo fungo *Penicillium notatum* que apresentava efeito inibitório sobre bactérias. A indústria farmacêutica, a partir de então, intensificou a promoção e expansão de pesquisas de novos antimicrobianos. Entretanto, com o uso cada vez mais frequente dessas drogas, cepas bacterianas resistentes emergiram, tornando-se um desafio tanto na medicina humana quanto na veterinária. No decorrer dos anos, outros antimicrobianos foram disponibilizados para uso clínico e a

resistência a estes novos fármacos também foi surgindo e se disseminando, dificultando cada vez mais o tratamento (MANGENEY *et al.*, 2002; CADDICK *et al.*, 2006).

1.2.3 *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)

No que concerne a resistência a antimicrobianos entre *S. aureus*, a maior preocupação envolve cepas de MRSA, disseminadas mundialmente, sendo responsáveis principalmente por IRAS (MANGENEY *et al.*, 2002; CADDICK *et al.*, 2006). MRSA é considerada uma ameaça dentre bactérias multirresistentes tanto pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2019) quanto pela Organização Mundial da Saúde (OMS, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/229704?locale-attribute=es&locale=ar>, acesso em 12 jul 2021). Estudos demonstram que infecções por MRSA são evidenciadas em países dos diferentes continentes, inclusive no Brasil, caracterizando a importância de combate global (CUI, 2009; KÖCK, 2009; GOLDING, 2010; REITER, 2010; ARRIOLA, 2011; BILDORFF, 2011; HANSON, 2011; JIMÉNEZ, 2011).

Com o surgimento de amostras de *S. aureus* resistentes à penicilina G devido a produção de uma penicilinase, codificada pelo gene *blaZ*, buscou-se desenvolver novos fármacos que pudessem tratar com sucesso infecções por estas bactérias. Assim, foi disponibilizada a meticilina, uma penicilina resistente à penicilinase, em 1961. Este novo antimicrobiano tinha também como alvo de ação as proteínas de ligação à penicilina (PBPs, do inglês *penicillin-binding protein*) presentes na parede celular bacteriana e, portanto, da mesma forma impedia a síntese da parede celular o que levava a morte bacteriana (SCHITO, 2006). Pouco tempo depois, foram relatadas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. O mecanismo de resistência consiste na expressão de uma PBP alterada, denominada de PBP2a ou PBP2', com baixa afinidade à meticilina. Esta PBP apresenta baixa afinidade para todos os β -lactâmicos disponíveis atualmente, exceto para cefalosporinas de 5ª geração (BATISTA *et al.*, 2015). A PBP2a é codificada principalmente pelo gene *mecA* e este, por sua vez, é carregado por uma ilha genômica denominada cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) que inclui, além do *mecA*, genes de regulação da sua expressão e, ainda, de mobilidade (SCHITO, 2006). O SCC*mec* possui, até o momento, treze tipos (I-XIII) identificados, que diferem em tamanho, podendo variar de 20 a 68 kb, e composição genética (KLUYTMANS, 2006; LIU, 2016).

Até a década de 1980, MRSA era um problema exclusivamente hospitalar, sendo infecções comunitárias raramente identificadas. Em 1981, CDC descreveu 98 casos de usuários de drogas injetáveis com infecções por MRSA. Cepas de MRSA exibindo características genéticas e fenotípicas

diferentes das cepas hospitalares passaram a ser identificadas na comunidade, causando infecções em pessoas saudáveis (BASSETTI, 2009). Em virtude disto, cepas de MRSA foram classificadas em HA-MRSA (*hospital-acquired MRSA*) e CA-MRSA (*community-acquired MRSA*). Eram consideradas infecções por HA-MRSA, aquelas que ocorriam em indivíduos com mais de 48h de hospitalização, pacientes que realizavam hemodiálise ou que necessitavam de cuidados prolongados em casa ou em ambiente hospitalar (AMMERLAAN, 2006). Já infecções por CA-MRSA eram aquelas em que a bactéria era isolada em pacientes até 48 horas após estarem em ambiente hospitalar e sem terem recebido tratamento com antimicrobianos nos trinta dias precedentes. Além disso, não haviam recebido hemodiálise, não haviam sido hospitalizados no ano anterior e não estavam sob cuidados especiais por tempo prolongado (FRIEDMAN, 2002). A incidência de infecções por CA-MRSA aumentou em diversas partes do mundo, chamando a atenção devido à sua rápida emergência e potencial para causar infecções graves. Grande parte das cepas de CA-MRSA apresentava o gene que codifica a leucocidina Panton-Valentine (PVL, do inglês *Panton Valentine Leucocidin*), uma citotoxina capaz de causar necrose tecidual e destruição de leucócitos, sendo frequentemente associada a infecções de pele e pneumonias necrosantes graves com alto índice de letalidade. Atualmente, a classificação de HA-MRSA e CA-MRSA não é mais utilizada devido a grande variabilidade das cepas adquiridas tanto em unidades de saúde quanto na comunidade (DAVID *et al.*, 2017).

Colonização e infecções por MRSA em diferentes espécies animais têm sido cada vez mais relatadas. Alguns estudos descrevem a presença de MRSA em cães, gatos, cavalos (BUSSCHER *et al.*, 2006; WEESE *et al.*, 2006), vacas com mastite (JUHÁSZ-KASZANYITZKY *et al.*, 2007), suínos (SERGIO *et al.*, 2007; TAKEUTI *et al.*, 2016) e animais silvestres (WALTHER *et al.*, 2008). A Dinamarca, que monitora a prevalência de MRSA em suínos há mais de 10 anos, tem observado um aumento nas fazendas de produção participantes nas pesquisas de 2008, 2010 e 2014: 3,5% (n=7/198); 16,2% (n=16/99) e 67,6% (n=140/207), respectivamente (SIEBER *et al.*, 2018). Em vários países, MRSA tem sido isolado de suínos e sua caracterização molecular realizada (ARRIOLA *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2018). Dentre as linhagens de MRSA isoladas de animais, o ST398 (*sequence type 398*) tem sido associado a animais de pecuária (LA-MRSA do inglês *livestock-associated MRSA*), principalmente suínos (FITZGERALD, 2012). Esta também tem sido isolada de colonização e infecção em humanos, sendo primeiramente relatada entre criadores de suínos na Europa (ARMAND-LEFREVE *et al.*, 2005; VOSS *et al.*, 2005). A linhagem ST398 já foi isolada de suínos na América do Sul, com o primeiro relato no Peru (ARRIOLA *et al.*, 2011). No Brasil, há apenas um relato de MRSA ST398 em um suíno com piодermatite, a qual apresentava também susceptibilidade reduzida à vancomicina (VISA, do inglês *vancomycin-intermediate S. aureus*) (MORENO *et*

al., 2016). O isolamento do ST398 já foi relatado em bovino (SILVA *et al.*, 2014) e humano (NETO *et al.*, 2017) em nosso país.

Com o aumento no número de relatos de isolamento de bactérias multirresistentes de animais e ambiente (FISCHER *et al.*, 2012; PENNA *et al.*, 2013), o controle da resistência aos antimicrobianos requer estratégias de atuação também na área de saúde animal e de ambiente. Em nosso país, a maioria dos estudos sobre resistência bacteriana em amostras isoladas de suínos tem investigado bactérias Gram-negativas. Portanto, pouco ainda se conhece sobre a ocorrência de cepas de *S. aureus* multirresistentes e seu repertório de genes de resistência. Estes animais podem exercer um importante papel não só como fontes de genes de resistência, mas também como fontes de infecção de bactérias resistentes, principalmente para pessoas que tem contato com estes animais. O conhecimento das linhagens genéticas de amostras multirresistentes circulantes nas granjas nos animais e nos contatos humanos é importante para avaliar o potencial zoonótico destas. Uma vez que o Brasil é grande produtor e exportador de carne suína, estudos nesta linha são fundamentais para a segurança alimentar, visando minimizar possíveis impactos na saúde pública e na economia com embargos sanitários.

1.3 *Uso de antimicrobianos na suinocultura*

A produção de suínos varia desde criações de subsistência familiar com poucos animais até sistemas intensivos com densidades elevadas de animais. Principalmente na suinocultura industrial, há uma incessante busca por tecnologias que viabilizem o aumento nos índices produtivos que culminaram em mudanças marcantes mundialmente. Os índices hoje alcançados são resultado de melhoramento genético e investimentos em nutrição e sanidade animal (SOUZA *et al.*, 2011).

A suinocultura vem progressivamente se transformando, passando de sistemas extensivos para formas mais intensivas. A criação tradicional era considerada um ciclo completo onde todas as fases eram alojadas em um sítio único. Atualmente, evidencia-se uma mudança para sistemas complexos de vários sítios ou, até mesmo, para sistemas mais sofisticados como intensivos e de alta tecnologia, onde entende-se por sistema intensivo a criação de suínos onde estes são mantidos em confinamento, sendo ofertada ração balanceada de concentrados de alto nível proteico com o objetivo de aumentar o desempenho dos animais com maior eficiência (CARVALHO *et al.*, 2011).

No ciclo completo, os animais tinham contato com todos os microrganismos do ambiente e desenvolviam uma imunidade de rebanho mais sólida e capaz de proteger todos os indivíduos. Sistemas modernos têm rebanhos muito grandes onde as granjas abrigam várias instalações, reduzindo

o contato entre animais e entre diferentes lotes. Vale destacar a adoção de programas de medicação, rígida sanitização e vazios sanitários entre os lotes, impedindo o contato de animais com a microbiota ambiental. Os animais foram assim sendo segregados e impossibilitados de terem contato simultâneo com todos os patógenos existentes no plantel. Com isso, desenvolveram diferentes graus de imunidade a microrganismos de diversas áreas das granjas, ou até mesmo de outras granjas (DEMORI *et al.*, 2012).

Uma consequência do confinamento intensivo foi a emergência de problemas sanitários e, com isso, a necessidade da adoção de medicações antimicrobianas preventivas ou terapêuticas como forma de reduzir a carga infecciosa nos animais e fornecer assim melhores condições para seu desenvolvimento. Existem quatro formas básicas de medicação adotada na suinocultura: melhoradores de desempenho, metafilática, profilática e terapêutica. A promoção de aditivos melhoradores de desempenho consiste em se utilizar baixas doses de princípios ativos antibacterianos, sendo antibióticos ou não. A maioria dos melhoradores atua em bactérias Gram-positivas reduzindo a ocorrência de infecções subclínicas. É uma prática proibida em muitos países, inclusive no Brasil, já que induz ao risco de resistência bacteriana, existindo uma grande preocupação com a possibilidade de infecção cruzada por tais bactérias resistentes em seres humanos. Existe ainda o potencial risco de resíduos desses antimicrobianos nos produtos de origem animal para consumo humano.

A aplicação metafilática envolve o tratamento medicamentoso de todos os animais doentes e de todos os outros animais da baía, assim que detectado os primeiros sinais clínicos. A base dessa terapêutica é a de que todos os animais desse lote apresentam chance similar de se infectar e adoecer por estarem alojados nas mesmas condições ambientais, de instalações, com alimentação similar e com condições fisiológicas, sanitárias e perfil imunitário semelhantes.

A medicação preventiva refere-se ao uso de antimicrobianos de uso profilático. A base é a de conhecer as doenças que potencialmente tenham chance significativa de afetar um lote de animais em determinada faixa etária e, de forma preventiva, medicar os animais com um produto ativo contra o agente, buscando evitar o surgimento dos sinais clínicos da infecção. No período do desmame, por exemplo, esta prática é muito utilizada já que há alta incidência de infecções por *Escherichia coli* em leitões de 25-30 dias. Há uma utilização denominada do tipo "pulso" em que antimicrobianos são aplicados nos primeiros dias após o alojamento de leitões nas recrias e terminações, uma vez que situações de estresse (transporte, adaptação de matrizes de reposição e cachaços), má qualidade de ração e mistura de animais podem acarretar redução das defesas orgânicas dos animais e predispor-los a infecção. Por fim o uso terapêutico que consiste em administrar uma medicação em

animais doentes. É uma das atribuições clássicas da medicina veterinária para evitar o sofrimento e garantir saúde e bem-estar animal (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

Há uma crescente preocupação do uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal, sobretudo aqueles usados como melhoradores de desempenho, também conhecidos como promotores de crescimento. Esta preocupação torna-se ainda maior quando o fármaco em questão tem seu uso também na medicina humana. Assim, aumenta-se o risco de seleção de bactérias resistentes e, como consequência, estes microrganismos podem ameaçar a saúde humana e animal.

Os principais antimicrobianos utilizados como aditivos e promotores de crescimento são flavomicina, bacitracina, tilosina, avilamicina, eramicina, colistina e lincomicina. Visando desenvolver e promover diretrizes para minimizar o impacto do uso desses antimicrobianos em animais produtores de alimentos e na disseminação de resistência antimicrobiana o MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária), através de uma Instrução Normativa (nº 1 de 13 Janeiro 2020) (<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=23/01/2020&jornal=515&pagina=6&totalArquivos=89>, acesso 02 novembro 2020), proibiu em todo território nacional a importação, fabricação, comercialização e uso de melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina.

A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores desafios para a saúde pública uma vez que causa impactos diretos na manutenção da saúde humana e animal. Na tentativa de sanar danos maiores proporcionados pelo impacto da resistência no país, foi elaborado um Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos do Brasil (PAN-BR) de acordo com os objetivos definidos pela aliança entre a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e apresentados no Plano de Ação Global sobre Resistência aos Antimicrobianos (<https://pesquisa.bvsalud.org/bvsmis/resource/pt/mis-40062>, acesso 7 agosto 2021). O objetivo geral dos planos de ação é garantir que se mantenha a capacidade de prevenir e tratar doenças infecciosas com medicamentos seguros e eficazes que sejam utilizados de forma responsável e acessível a todos que deles necessitem.

O PAN-BR traz a participação de vários setores como Ministério da Saúde (MS), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), MAPA, Ministério das Cidades (MCidades), Ministério da Educação e Cultura (MEC), Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Fundação Nacional de Saúde (Funasa), além do apoio do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e da Agência Nacional de Águas (ANA) (<https://pesquisa.bvsalud.org/bvsmis/resource/pt/mis-40062>, acesso 7 agosto 2021).

Para fortalecer as ações do PAN-BR, portarias governamentais são constituídas em áreas do MS (Cipan – Portaria no 2.775, de 22 de dezembro de 2016), Anvisa (CVSRM, Portaria nº 854, de 7 abril de 2016) e MAPA (CPRA – Portaria SDA no 45/2016). O PAN-BR tem vigência de cinco anos, de 2018 a 2022, onde será avaliado anualmente para sofrer ajustes caso seja necessário.

O PAN-BR consiste primeiramente na formação e capacitação de profissionais com a atuação em áreas de saúde, humana e ambiental, com a finalidade de aumentar o alerta sobre uso inadequado de antimicrobianos, preconização de normas de biossegurança, controle e monitoramento e promoção do uso racional de antimicrobianos no âmbito da saúde humana e animal (BRASIL, 2018).

Seguindo o PAN-BR, o MAPA implementou o Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária (PAN-BR AGRO) (<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro>, acesso 7 agosto 2021) com objetivo de avaliar riscos, tendências e padrões na ocorrência e disseminação da resistência aos antimicrobianos por meio do consumo de alimentos de origem animal produzidos no Brasil, bem como a obtenção de dados para análises de risco relevantes à saúde animal e humana. Os objetivos compreendem o fortalecimento do conhecimento e base científica através da vigilância e pesquisa, para a construção e o estabelecimento do Sistema Nacional de Vigilância e Monitoramento Integrado da Resistência. Além do desenvolvimento de um sistema de vigilância e monitoramento na agropecuária, há o projeto de implementação de um sistema de vigilância da resistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas de frangos de corte em granjas e indústrias e por fim a implementação de programas de vigilância de resistência em bactérias isoladas dos programas oficiais em produtos de outras espécies animais.

O programa conta com duas fases a serem executadas de forma distintas entre os anos 2019 e 2022. Na fase 1, o monitoramento está sendo realizado de forma passiva pelo MAPA. Já na fase 2, o programa será estendido para as cadeias produtivas a serem monitoradas, onde serão coletadas amostras específicas, como *swabs*, propés e fezes para avaliação de resistência. Ao final de ambas as fases, será realizada uma avaliação geral do programa e dos resultados obtidos, a fim de definir estratégias a serem implementadas nas próximas etapas, a partir de 2023 (BRASIL, 2019).

Mais estudos sobre resistência aos antimicrobianos em bactérias presentes em suinoculturas precisam ser realizados em nosso país, grande parte se concentra nos países Europeus (Itália, Alemanha, Dinamarca, Espanha, Bélgica...) e Asiáticos (China e Japão). Mais de dois mil artigos publicados sobre o tema no mundo nos últimos dez anos pouco menos de vinte foram realizados no

Brasil. Além disso, a grande maioria deles investigaram bactérias Gram negativas, sendo importante que mais estudos sejam realizados em bactérias Gram positivas (RABELLO *et al.*, 2020).

1.4 Resistência a outros antimicrobianos

Além da resistência aos beta-lactâmicos, *S. aureus* pode ser resistente a várias outras classes de antimicrobianos. A resistência a outras classes pode ocorrer por meio de mutações ou aquisição de diferentes determinantes genéticos de resistência. Os mecanismos conferidos por estes genes podem ser por: modificação ou inativação enzimática do antimicrobiano, aquisição de gene que codifica o alvo do antimicrobiano com menor afinidade, modificação do alvo do antimicrobiano (por mutações nos genes do alvo ou por genes que codificam enzimas que alteram o alvo), proteção do alvo do antimicrobiano ou efluxo. Para uma mesma classe de antimicrobianos, já foram descritos diferentes genes e mecanismos de resistência, podendo a mesma cepa bacteriana carrear vários deles. O espectro de resistência para antimicrobianos dentro de uma mesma classe varia de acordo com o gene. Alguns genes conferem resistência cruzada a diferentes classes de antimicrobianos, determinando fenótipos de resistência: LS_A (resistência a lincosamídeos, estreptograminas A), LS_{AP} (resistência a lincosamídeos, estreptograminas A e pleuromutilinas), MS_B (macrolídeos e estreptograminas B), Oph (oxazolidinona e fenicóis) e PhLOPSA (resistência a fenicóis, lincosamídeos, oxazolidinonas, pleuromutilinas e streptograminas A). A Tabela 1 exibe os principais mecanismos e genes de resistência aos antimicrobianos descritos para *S. aureus* (PANTOSTI *et al.*, 2007; JENSEN *et al.*, 2009; KADLEC *et al.*, 2010; FOSTER, 2017; KHOSRAVI, JENABI *et al.*, 2017).

Grande parte das cepas de MRSA carregam genes de resistência para várias outras classes de antimicrobianos, limitando ainda mais as opções de tratamento. Uma grande preocupação é com a emergência e disseminação da resistência para alguns antimicrobianos que ainda são opções de tratamento. Os glicopeptídeos, como a vancomicina, são fármacos importantes no tratamento de infecções causadas por MRSA. Embora pouco frequentes, cepas com reduzida susceptibilidade à vancomicina (VISA, do inglês *vancomycin-intermediate S. aureus*) e resistentes à vancomicina (VRSA, do inglês *vancomycin resistant Staphylococcus aureus*) trazem grande preocupação (SHARIATI, 2020). A resistência à vancomicina foi descoberta inicialmente em *Enterococcus* spp. no final da década de 1980. O mecanismo de resistência consistia na substituição da terminação D-alanina-D-alanina por D-alanina-D-lactato da cadeia peptídica da parede celular, codificada pelo gene *vanA*, sendo a primeira terminação o alvo do antimicrobiano (LECLERQ; COURVALIN, 1997). Em 1996, foi identificada a primeira cepa VISA (HIRAMATSU *et al.*, 1997), a qual não apresenta o

Tabela 1. Principais mecanismos e genes de resistência aos antimicrobianos descritos para *S. aureus*.

Classe	Antimicrobiano	Mecanismo de resistência	Genes de resistência
Aminoglicosídeo	Canamicina, estreptomina, gentamicina, neomicina, tobramicina ^a	Modificação enzimática do antimicrobiano (EMAs – enzimas modificadoras de aminoglicosídeos)	<i>ami(4')-Ia</i> , <i>aac(6')/aph(2'')</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aad</i>
Beta-lactâmico	Penicilina G, amoxicilina, ampicilina (e outras penicilinas lábeis)	Inativação enzimática do antimicrobiano (penicilinase)	<i>blaZ</i>
	Todos os beta-lactâmicos, exceto cefalosporinas de 5ª geração	Aquisição de gene do alvo modificado (PBP2a ou PBP2')	<i>mecA</i>
Streptogramina	Quinopristina, dalfopristina ^a	Modificação do alvo do antimicrobiano	<i>erm(C)</i> , <i>erm(T)</i> , <i>cfr</i>
		Proteção do alvo do antimicrobiano	<i>lsa</i> , <i>msr</i> , <i>oprA</i> , <i>sal</i> , <i>vga</i>
		Inativação ou modificação enzimática do antimicrobiano	<i>vat</i> , <i>vgb</i>
Lipopeptídeo	Daptomicina	Modificação do alvo do antimicrobiano	Mutações em <i>mrpF</i>
Fenicol	Cloranfenicol, Florfenicol	Modificação enzimática do antimicrobiano (CAT-cloranfenicol acetiltransferase)	<i>cat</i>
		Modificação do alvo do antimicrobiano	<i>cfr</i>
		Proteção do alvo do antimicrobiano	<i>oprA</i>

gene *vanA*. A susceptibilidade reduzida parece estar associada a mutações em diferentes genes. A parede celular de VISA é mais espessa que o habitual, contendo peptídeos capazes de se ligar à vancomicina impedindo sua ação (HANAKI *et al*, 1998; CUI *et al*, 2003). A primeira cepa de VRSA, com resistência plena à vancomicina, possui o gene *vanA* e foi identificado nos EUA em 2002 (CHANG *et al*, 2003). Acredita-se que ocorreu transferência de um plasmídeo contendo o transposon que carrega o gene *vanA* de um *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE, do inglês *vancomycin-resistant Enterococci*) para uma cepa de MRSA (SEVERIN *et al*, 2004). Outras opções para tratamento de cepas MRSA são as oxazolidinonas, lipopeptídeos, tigeciclina e cefalosporinas de 5ª geração, sendo a resistência ainda pouco frequente ou rara (BATISTA *et al*, 2015).

Classe	Antimicrobiano	Mecanismo de resistência	Genes de resistência
		Efluxo	<i>fexA</i>
Glicopeptídeo	Vancomicina, teicoplanina	Modificação do alvo do antimicrobiano	<i>vanA</i>
Lincosamídeo	Clindamicina, lincomicina	Modificação do alvo do antimicrobiano	<i>erm(A), erm(B), erm(C), erm(T)</i>
		Proteção do alvo do antimicrobiano	<i>lsa, sal, vga</i>
Macrolídeo ^a	Eritromicina, azitromicina, claritromicina, tilosina ^a	Modificação do alvo do antimicrobiano	<i>erm(A), erm(B), erm(C), erm(T)</i>
		Proteção do alvo do antimicrobiano	<i>msr</i>
Oxazolidinona	Linezolida	Modificação do alvo do antimicrobiano	<i>cfr</i>
Pleuromutilina	Tiamulina	Modificação do alvo do antimicrobiano	<i>cfr</i>
		Proteção do alvo do antimicrobiano	<i>lsa, sal</i>
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina, norfloxacina ^a	Modificação do alvo do antimicrobiano	Mutações em <i>gyrB</i> e <i>gylA</i>
Sulfonamida	Sulfametoxazole	Modificação do alvo do antimicrobiano	Mutação em <i>dhps</i>
Tetraciclina	Tetraciclina	Efluxo	<i>tet(K), tet(L)</i>
	Tetraciclina, aminociclina	Proteção ribossomal	<i>tet(M)</i>

Classe	Antimicrobiano	Mecanismo de resistência	Genes de resistência
Trimetoprim	Trimetoprim	Aquisição de gene do alvo modificado (não susceptível) ou mutações	<i>dhfr-A, dhfr-B, dhfr-K, dhfr-G</i>

^a A resistência para cada antimicrobiano da mesma classe depende do gene de resistência.

II. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Caracterizar geneticamente e investigar o potencial zoonótico de *S. aureus* multirresistentes isolados de suinoculturas do Rio de Janeiro.

2.2 *Objetivos Específicos*

1. Investigar a ocorrência de suínos e de seus contatos humanos colonizados por *S. aureus* e suas cepas multirresistentes, incluindo MRSA, em granjas do Estado do Rio de Janeiro.

2. Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos das amostras de *S. aureus* isoladas de suínos e dos seus contatos humanos.

3. Identificar as linhagens genéticas de MRSA circulantes em granjas do Rio de Janeiro.

4. Determinar o repertório de genes de resistência aos antimicrobianos de cepas de MRSA.

5. Identificar o potencial zoonótico de *S. aureus* pelo compartilhamento de linhagens genéticas entre suínos e seus contatos humanos.

6. Identificar potenciais fatores associados à colonização de suínos e de seus contatos humanos por amostras de *S. aureus* multirresistentes.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Desenho do estudo*

O estudo se propôs investigar a ocorrência de colonização de suínos e de seus contatos humanos (funcionários: administradores, tratadores e veterinários) por cepas de *S. aureus* multirresistentes, incluindo MRSA, em granjas no estado do Rio de Janeiro. Para isto, foi realizada coleta de secreções nasais de suínos e seus contatos humanos em granjas distribuídas no estado. As amostras foram isoladas, identificadas e analisadas quanto aos perfis de resistência. As cepas MRSA foram submetidas à tipificação do SCC*mec* e pesquisa de PVL por meio de PCR. Tais resultados, junto com o perfil de resistência e local de coleta, foram critérios para a realização do sequenciamento do genoma completo (SGC). Pelo SGC foi realizada determinação de linhagens e análise dos repertórios genéticos de resistência. Cepas multirresistentes isoladas de suínos e humanos com o mesmo perfil fenotípico de resistência, na mesma granja, foram selecionadas para avaliação do potencial zoonótico por meio da verificação do compartilhamento de linhagens genéticas. Por fim foi realizada análise de questionários demográficos para determinar possíveis associações com a colonização de cepas multirresistentes. Na figura 1 os passos do estudo estão referenciados.

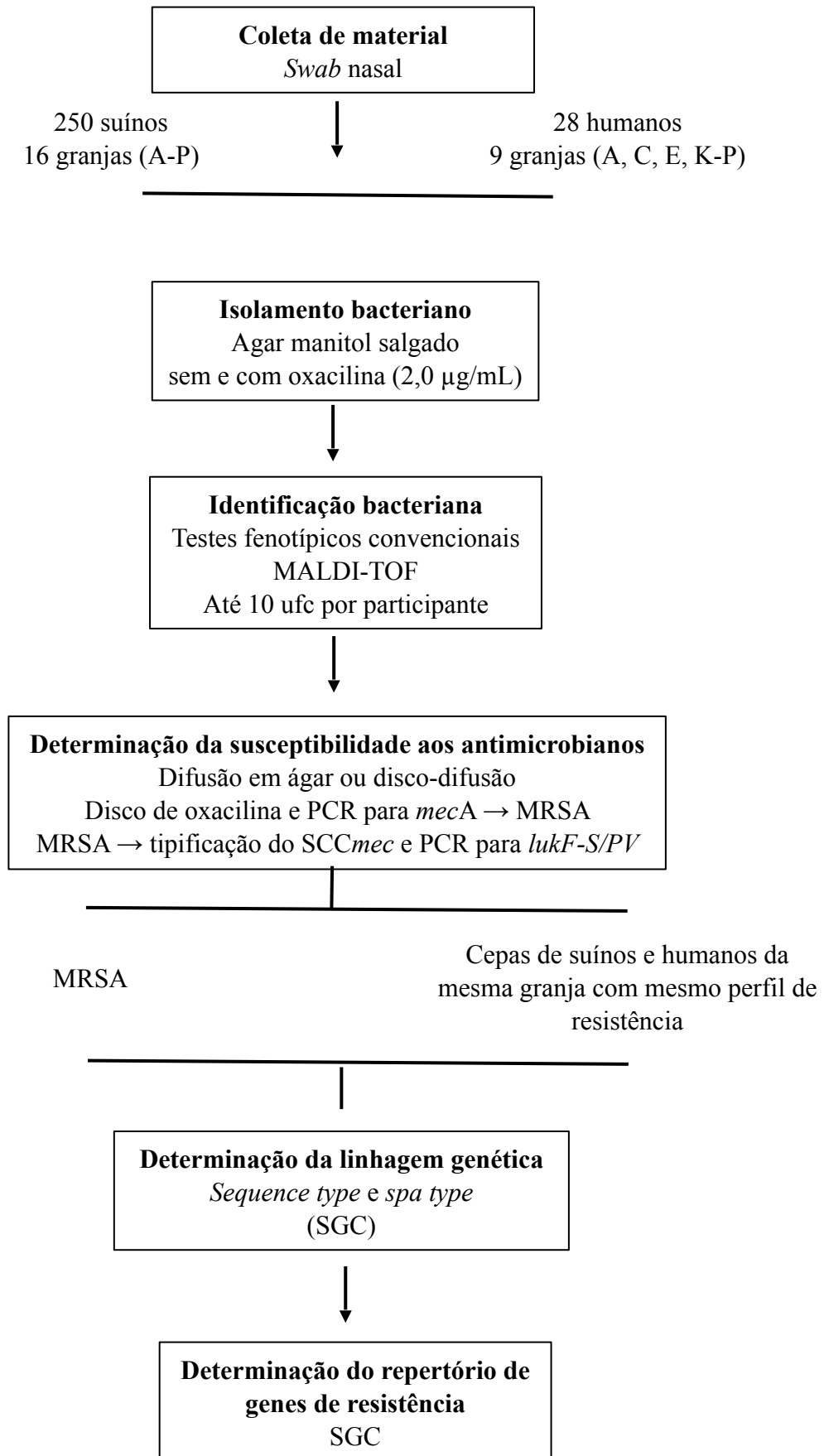


Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas no estudo.

3.2 *Origem e coleta das amostras*

A coleta de swabs nasais foi realizada em 16 suinoculturas distribuídas pelo estado do Rio de Janeiro, compreendendo os municípios de Rio Claro (Granjas A e B), Angra dos Reis (Granja C), Barra Mansa (Granja D), Pinheiral (Granja E), Cantagalo (Granja F), Cachoeiras de Macacu (Granjas G e O), Campos dos Goytacazes (Granja H), São Francisco de Itabapoana (Granja I), Itaperuna (Granja J), Seropédica (Granja K), Petrópolis (Granja L), Tanguá (Granja M), Friburgo (Granja N) e Nova Iguaçu (Granja P). Um total de 250 suínos e 28 contatos humanos (produtores e funcionários da granja, como administradores, tratadores e veterinários). A coleta foi realizada entre dezembro de 2014 a novembro de 2019.

As amostras de secreção nasal coletadas com auxílio de *swab*, foram transportadas em meio de Stuart (Citotest Labware Manufacturing CO, Haimen Town, Jiangsu – China) até o laboratório e mantidas refrigeradas para processamento em até 48h. Apenas uma coleta foi realizada de cada suíno em ambas as fossas nasais e o mesmo procedimento foi obtido com seus contatos humanos.

Os contatos humanos responderam um questionário sobre dados demográficos, manejo e potenciais riscos para a colonização por cepas multirresistentes (Anexo 1).

3.3 *Considerações éticas*

O projeto foi realizado mediante Comitê de Ética no Uso de Animais da UFF (CEUA- Protocolo 503) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFF (Parecer 828.004). Todos os humanos voluntários foram informados sobre o estudo e assinaram termos de consentimento para a coleta de amostras.

3.4 *Isolamento e identificação bacteriana*

Para o isolamento bacteriano, as amostras obtidas por meio de *swab* nasal foram semeadas em meio de cultura ágar Manitol Salgado (AMS; BD, Sparks, MD, EUA). Primeiro, o *swab* foi semeado em meio AMS sem oxacilina e em seguida, em meio AMS contendo 2 µg/mL de oxacilina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (AQUINO *et al.*, 2012). O meio contendo o antimicrobiano foi utilizado para selecionar amostras de MRSA. As culturas foram incubadas à 37°C por até 48 h em aerobiose. De cada meio, foram selecionadas até cinco colônias fermentadoras de manitol, as que apre-

sentavam aspecto arredondado, branco-amarelado, para a identificação bacteriana. As colônias de cocos Gram-positivos e produtoras de catalase foram submetidas à identificação pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*), no equipamento Microflex LT (Bruker Daltonik, Bremen, Fahrenheitstraße, Germany), no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A partir do crescimento bacteriano em meio *Trypticase soy agar* (TSA, BD) à 37°C por 24 h, em aerobiose, uma pequena quantidade de cada amostra foi aplicada em uma placa metálica em duplicata. Em cada amostra, foi adicionado 1 µL de ácido fórmico 70% e de 1 µL uma matriz composta por ácido α -ciano-hidroxicinâmico (10mg/mL). Após a secagem da matriz, a placa foi colocada no equipamento para análise com auxílio do software FlexControl 3.1 (Bruker Daltonik). Uma cepa de *Escherichia coli* foi utilizada como controle da análise. Os resultados obtidos por MALDI-TOF foram considerados como a identificação conclusiva da espécie das bacteriana, considerando escores > 2000.

As amostras bacterianas identificadas como *S. aureus* foram estocadas em leite desnatado com glicerol a 10% a – 20° C para a realização das etapas seguintes.

3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

3.5.1. Teste de disco-difusão ou difusão em ágar

Todas as amostras identificadas como *S. aureus* por animal e humano foram analisadas. A determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão, seguindo os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019).

A partir do crescimento bacteriano em meio TSA, foi realizada uma suspensão bacteriana em solução salina 0,85% estéril, na turvação 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, com o auxílio de um *swab* estéril, a suspensão foi semeada em ágar Mueller Hinton (BD) por espalhamento em três direções. Discos de antimicrobianos foram depositados sobre o ágar e as placas incubadas a 35-37°C. Os antimicrobianos testados foram: cefoxitina (30µg), ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10 µg), linezolidina (30 µg), oxacilina (1µg), penicilina (10U), rifampicina (5µg), sulfametoxazole + trimetoprim (1,25/23,75 µg) e tetraciclina (30 µg) (Cecon, São Paulo, SP, Brasil). Também foi investigada a resistência induzida à clindamicina ao posicionar os discos de clindamicina e eritromicina a 15 a 26 mm de distância. A observação da redução do halo de inibição do crescimento ao redor do disco de clindamicina, na

área entre os dois discos, indica resistência induzida. A cepa de *Staphylococcus* ATCC 25923 foi utilizada como controle. Após 24 h de incubação, o diâmetro dos halos de inibição do crescimento ao redor dos discos foi medido e interpretado como sensível, intermediário ou resistente. As cepas resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos e as cepas de MRSA são classificadas como multirresistentes (MAGIORAKOS *et al.*, 2011).

3.6 Caracterização genética de cepas de MRSA

Todas as amostras de *S. aureus* foram submetidas à detecção do gene *mecA*, sendo o tipo de SCC*mec* determinado para as amostras de MRSA (ZHANG *et al.*, 2005). Das quatro amostras de MRSA identificadas, duas apresentaram perfil fenotípico de resistência semelhante (divergindo apenas para um antimicrobiano), as mesmas características moleculares (tipo de SCC*mec* e ausência de genes para PVL) e foram isoladas de suínos da mesma granja. Em virtude disto, foram consideradas a mesma cepa, transmitida entre os animais, e apenas uma foi selecionada para o SGC. Uma amostra de *S. aureus* multirresistente, mas não MRSA, foi selecionada também para o SGC. A partir do SGC, foram identificados o tipo de *spa*, o *sequence type* (ST), a presença dos genes para PVL e de genes de resistência aos antimicrobianos carregados pelas amostras. Para a amostra de MRSA que não foi submetida ao SGC, a detecção de PVL foi pelo método de PCR (von Eiff *et al.*, 2004). A identificação do ST pelo método de MLST (ENRIGHT *et al.*, 2000) foi realizada para uma amostra de *S. aureus* multirresistente, mas não MRSA isolada de humano da mesma granja em que foi isolada a amostra de suíno. As amostras de *S. aureus* isoladas de suínos e humanos da mesma granja foram analisadas para avaliação do potencial zoonótico.

3.6.1 Obtenção de DNA

Para a obtenção de DNA, foi utilizada a técnica de lise térmica, segundo Pacheco e colaboradores (1997) com modificações. As amostras foram semeadas em meio TSA e incubadas a 37°C em aerobiose durante 24 horas. A partir deste crescimento, foi preparada uma suspensão em 2,0 mL de tampão TE [(Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0)]. Uma alíquota da suspensão foi diluída dez vezes em água destilada para determinação da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 600 nm. Um volume de 200 µL da suspensão diluída foi centrifugada a 12.000 x g por 1 min. Após o descarte do sobrenadante, 200 µL de tampão TE foram adicionados ao sedimento e esta nova suspensão submetida a fervura por 10 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a

12.000xg por 1 minuto e o sobrenadante, que contém o DNA liberado, foi separado e congelado para ser utilizado como fonte de DNA nas reações de amplificação.

3.6.2 Detecção do gene *mecA* e determinação do tipo de *SCCmec*

A detecção do gene *mecA* e a identificação do tipo de *SCCmec* foram realizadas por PCR com reações de 25 µl contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, diferentes concentrações dos iniciadores (tipos e subtipos I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, and V), (Tabela 2) 1 U de *Taq* DNA polimerase e e 2 µl da amostra de DNA. O ciclo de amplificação teve uma etapa de desnaturação inicial de 15 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 68°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; 20 ciclos de anelamento a 95°C por 1 minuto, 64°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto; seguidos por um passo de extensão final de 72°C por 10 minutos. Esta mistura foi colocada no termociclador PTC-100® (Bio-Rad) e os produtos das reações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 0,5X a 110 V. Utilizou-se o peso molecular padrão de 100 pb como marcador de tamanho de DNA. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL e a imagem captada pelo fotodocumentador L-PIX e software L-PIX Image EX (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). A cepa de *S. aureus* GV69 foi utilizada como controle positivo.

Tabela 2. Sequência e concentração de iniciadores utilizados para detecção de *mecA* e identificação do tipo de SCC*mec*, além do tamanho dos produtos esperados.

Tipo/Gene	Sequência de iniciadores (5'→3')	Concentração (nM)	Tamanho (pb)
I	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	0,048	613
II	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	32	398
III	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	40	280
IVa	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	104	776
IVb	TCTGGAATTACTIONCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	92	493
IVc	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	78	200
IVd	CTCAAATAACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	280	881
V	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	0,06	325
<i>mecA</i>	GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T	0,046	147

3.6.3 Detecção dos determinantes genéticos da PVL por PCR

Para detecção dos genes *lukF-PV* e *lukS-PV*, foi realizada com reações de 25 µL contendo 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 500 nM de cada iniciador, 0,5U de Taq DNA polimerase e 2 µL da amostra de DNA. Os iniciadores utilizados foram: 5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTG-GACATGATCCA-3' e 5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC-3', a amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 2 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma etapa de extensão final de 72°C por 10 min. A cepa de *S. aureus* 069 foi utilizada como controle positivo. O tamanho esperado do produto da amplificação era 433 pb. Os produtos das reações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 0,5X a 110 V. O peso molecular padrão de 100 pb foi utilizado como marcador de tamanho de DNA. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL e a imagem captada pelo fotodocumentador L-PIX e software L-PIX Image EX.

3.6.4 Multilocus sequence typing (MLST)

Inicialmente, foi realizada a PCR simples para fragmentos dos genes *arcA*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL* (ENRIGHT *et al.*, 2000). A reação consistiu de um volume final de 50 µL contendo 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de dNTP, 200 nM de dos respectivos iniciadores, 1U de Taq DNA polimerase e 2 µL da amostra de DNA. O ciclo de amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma etapa de extensão final de 72°C por 2 min. A visualização dos produtos foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X a 100 V. Um marcador padrão de 100 pb foi utilizado para estimar o tamanho dos produtos obtidos. A solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL foi utilizada para corar os géis, os quais foram visualizados no fotodocumentador L-PIX e software L-PIX Image. A quantificação de DNA foi realizada no Nanodrop ND2000 (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA). Os produtos da amplificação foram purificados pelo QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Valencia, California, USA) e o sequenciamento do DNA, pela metodologia de Sanger, foi realizado na BPI BIOTECNOLOGIA EPP (Botucatu, São Paulo). A análise das sequências dos genes foi realizada no programa BioEdit e a identificação do ST no banco de dados do PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>).

3.7 Sequenciamento do genoma completo (SGC)

O sequenciamento do genoma completo foi realizado para quatro amostras de *S. aureus*: amostra um (MDR/MRSA, suíno), amostra dois (MDR, suíno), amostra três (MDR/MRSA, suíno) e amostra quatro (MDR/MRSA, humano). A partir dos dados gerados, foram identificados os tipos de *spa type* (*spa typing*), ST (MLST), tipo de *SCCmec*, além de analisados os repertórios de determinantes genéticos de resistência aos agentes antimicrobianos. As amostras SN182b e HSN18a foram isoladas de suíno e funcionário, respectivamente, da mesma granja, sendo selecionadas para avaliação do potencial zoonótico

As culturas das amostras bacterianas (Tabela 3) foram enviadas para BPI BIOTECNOLOGIA EPP para SGC. Na Tabela 3, encontra-se informação sobre os kits utilizados pela empresa. Foi realizada a plataforma de sequenciamento de nova geração Illumina MiniSeq com uma unidade MiniSeq MID Output 300, com 8 milhões de número médio de leituras totais e tamanho médio do fragmento de 2 x 150 pb. A montagem do genoma foi realizada com auxílio do software A5-miseq versão 20160825. A partir dos dados gerados, foram identificados os tipos de *spa* (“*spa typing*”), ST, tipo de *SCCmec*, genes da PVL e de resistência aos antimicrobianos.

Tabela 3. Kits utilizados nas etapas antecedentes ao sequenciamento do genoma completo.

Procedimento	Kit
Quantificação do material extraído	Qubit® dsDNA BR Assay Kit
Preparação de Bibliotecas	Nextera® XT
Purificação da PCR com beads magnéticas	AMPure® XP
Quantificação da PCR purificada em PCR quantitativo	KAPA® Fast Universal

Para a identificação do tipo *spa* e do tipo de *SCCmec* foram utilizados as ferramentas *spaTyper 1.0* e *SCCmecFinder1.2*, respectivamente, disponíveis no *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org/>; acesso 21 julho 2021). A identificação do ST foi realizada no site do *PubMLST* (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>). Para identificação do repertório de determinantes genéticos de resistência aos agentes antimicrobianos e da presença dos genes *lukSF/PV* foram utilizadas as ferramentas *ResFinder 4.1*, *Mobile ElementFinder* e *Virulence-*

Finder 2.0, todos disponíveis também no Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomic-epidemiology.org/>; acesso 20 julho 2021).

3.8 *Análise estatística*

As possíveis associações de fatores associados à colonização de suínos e seres humanos por amostras multirresistentes de *S. aureus*, respectivamente, foram avaliadas pelo teste exato de Fisher bicaudal, utilizando o programa EpiInfo versão 3.3.2 (CDC, www.cdc.gov/epiinfo/about.htm; acesso 12 julho 2021). Foram consideradas significativas diferenças com valor de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 *Colonização de suínos e contatos humanos por Staphylococcus aureus*

Um total de 943 colônias, isoladas dos meios com oxacilina (identificadas através da inclusão de um asterisco ao número da amostra) e sem oxacilina (identificadas com a ausência do asterisco), foram selecionadas para identificação. Dentre estas, 25 e 18 colônias isoladas de suínos e humanos, respectivamente, foram identificadas como *S. aureus*. As amostras de *S. aureus* oriundas de mais de uma colônia por suíno ou humano foram consideradas para a determinação fenotípica dos perfis de resistência aos antimicrobianos devido a possibilidade de colonização por mais de uma amostra. Entretanto, após tal análise, aquelas com o mesmo perfil de resistência isoladas do mesmo participante foram consideradas a mesma amostra. As amostras de *S. aureus* foram isoladas de 15 (6,0%) dos 250 suínos investigados, sendo todas isoladas do meio ágar manitol salgado sem oxacilina. Entre humanos, as amostras de *S. aureus* foram isoladas de 24,1% (n=7) dos 29 participantes, sendo apenas uma amostra bacteriana recuperada em meio com oxacilina. Suínos e humanos colonizados foram identificados em 56,3% (n=9/16) e 44,4% (n=4/9) das granjas investigadas, respectivamente. Em três granjas (K, L e N), a colonização por *S. aureus* foi observada tanto em suínos quanto em funcionários (Tabela 4).

Tabela 4. Número de investigados, número de colonizados por *S. aureus* e número de amostras de *S. aureus* isoladas de suínos e humanos de granjas localizadas no estado do Rio de Janeiro.

Granja	Município	Coleta	Suínos			Contatos humanos		
			Investigados (n)	Colonizados (n)	Amostras (n)	Investigados (n)	Colonizados (n)	Amostras (n)
A	RC	01/14	10	2	4	1	0	0
B	RC	01/14	10	2	2	0	0	0
C	AR	01/14	10	0	0	1	0	0
D	BM	01/14	10	0	0	0	0	0
E	PN	01/14	10	2	5	0	0	0
		11/16	20	1	3	2	0	0
F	CT	01/14	12	0	0	0	0	0
G	CM	01/14	7	1	1	0	0	0
H	CP	01/14	10	0	0	0	0	0
I	SFI	01/14	16	0	0	0	0	0
J	IP	01/14	5	0	0	0	0	0
K	SP	12/15	21	1	1	5	2	9
L	PT	11/16	20	4	5	4	1	3
M	TG	05/19	10	1	2	1	0	0
N	NF	06/19	25	1	2	5	3	3
O	CM	08/19	23	0	0	6	1	3
P	NI	11/19	31	0	0	4	0	0
Total			250	15	25	29	7	18

AR: Angra dos Reis; BM: Barra Mansa; CM: Cachoeiras de Macacú; CP: Campos; CT: Cantagalo; IP: Itaperuna; NF: Nova Friburgo; NI: Nova Iguaçu; PT: Petrópolis; PN: Pinheiral; RC: Rio Claro; SFI: São Francisco de Itabapoana; SP: Seropédica; TG: Tanguá.

4.2 Determinação dos perfis de resistência aos antimicrobianos

Para a maioria dos animais (n=4/6) e humanos (n=3/4) em que mais de uma amostra de *S. aureus* foi analisada pelo método de disco-difusão, os perfis de resistência foram idênticos por participante, não identificando colonização por mais de uma amostra. Apenas para dois suínos e um humano, duas amostras de *S. aureus* de diferentes perfis de resistência foram isoladas de cada um.

Com relação à colonização por MRSA, apenas dois suínos (SN51b e SN52b; granja E) foram identificados pelo método fenotípico como colonizados, representando 0,8% (n=2/250) dos animais investigados e 13,3% (n=2/15) dos colonizados por *S. aureus*. Entretanto, o gene *mecA* foi

identificado de cepas susceptíveis pelo disco de cefoxitina de outro suíno (SN182b) e de um funcionário (HSN18a) de uma mesma suinocultura (granja N). Portanto, foram identificados no total de três suínos (n=3/250, 1,2% dos investigados; n=3/15, 20% dos colonizados por *S. aureus*) e um contato humano (n=1/29, 3,5% dos investigados; n=1/7, 14,3% dos colonizados por *S. aureus*).

Ainda em relação aos suínos, 86,6% (n=13/15) estavam colonizados por amostras de *S. aureus* resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Da mesma forma, quase todos os voluntários humanos (n=6/7; 85,7%) estavam colonizados por cepas resistentes a algum dos antimicrobianos testados. A maioria dos suínos (53,3%) estava colonizada por amostras resistentes à clindamicina, eritromicina e cloranfenicol, apresentando também um significativo percentual de colonização (46,6%) por cepas resistentes à penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina. Entre humanos, a maioria estava colonizada por cepas resistentes à penicilina (85,7%), clindamicina (71,4%), tetraciclina (71,4%) e eritromicina (57,1%). Não foram isoladas amostras resistentes à linezolida e rifampicina em nenhum dos hospedeiros. Também não foram identificadas amostras resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim e oxacilina entre as isoladas de humanos (Figura 2). A resistência induzida à clindamicina foi detectada apenas entre as amostras resistentes à eritromicina isoladas de humanos (n=2/5).

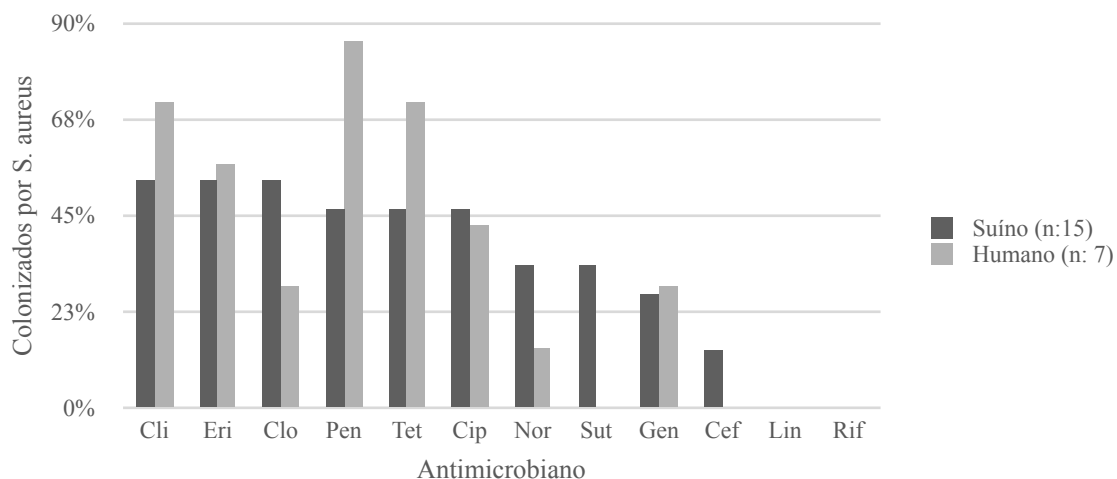


Figura 2. Percentual de suínos e humanos colonizados por amostras de *S. aureus* resistentes aos diferentes antimicrobianos no Rio de Janeiro (2014-2019).

Cef: cefoxitina, Cip: ciprofloxacina, Cli: clindamicina, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Gen: gentamicina, Lin: linezolida, Nor: norfloxacina, Pen: penicilina, Rif: rifampicina, Tet: tetraciclina, Sut: sulfametoxazol-trimetoprim;

Foi observado um alto percentual de amostras multiresistentes tanto dentre suínos (n= 9/15; 60%) quanto dentre humanos (n=5/7; 71,4%) que eram colonizados por *S. aureus*. Essas amostras

foram isoladas de cinco (B, E, K, L e N) e quatro (K, L, N e O) granjas respectivamente. Entretanto esses valores correspondem a 9,5% (n=9/250) das cepas isolada de suínos e 17,3% (n=5/29) dos humanos. As amostras multirresistentes isoladas de suínos e humanos apresentaram resistência a até sete classes de antimicrobianos (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição de amostras de *S. aureus* multirresistentes isoladas de suínos e contatos humanos em granjas localizadas no estado do Rio de Janeiro (2014-2019).

Amostra	Granja	Coleta	Hospedeiro	Perfil de resistência
SN15b	B	2014	Suíno	Cip, Cli, Clo, Eri, Pen, Tet
SN51b-e*	E	2014	Suíno	Cef, Cip, Cli, Eri, Nor, Pen, Sut, Tet
SN52b*	E	2014	Suíno	Cef, Cip, Cli, Eri, Nor, Pen, Tet
SN105b	K	2015	Suíno	Cip, Cli, Clo ^{b(I)} , Eri, Nor, Pen, Sut ^{b(I)} , Tet
HSN10a-d	K	2015	Humano	Cli ^{b(i)} , Eri, Pen, Tet
SN128d	L	2016	Suíno	Cip, Cli, Clo ^{b(I)} , Eri, Gen, Nor, Pen, Tet
SN143e	L	2016	Suíno	Cip, Cli, Clo ^{b(I)} Eri, Gen, Nor, Pen, Sut, Tet
SN144g	L	2016	Suíno	Cip ^{b(I)} , Cli, Clo ^{b(I)} Eri, Pen, Tet
SN145b	L	2016	Suíno	Cip, Cli, Clo, Eri, Gen, Nor, Pen, Tet
SN145c	L	2016	Suíno	Cli, Clo, Eri, Sut, Pen, Tet
HSN12a	L	2016	Humano	Cip, Cli, Clo, Eri, Nor, Pen, Tet
HSN12b	L	2016	Humano	Cip, Cli, Clo, Eri, Gen, Nor, Pen, Tet
HSN12c	L	2016	Humano	Cip, Cli, Clo ^{b(I)} Eri, Nor, Pen, Tet,
SN182a	N	2019	Suíno	Cip, Cli, Clo, Tet
SN182b**	N	2019	Suíno	Cip, Cli, Clo, Eri, Pen, Tet
HSN16b	N	2019	Humano	Cip, Cli, Pen, Tet
HSN18a**	N	2019	Humano	Cip, Cli, Clo, Eri, Pen, Tet
HSN21a-c	O	2019	Humano	Cli ^{b(i)} , Eri, Gen, Pen

^a Nomenclatura das amostras: SN - amostra de mucosa nasal de suíno, HSN - amostra de mucosa nasal de contato humano de suíno, número - identificação do participante, letra minúscula - identificação das amostras do participante, uma vez que foram selecionadas mais de uma colônia no isolamento bacteriano; ^{b(I)}: intermediária, (i): resistência induzida; ^cCef: cefoxitina, Cip: ciprofloxacina, Cli: clindamicina, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Gen: gentamicina, Nor norfloxacina, Pen: penicilina, Tet: tetraciclina, Sut: sulfametoxazol-trimetoprim; MRSA: amostras resistentes à meticilina detectadas por disco de cefoxitina (*) ou apenas por detecção de *mecA* (**). Em negrito, os perfis de resistência iguais observados em amostras de suínos e humanos da mesma granja. O sombreado alternado na cor cinza separa as amostras isoladas de cada granja.

Suínos colonizados por MRSA foram detectados em duas granjas (E e N), e em uma delas (N) também de funcionário. Entretanto, na granja E não foram coletados *swabs* nasais de contatos humanos na coleta realizada em 2014, quando foram isoladas as cepas de MRSA. No momento desta coleta, não encontrava-se no local funcionários que trabalhassem diretamente com os animais. Em uma nova coleta em 2016, foi coletado material tanto de suínos quanto de funcionários, porém não foi isolado MRSA de nenhum dos participantes.

Além da granja N, a colonização por *S. aureus* tanto em suínos quanto em funcionários foi observada nas granjas K e L. Amostras multirresistentes com perfis idênticos ou semelhantes (divergindo de uma a duas classes de antimicrobianos) foram observadas nas granjas L e N (Tabela 5). Nas granjas K e N, também foram isoladas amostras que não apresentam multirresistência (K: resistência à penicilina e tetraciclina; N: susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados).

4.3. Determinação de linhagens de cepas de MRSA e outras multirresistentes

Para a maioria das amostras, a caracterização das linhagens genéticas foi realizada pelo SGC (Tabela 6). Dentre as cinco amostras analisadas (tabela 7), todas foram identificadas como ST398 sendo três MRSA. Uma das quatro amostras de MRSA (SN52b) não foi submetida a análise do ST, pois apresentou as mesmas características fenotípicas, genotípicas e local/data de isolamento da SN51b. Portanto, não foi selecionada para a análise por ser provavelmente a mesma cepa. Quanto ao tipo de *spa*, duas amostras de suínos (SN51b, SN182b) e uma de humano (HSN18a) foram classificadas como t011 enquanto uma de suíno (SN145b) como t01451. Em todas as amostras de MRSA foi identificado o SCC*mec* do tipo V. O tipo SCC*mec* V foi confirmado nas três amostras de MRSA que foram submetidas ao sequenciamento do genoma completo, sendo todas preditas como tipo V (5C2&5) (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements -IWG-SCC). Entretanto, não houve identidade genética de 100% com as sequências do banco de dados do SCC*mec*Finder (SN51b: 96,70%; SN182b: 95,09% e HSN18a: 96,06%). Não foram detectados os genes da PVL em nenhuma das amostras analisadas. As amostras SN182b e HSN18a isoladas de suíno e humano da granja N, respectivamente, apresentaram os mesmos ST, *spa type* e tipo de SCC*mec* (Tabela 7). Além disto, os genes *mecA* carregados por estas cepas apresentaram identidade de 99,9% com a sequência do número de acesso NC_007168 (Tabela 8).

Tabela 6. Metodologias utilizadas na caracterização genotípica de amostras multirresistentes de *S. aureus* isoladas de suínos e contatos humanos de granjas do Estado do Rio de Janeiro.

Amostra	Granja	Perfil de resistência ^a	PCR ^b			MLST ^c	SGC ^d
			<i>mecA</i>	<i>SCCmec</i>	<i>lukSF/PV</i>		
SN51b	E	MRSA/MDR	+	+	+		+
SN52b	E	MRSA/MDR	+	+	+		
SN182b	N	MRSA/MDR	+	+			+
HSN18a	N	MRSA/MDR	+	+			+
SN145b	K	MDR	+	+			+
HSN12b	K	MDR	+	+		+	

^aMRSA/MDR: cepa multirresistente *mecA* + (MDR: multidroga resistente), MDR: cepa multirresistente *mecA* -; ^b*mecA*: gene de resistência à meticilina (presente em MRSA), *SCCmec*: determinação do tipo, *lukSF/PV*: genes da PVL (Panton Valentine leucocidina), +: análise realizada; ^cDeterminação do “sequence type” (ST) por sequenciamento Sanger; ^dSGC: sequenciamento do genoma completo (investigação do tipo *SCCmec*, tipo *spa*, ST, genes da PVL e de resistência aos antimicrobianos).

Tabela 7. Genotipificação e distribuição de determinantes genéticos de resistência entre as amostras de *S. aureus* selecionados para análise por SGC.

	SN51b	SN145b	SN182b	HSN18a
Origem	Suíno	Suíno	Suíno	Humano
Propriedade	E	K	N	N
Genotipificação				
ST	398	398	398	398
<i>spa</i> type	t011	t01451	t011	t011
SCC <i>mec</i>	V(5C2&5)		V(5C2&5)	V(5C2&5)
Resistência a antimicrobianos				
Beta-lactâmicos	<i>blaZ, mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>blaZ, mecA</i>	<i>blaZ, mecA</i>
Aminoglicosídeos		<i>aac(6'')-aph(2'')</i> , <i>aaD</i>		
MLS _B	<i>erm(C), lsa(E)</i>	<i>erm(T), lsa(E)</i>	<i>erm(C), lsa(E)</i>	<i>erm(C), lsa(E)</i>
Tetraciclina	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>tet(L), tet(M)</i>	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>tet(K), tet(M)</i>
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>		<i>grlA</i>	<i>grlA</i>
Fenicóis	<i>fexA</i>	<i>fexA</i>	<i>fexA</i>	<i>fexA</i>
Trimetoprim	<i>dfrG</i>	<i>dfrG</i>	<i>dfrG</i>	<i>dfrG</i>

^aST: sequence type, SCC*mec*: “staphylococcal cassette chromosome *mec*”; ^bMLS_B : macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B; número de acesso das sequências comparadas: NC013374 (*blaZ*), NC_007168 (*mecA*), KF421157 [*aac(6'')-aph(2'')*], M19465 (*aaD*), M19652 [*erm(C)*], AY894138 [*erm(T)*], JX560992 [*lsa(E)*], U38656 [*tet(K)*], M29725 [*tet(L)*], AM990992 [*tet(M)*], p.S84L (*gyrA*), p.S80Y(*grlA*), AB205645(*dfrG*), AJ549214 (*fexA*) e AB205645 (*dfrG*).

Tabela 8. Percentual de identidade, fenótipo e número de acesso da sequência comparada de genes de resistência a antimicrobianos com identidade inferior a 100%.

Cepa	Origem	Gene (% Identidade)	Fenótipo/Função
SN51b	suíno	<i>erm(C)</i> (99,05) ^a	Resistência MLS _B
		<i>mecA</i> (99,95) ^a	Resistência a beta-lactâmicos
SN145b	suíno	<i>blaZ</i> (97,53) ^a	Resistência a beta-lactâmicos
SN182b	suíno	<i>erm(C)</i> (99,05) ^a	^b Resistência MLS _B
		<i>mecA</i> (99,9) ^a	Resistência a beta-lactâmicos
		<i>fexA</i> (99,65) ^a	Resistência Fenicol
HSN18a	humano	<i>erm(C)</i> (99,05) ^a	Resistência MLS _B
		<i>mecA</i> (99,9) ^a	Resistência a beta-lactâmicos
		<i>fexA</i> (99,65) ^a	Resistência a fenicóis

MLS_B : macrolídeos, lincosamizdas e estreptogramina B. ^aNúmero de acesso das sequências comparadas: M19652 [*erm(C)*], NC_007168 (*mecA*), JBTH01000015 (*blaZ*) e AJ549214 (*fexA*). ^bMLS_B: macrolídeos, lincosamizdas e estreptogramina B. ^aGenotipificação e ^bResistência a antimicrobianos.

4.4. Determinação de repertório de genes de resistência a antimicrobianos

Para beta-lactâmicos, os genes *blaZ* e *mecA* foram detectados em todas e em três amostras, respectivamente, dentre as quatro submetidas ao SGC (Tabela 7). A amostra SN52b (MRSA) não foi submetida ao SGC, mas o gene *mecA* foi detectado por PCR. As amostras SN182b e HSN18a carregavam o gene *mecA*, mas não expressaram a resistência frente ao disco de cefoxitina (OS-MRSA, *oxacillin susceptible mecA*-positive *S. aureus*). Genes de resistência aos aminoglicosídeos foram observados apenas em uma amostra (SN145b), sendo estes gene *aac(6'')-aph(2'')* e *aaD*. O primeiro gene confere resistência à gentamicina, a qual foi detectada no disco difusão apenas para esta amostra também. Para tetraciclina, foram detectados os genes *tet(K)*, *tet(L)* e *tet(M)*, sendo *tet(M)* em todas as amostras e *tet(L)* em apenas uma. A resistência a tetraciclina foi detectada fenotipicamente em todas as amostras. Mutações que conferem resistência a quinolonas foram detectadas nos genes *gyrA* (SN51b: S84L) ou *grlA* (SN182b, HSN18a: S80Y) para três das amostras, sendo que as quatro exibiram resistência para pelo menos uma das quinolonas testadas no disco difusão.

Para macrolídeos, lincosamídeos e estreptograminas B, foram detectados os genes *erm(C)* e *lsa(E)*, sendo que em uma das cepas em vez de *erm(C)* foi detectado *erm(T)*. Todas as quatro amostras exibiram resistência tanto à eritromicina quanto à clindamicina. O gene *dfrG*, de resistência ao trimetoprim, e *fexA*, de resistência ao cloranfenicol, foram detectados nas quatro amostras. Entretanto, resistência à associação sulfametoxazole-trimetoprim foi observada apenas em uma enquanto que para cloranfenicol em três delas. Para as cepas de MRSA isoladas de suíno (SN182b) e humano (HSN18a) na mesma granja, os genes *erm(C)*, *mecA* e *fexA* apresentaram percentual de identidade entre 99,05; 99,9 e 99,65% com a sequência de maior similaridade no banco de dados da ferramenta utilizada para sua detecção. Entretanto, o percentual foi o mesmo entre os genes das duas cepas (Tabela 8). Na Tabela 9, estão exibidos os resultados das metodologias de determinação de resistência fenotípica e genotípica.

Tabela 9 . Perfil fenotípico e genotípico de resistência aos antimicrobianos de cepas isoladas de suinoculturas no estado do Rio de Janeiro (2014-2019).

Cepa	Granja	Hospedeiro	Resistência aos antimicrobianos	
			Fenotípica	Genotípica
SN51b	E	Suíno	Cef, Cip, Cli, Eri, Nor, Pen, Sut, Tet	<i>blaZ</i> , <i>dfrG</i> , <i>erm(C)</i> , <i>fexA</i> , <i>gyrA</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>
SN145b	K	Suíno	Cip, Cli, Clo, Gen, Eri, Nor, Pen, Tet	<i>aac(6'')</i> - <i>aph(2'')</i> , <i>aaD</i> , <i>blaZ</i> , <i>dfrG</i> , <i>erm(T)</i> , <i>fexA</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>
SN182b	K	Suíno	Cip, Cli, Clo Eri, Pen, Tet	<i>blaZ</i> , <i>dfrG</i> , <i>erm(C)</i> , <i>fexA</i> , <i>grlA</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>
HSN18a	N	Humano	Cip, Cli, Clo, Eri, Pen, Tet	<i>blaZ</i> , <i>dfrG</i> , <i>erm(C)</i> , <i>fexA</i> , <i>grlA</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>

Em azul, genes detectados que não apresentaram correspondência com os resultados da metodologia fenotípica para detecção de resistência. Cip: ciprofloxacina; Cli: clindamicina; Clo: cloranfenicol; Eri: eritromicina; Gen: gentamicina; Nor norfloxacina; Oxa: oxacilina; Pen: penicilina; Tet: tetraciclina; Sut: sulfametoxazol-trimetoprima.

4.5 Análise de dados dos questionários

Os dados obtidos pelos questionários referentes às características das propriedades, de manejo e dos indivíduos que trabalhavam nas granjas permitiram identificar alguns fatores associados à colonização nos suínos e em seus contatos humanos, por cepas de *S. aureus* multirresistentes. Granjas com comercialização de animais no Estado, utilização de desinfetantes na higienização das instalações, realização de vazio sanitário, uso de antimicrobianos para outros fins além de tratamento, como profilaxia e promoção de crescimento, e uso de pelo menos três classes de antimicrobianos foram variáveis associadas significativamente ($p < 0,05$) à colonização de suínos por estas cepas multirresistentes (Tabela 10). Dentre os antimicrobianos utilizados nas granjas, a tetraciclina ($n=8/12$; 66,7%) foi o mais citado dentre aquelas que relataram utilizar estes fármacos, seguida pelos beta-lactâmicos ($n=5/12$; 50%), gentamicina ($n=4/12$; 33,3%) e quinolonas ($n=3/12$; 25%).

Com relação aos voluntários humanos, não foi observada associação significativa ($p < 0,05$) entre colonização por *S. aureus* multirresistentes e as variáveis avaliadas (Tabela 11). Dentre os 29 participantes, para quatro haviam apenas como dados sua “função” na granja. Portanto, para fins de

cálculo consideramos 29 participantes para analisar a variável função (se veterinário ou não; nesta variável consideramos também estagiários de veterinária) e 25 participantes para outras variáveis.

Dados demográficos e de práticas de manejo das granjas, assim como dados demográficos e outras informações sobre os contatos humanos, são demonstrados nas Tabela 12 (Anexo).

Tabela 10. Associação de possíveis características das granjas à colonização de suínos por *S. aureus* multirresistentes.

Variável N (%)	Total N=16	Colonizados N=5 (31,25%)	Não colonizados N=11 (68,75%)	Valor de p
Comercialização no Estado	3	3 (60%)	0 (0%)	0,018
Higienização de instalações com desinfetante	5	4 (80%)	1 (9,1%)	0,013
Vazio sanitário	5	4 (80%)	1 (9,1%)	0,013
Uso de antimicrobianos para fins além de tratamento	4	4 (80%)	0 (0%)	0,003
Uso de > 3 classes de antimicrobianos	5	4 (80%)	1 (9,1%)	0,04

Tabela 11. Associação de características dos contatos humanos dos suínos à colonização por *S. aureus* multirresistentes.

Variável	Total	Colonizados	Não colonizados	Valor de p
N (%)	N=25	N=4 (%)	N=21 (%)	
^a Médico Veterinário	6*	2 (50%)	4 (19,1%)	0,27
^b Uso de antimicrobianos	4	1 (25%)	3 (14,3%)	0,53
^c Hospitalização	1	0 (0%)	1 (4,8%)	1,0
^d Contato com indivíduos hospitalizados	5	1 (25%)	4 (19,1%)	1,0
Morar com funcionário de unidade de saúde	5	0 (0%)	5 (23,8%)	0,55
Contato com outros animais	17	3 (75%)	14 (66,7%)	1,0

^aPara esta variável, foram considerados os 29 participantes do estudo uma vez que a informação sobre a função na granja era conhecida para todos; Foram incluídos como Veterinários, estagiários de veterinária;

^b Os mais citados foram tetraciclina, penicilina e clindamicina;

V. DISCUSSÃO

5.1 Colonização de suínos e funcionários por *S. aureus* e MRSA em granjas do estado do RJ

Muitos estudos têm investigado a ocorrência de bactérias multirresistentes em animais, uma vez que estes também contribuem para a disseminação da resistência o que é um problema de saúde pública mundial. Os animais de produção de alimentos têm uma importância ainda maior devido ao volume de antimicrobianos utilizados, o qual representa 75% da quantidade comprada desses fármacos no mundo (KASIMANICKAM *et al.*, 2021). Além disto, a exportação de carnes permite a potencial distribuição destas bactérias entre os diferentes países. *S. aureus* é uma bactéria usualmente resistente a múltiplos antimicrobianos, sendo considerada uma ameaça para a população humana (TUNER *et al.*, 2019).

Diversos estudos sobre *S. aureus* em animais têm sido realizados entre aqueles envolvidos na produção de leite, como bovinos e outros ruminantes, já que é um dos principais agentes de mastite (SCHNITT *et al.*, 2020). Já em animais de produção de carne, grande parte dos estudos tem sido direcionada para outras bactérias. Com isto, mais estudos devem ser realizados para investigar a ocorrência de *S. aureus* resistentes entre estes animais. No Brasil, há poucos estudos investigando a ocorrência de *S. aureus* resistentes em suínos (AQUINO *et al.*, 2011; MORENO *et al.*, 2016). As espécies bacterianas mais estudadas quanto à resistência aos antimicrobianos em suinoculturas são *Escherichia coli*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium perfringens*, altamente infectantes ao plantel e causadoras de grande prejuízo econômico na produção (MENIN *et al.*, 2008). Portanto, não sabemos o quanto *S. aureus* e suas cepas multirresistentes, como MRSA, estão circulando em nosso país e nem se tem ocorrido transmissão entre suínos e funcionários das granjas.

Neste estudo, 5,6% e 1,2% dos suínos investigados estavam colonizados por *S. aureus* e MRSA, respectivamente. A ocorrência de colonização por *S. aureus* entre estes animais tem variado em estudos realizados em diferentes países, desde 2,5% (EOM *et al.*, 2019) a 77% (SUN *et al.*, 2015) dos suínos investigados. Entretanto, frequências de colonização altas ou superiores ao nosso estudo têm sido observadas em grande parte deles (BURNS *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2015; NOBREGA *et al.*, 2017; VELASCO *et al.*, 2018). As proporções de colonização por MRSA também têm variado entre os estudos (SUN *et al.*, 2015; VELASCO *et al.*, 2018).

Em um estudo nos EUA (SUN *et al.*, 2015), foram investigados 739 suínos de 38 suinoculturas, localizadas em 11 estados de grandes produtores. Foi observada uma taxa de colonização de

S. aureus de 77%, sendo detectados suínos colonizados em 37 das 38 suinoculturas incluídas no estudo. No entanto, não foi detectado nenhum animal colonizado por MRSA. Na Irlanda, Burns e colaboradores (2014) encontraram uma prevalência de 26% de suínos colonizados por *S. aureus* ao coletarem amostras de secreção nasal de 100 animais, porém nenhum MRSA foi detectado com base na suscetibilidade à cefoxitina.

Na América do Sul, Velasco e colaboradores (2018) coletaram amostras de 332 suínos de granjas e abatedouros, de 85 carcaças de abatedouros e de carnes vendidas em supermercados e lojas de varejo no Chile. A frequência de colonização por *S. aureus* geral foi de 33,9%, sendo de 56,5% para carcaças, 28,3% para suínos (40,6% coletados nas granjas e 23,3% coletados em abatedouros) e 32,9% para carnes de suínos. As amostras de suínos foram coletadas em quatro granjas e dois abatedouros. Três amostras exibiram fenótipo de resistência à oxacilina pelo disco de cefoxitina, porém não detectou-se *mecA*, *mecC* ou PBP2a em nenhuma delas. No Brasil, Nobre e colaboradores (2017) em estudo efetuado em Teresina, Piauí relataram a colonização por *S. aureus* de 20,7% dos suínos investigados. Apesar de todas as amostras apresentarem multirresistência, nenhuma delas carregava o gene *mecA*. Outro estudo brasileiro realizado no Oeste do estado do Paraná-PR (RODRIGUES *et al.*, 2018) coletou 540 amostras entre 10 granjas suínulas e um frigorífico local, e obteve uma taxa de colonização por *S. aureus* de 2,4%, onde 100% dessas amostras apresentaram mutiresistência e 16,6% apresentaram resistência à oxacilina.

Já Eom e colaboradores (2019), coletaram um total de 1.587 amostras de secreção de mucosas nasais, a partir de animais de granjas de suínos (n=19), matadouros (n=7) e mercados de varejo (n=35) em 8 províncias diferentes da Coreia entre 2017-2018. Um total de 41 amostras de *S. aureus* (2,6%) foram isoladas, sendo todas MSSA e 90% dessas amostras foram isoladas de suínos em granjas (n=37/41).

Altas taxas de colonização de suínos por MRSA foram observadas em estudos realizados em países europeus. Na Itália, Pirolo e colaboradores (2019) encontraram uma taxa de colonização por MRSA de 46,1% (n=219/475). Neste estudo, foram incluídas 32 granjas e o material foi coletado entre janeiro e março de 2018. A frequência de colonização por MRSA foi significativamente maior em granjas intensivas e em suínos tratados recentemente com antimicrobiano ou em andamento. Frequências semelhantes foram detectadas em estudos na Bélgica (44%; CROMBÉ *et al.*, 2011) e Alemanha (52%; ALT *et al.*, 2011). Já Abreu e colaboradores (2019) relataram taxas bem mais altas em estudo com material coletado em dois períodos na Espanha: 89,6% (n=268/300; 2009-2010) e 85,7% (n=107/125; 2017-2018). Os pesquisadores atribuíram estas frequências a certas práticas de manejo como a utilização frequente de antimicrobianos durante a produção animal.

Em um estudo realizado com médicos veterinários que trabalham diretamente com suínos nos Estados Unidos, foi observada uma frequência de colonização por *S. aureus* de 64%, uma incidência duas vezes maior que a média da população geral (SUN *et al.*, 2015).

No presente estudo, o percentual de funcionários (25%) das granjas colonizados por *S. aureus* foi maior do que o percentual dos suínos. A taxa de colonização dos funcionários foi próxima da população geral que fica em torno de 30% (SAKR *et al.*; 2018). Há uma grande escassez de trabalhos que incluam os animais e seus contatos humanos no Brasil.

5.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* isoladas nas granjas

Dos 12 antimicrobianos testados, foi observada resistência para 10 deles, com perfis de resistência a até 9 classes diferentes. Destacam-se antimicrobianos como penicilina G (46,6%), tetraciclina (46,6%) e eritromicina (53,3%) com elevados índices de resistência que corroboram com relatos descritos por outros autores (COMBÉ *et al.*, 2012; MASSON *et al.*, 2012; NOBRE *et al.*, 2017). Segundo o estudo realizado por Abreu e colaboradores (2019) na Espanha, as maiores frequências de resistência foram observadas para a gentamicina 38,3% (coleta: 2009-2010) e 61,6% (coleta: 2017-2018) e clindamicina 50,4% (2009-2010) e 76,8% (2017-2018), sendo a eritromicina o único antimicrobiano avaliado com redução importante da taxa de resistência de 33,6% para 16% nesses mesmos intervalos de tempo. Em outro estudo na Espanha, as maiores taxas de resistência foram para tetraciclina (100%), clindamicina (100%) seguida pela eritromicina (93,3%) (REYNA-GA *et al.*, 2016). Esses antibióticos são frequentemente utilizados na suinocultura para o tratamento de enfermidades, como foi comprovado nos questionários obtidos das granjas analisadas no presente estudo (anexo). O uso da tetraciclina foi evidenciado na maioria das granjas que fazia uso de antimicrobianos, sendo os beta-lactâmicos, gentamicina e quinolonas outros também citados. As maiores frequências de resistência entre amostras de *S. aureus* isoladas de suínos em um estudo do Canadá foram para penicilina (31%), tetraciclina (14%) e clindamicina 50 (8%) (RUBIN *et al.*, 2011). A resistência de *S. aureus* à penicilina geralmente é elevada, mas variável entre alguns países. Na Bélgica foram encontrados 60% de resistência, na Dinamarca 84%, na Alemanha 25%, no Japão 38%, no Reino Unido 32% (AARESTRUP *et al.*, 2008) e na Turquia observou-se 100% de resistência para penicilina (TURUTOGLU *et al.*, 2006). É frequente a resistência de *S. aureus* a tetraciclina, eritromicina e clindamicina (VAN DER WOLF *et al.*, 2011). O maior índice de resistência para tetraciclina (68%) foi encontrado em *S. aureus* isolados de suínos quando comparado com outras espécies de animais de interesse econômico (GOUSIA *et al.*, 2011). Bageçigil e colaboradores

(2007) também descrevem alta incidência de resistência a tetraciclina. Estes mesmos autores também observaram grande quantidade de *S. aureus* resistentes a clindamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e a rifampicina.

A multirresistência é um fenômeno extremamente relevante, pois compromete a eficácia dos fármacos utilizados para a terapia de enfermidades causadas por microrganismos como *S. aureus*. No presente trabalho observou-se um alto percentual de colonização por amostras de *S. aureus* multirresistentes tanto entre suínos quanto entre humanos colonizados por esta bactéria. Uma possível justificativa para a elevada frequência de cepas multirresistentes pode estar relacionada à utilização de suplementos alimentares contendo antibióticos como a sulfadimidina, trimetoprima e clortetraciclina, normalmente misturados de forma homogênea à ração, e sendo administradas desde a fase de creche até a de terminação do animal (NOBRE *et al.*, 2017). Quanto à presença de MRSA, as mesmas foram isoladas de três animais representando um terço (n=3/9) dos colonizados por cepas multirresistentes. Detectou-se a presença de uma amostra de MRSA em humanos, correspondendo a 20% dos humanos colonizados por amostras multirresistentes. Em um estudo Espanhol (ABREU *et al.*, 2019) foi encontrada uma incidência de MRSA de 89,6% a partir da colonização nasal de suínos. Já um estudo Francês (ARMAND-LEFEVRE *et al.*, 2005) que comparou amostras de trabalhadores rurais em contato com suínos e humanos sem contato com o animais, encontrou MRSA apenas entre os humanos que trabalhavam diretamente com animais em uma incidência de 23,8% entre os que tinham contato com suínos. Segundo Reynaga e colaboradores (2016), a prevalência de MRSA nos suínos foi de 46% na Espanha e se assemelhou com outros estudos europeus. Na Bélgica, estima-se que 44% dos suínos sejam portadores de MRSA (COMBRÉ *et al.*, 2012). Na Alemanha, foi relatada uma prevalência de 52% suínos portadores de MRSA em granjas de engorda (ALT *et al.*, 2010). Já na Holanda, foi reportada 56% de prevalência em granjas de criação de suínos (BROENS *et al.*, 2011).

A colonização por *S. aureus* multirresistentes pode estar associada a granjas mais tecnificadas, as quais o uso de antimicrobianos é maior. No presente estudo, encontrou-se uma associação significativa de granjas com animais colonizados por estas amostras e a comercialização dos animais no estado. As granjas que comercializavam no estado eram as mais mecanizadas para atender a demanda, com um maior número de animais. A grande maioria das granjas era de pequenos produtores, sendo muitas delas de subsistência e/ou venda no próprio município. A utilização de desinfetantes na higienização das instalações, realização de vazio sanitário, uso de antimicrobianos para outros fins além de tratamento, como profilaxia e promoção de crescimento, e uso de pelo menos três classes de antimicrobianos foram também associadas significativamente ($p < 0,05$) a granjas

com suínos colonizados por cepas multirresistentes. Estas práticas são adotadas em propriedades mais tecnificadas. Vale ressaltar que o teste de análise estatística analisou as variáveis individualmente, e praticamente nas mesmas granjas observou-se variáveis com o p significativo.

Com relação aos contatos humanos, não foi observada associação significativa entre colonização por *S. aureus* multirresistentes e as variáveis avaliadas. Muitas destas variáveis estão relacionadas à colonização da população humana em geral. Na maioria dos casos, as cepas multirresistentes em humanos foram detectadas em granjas onde suínos também estavam colonizados por estas cepas. Portanto, é provável que a colonização dos funcionários possa estar relacionada ao contato com estes animais. O compartilhamento das mesmas linhagens entre os humanos e suínos da mesma granja corrobora este pensamento.

No presente estudo, 50% das amostras foram caracterizadas como MRSA apenas por meio de métodos moleculares. Pelo método de disco-difusão, essas amostras não foram inicialmente consideradas susceptíveis. Amostras de *S. aureus mecA*-positivas fenotipicamente susceptíveis são denominadas MRSA susceptíveis à oxacilina ou OS-MRSA (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015). No Brasil há relato de um estudo realizado com indivíduos hospitalizados no qual a incidência de OS-MRSA foi de 51,7% (30/58), um motivo de alerta uma vez que compromete assim métodos convencionais usados para a identificação de MRSA em laboratórios clínicos, classificando essas amostras erroneamente como MSSA (ANDRADE-FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

A resistência à vancomicina não foi testada fenotipicamente pois o método de disco-difusão para este antimicrobiano não é indicado para *S. aureus*. O gene *vanA* não foi detectado a partir do sequenciamento de genoma completo das amostras selecionadas. No Brasil há um relato de VISA (*S. aureus* Intermediário à vancomicina) proveniente de um suíno com lesão exsudativa de pele no estado do Rio Grande do Sul (MORENO *et al.*, 2016). A ausência do gene *vanA* indica a possibilidade de alterações na espessura da parede celular como responsáveis pelo fenótipo observado (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

Apesar das baixas frequências de MRSA encontradas, as taxas de multirresistência em suínos e seus contatos trazem uma grande preocupação, pois podem comprometer a eficácia de tratamento tanto para os animais, impactando na produção animal, quanto para humanos, contribuindo para este problema de saúde pública.

5.3 *Linhagens circulantes e compartilhamento de linhagens de MRSA entre suínos e funcionários de granjas do RJ*

Com relação ao ST, todas as amostras de *S. aureus* analisadas para tal característica pertenciam ao ST398, uma LA-MRSA bastante relatada na literatura em animais de produção. A cepa LA-MRSA ST398 foi descrita em diversos países, na Europa e no mundo, com diferentes prevalências em animais e trabalhadores da suinocultura (ABREU *et al.*; 2019). Em 2010, foi relatado pela primeira vez no Brasil de um paciente com fibrose cística que teve contato com animais da fazenda (LIMA *et al.*, 2010). Segundo Sun e colaboradores (2015), a linhagem de MRSA predominantemente encontrada em populações de suínos é o ST398. Entretanto, em estudos na maioria dos países asiáticos a linhagem predominante tem sido a ST9. Quando submetidas a técnica de sequenciamento de genoma completo, tanto as amostras de MRSA (SN51b, SN182b e HSN18a) quanto de MSSA (SN145b) foram classificadas como ST398. A amostra HSN12b foi identificada também como pertencente ao ST398, pelo técnica convencional de MLST.

Em relação ao tipo *spa*, a amostra SN145b foi identificada como t01451 enquanto as outras três como t011. Este último é o tipo mais comumente encontrado em MRSA do ST398 na Europa e Estados Unidos (DE NEELING *et al.*, 2007; KHANNA *et al.*, 2008). O t011 é o mais comum também na produção de suínos dinamarqueses (DANMAP, 2014), podendo ser encontrado também em humanos, lontras e cavalos (DANMAP *et al.*; 2016). Na Espanha, Abreu e colaboradores (2019) identificaram t011 como LA-MRSA ST398 mais comum em trabalhadores rurais seguido por t01451, enquanto que em suínos o predominante foi t011. Eom e colaboradores (2019) por sua vez encontraram t01451 apenas em amostras suínas na Coreia. O tipo *spa* t011 foi reportado em humanos e suínos na Irlanda, indicando um possível compartilhamento interespecie (BRENNAN *et al.*, 2017).

Pelo sequenciamento do genoma completo, o tipo de SCC*mec* identificado pela PCR foi confirmado. Entretanto, mais detalhamento sobre o tipo pode ser obtido, com todas as amostras carregando SCC*mec* do tipo V(5C2&5). Tal SCC*mec* é formado pela integração do SCC*mec* tipo V em um MSSA carregando um elemento SCC, além das inversões do complexo do gene *mec* em extensas recombinações (BALAKUNTLA *et al.*, 2014).

No presente estudo, as amostras de suínos e humanos provenientes da mesma granja apresentaram o mesmo perfil genético: LA-MRSA ST398-SCC*mec* V(5C2&5)-t011 (HSN18a e SN182b) e MSSA ST398 (SN145b e HSN12b). Tais dados sugerem que possa ter havido transmissão entre os dois hospedeiros.

5.4 Repertório de genes de resistência aos antimicrobianos de cepas multirresistentes, incluindo MRSA

A transferência genética horizontal é um dos principais mecanismos responsáveis pela disseminação de genes que codificam resistência aos antimicrobianos, pois possibilita a transmissão da resistência de uma célula bacteriana para outra.

No presente estudo, foram detectados genes de resistência a vários antimicrobianos. Para a tetraciclina, cada uma das quatro amostras apresentou dois genes de resistência, dentre eles *tet(K)* e *tet(L)*, que codificam bombas de efluxo, e/ou *tet(M)*, que fornece proteção ribossômica (ROBERTS, 2005). Brennan e colaboradores (2017) relatam ter encontrado 36,4% de resistência à tetraciclina em cepas de MRSA na Irlanda enquanto Burns e colaboradores (2014) encontraram 48% de resistência por *tet(M)*. Na Espanha, Lozano e colaboradores (2012) realizaram um estudo demonstrando que a resistência à tetraciclina é um bom marcador fenotípico para MRSA da linhagem ST398.

Um estudo Dinamarquês (BURNS *et al.*, 2014) relatou que a maioria das amostras carregava pelo menos um gene de resistência a antimicrobianos, incluindo genes de resistência a MLS_B [*erm(C)* 43%], a penicilina G (*blaZ*, 43%), ao trimetoprim (*dfpS1*, 13%) e estreptomicina (*aadE*; n:=3/23; 13%).

Brennan e colaboradores (2017) encontraram amostras pertencentes a t011 com SCC_{mec} do tipo V (5C2&5) em suínos e seus contatos humanos na Irlanda. Estas amostras apresentavam resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina e trimetoprim, sugerindo a existência de uma significativa pressão seletiva e manutenção de genes de resistência. Os genes *mecA*, *tet(M)* e *blaZ* foram detectados em todas as cepas enquanto *dfpG* exceto em uma delas.

No presente estudo, a amostra de MSSA ST398 suína apresentou genes de resistência não observados nas outras também analisadas, como genes de resistência a aminoglicosídeos. As amostras de MRSA exibiram perfil genotípico de resistência semelhante. As duas cepas, uma de suíno e outra de humano, da mesma granja exibiram o mesmo perfil, mais uma característica que corrobora para a disseminação interespecie das linhagens e, conseqüentemente, potencial zoonótico. MRSA e MSSA ST398 estão circulando em granjas de municípios diferentes do estado do Rio de Janeiro. A análise de outras amostras poderá mostrar se a distribuição é ainda mais ampla e ocorre em todo o território nacional. As linhagens ST398-t011 e ST398-t01451 são também comumente encontradas na Europa, Estados Unidos e Ásia, mostrando que há a circulação de linhagens também encontradas em outras regiões geográficas mais distantes. Embora poucas amostras tenham sido analisadas, a

linhagem ST398 foi isolada dentre todas as amostras submetidas a esta análise, distribuídas em granjas de diferentes municípios. A análise de mais amostras será importante para identificarmos se há uma distribuição ampla que pode refletir uma boa adaptação às granjas do nosso Estado.

Vale ressaltar a importância de se avaliar a resistência aos antimicrobianos de uma forma mais global, envolvendo o meio-ambiente, a saúde humana e a saúde animal, como um único contexto. Microorganismos multirresistentes circulam livremente entre animais e indivíduos e são constantemente eliminados no ambiente. Além disso, o contato direto entre seres humanos e animais favorece o compartilhamento de microorganismos resistentes e desencadeiam a disseminação de doenças infecciosas. À medida em que o mundo de hoje se torna cada vez mais conectado, a necessidade de se aplicar efetivamente o conceito de Saúde Única ou One Health é fundamental não apenas para a proteção de pessoas e animais, mas para impedir rupturas econômicas que podem acompanhar o surto proveniente por tais doenças.

VI. CONCLUSÃO

- A prevalência de colonização por *S. aureus* foi baixa entre suínos e semelhante a da população geral entre humanos. A maioria estava colonizada por cepas multirresistentes, dentre estas algumas MRSA, sendo isoladas de diferentes granjas.
- As amostras de *S. aureus* exibiram resistência às principais classes de antimicrobianos.
- LA-MRSA ST398-SCC mec V-t011 e MSSA ST398 circulam entre suínos e profissionais, de granjas do Estado do Rio de Janeiro. Também, há circulação de MSSA ST398-t01451.
- As cepas de LA-MRSA ST398 apresentaram uma grande variedade de genes de resistência aos antimicrobianos, com destaque para os genes *blaZ*, *dfrG*, *erm(C)*, *fexA*, *griA*, *lsa(E)*, *mecA*, *tet(K)* e *tet(M)*.
- LA-MRSA ST398-SCC mec V-t011 e MSSA multirresistentes ST398 foram isolados de suínos e humanos das mesmas granjas. As cepas de LA-MRSA também apresentaram o mesmo conteúdo genético de genes de resistência. Portanto, há potencial zoonótico de cepas multirresistentes evidenciado pelo compartilhamento das linhagens.
- Granjas mais tecnificadas, com uso de de desinfetantes na higienização das instalações, realização de vazios sanitários, uso de antimicrobianos para outros fins além de tratamento, e uso de pelo menos três classes de antimicrobianos foram associados significativamente, com a ocorrência de suínos colonizados por cepas multirresistentes. Entre humanos, a colonização por tais cepas não foi associada àqueles fatores observados na população geral. Logo, o contato com suínos pode ser um fator relacionado a colonização por estas cepas.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP FM, DURAN CO, BURCH GS. Antimicrobial resistance in swine production. *Animal Health Research Reviews*, Cambridge. 2008 v. 9, n.2, p. 135-148, 2008.

ABREU R, RODRÍGUEZ Á, CRISTOBALINA LECUONA M, CASTRO B, GONZÁLEZ J, AGUIRRE J, ARMANDO A. Increased Antimicrobial Resistance of MRSA Strains Isolated from Pigs in Spain between 2009 and 2018. *Veterinary Sciences*, 6(2), 38

ACOSTA AC, MATEUS J, Mota JWR. *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Medicina Veterinaria (Brazil)*. 2007, 11. 252-269.

AI-DABBAGH M, DOBSON S. Infectious hazards from pets and domestic animals. In: Curtis, N.; Finn, A.; Pollard, A.J. Hot topics in infection and immunity in children VII. Springer New York, 2011, p.261-272.

ALT K FA, SCHROETER A, GUERRA B, HAMMERL JA, HERTWIG S. Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany. *BMC Vet Res*. 2011;7:69.

ARMAND-LEFEVRE, L, RUIMY R, ANDREMONT A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis*. 2005 May;11(5):711-4.

AMMERLAAN HSM, BONTEN MJM. Daptomycin: graduation day. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006 v.12, Suppl. 8, p.22-28.

ANDRADE M, LEAL BTC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol*. 2016 Jun 21;16(1):115.

ANDRADE MM., LUIZ WB, DA SILVA OSR. AMORIM, J.H. The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020 Oct 7 1721936.

ANDREA TF, RIEKERINK GMO, ROTHKAMP A. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms, 2012.160(1-2).

ANKER JCH, KOCH A, ETHELBERG S, MOLBAK K, LARSEN J, JEPSEN MR. Distance to pig farms as risk factor for community-onset livestock-associated MRSA CC398 infection in persons without known contact to pig farms-A nationwide study. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(3):352-360.

APPELBAUM PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* [Review] *Clin Microbiol Infect* 2006;12 (Suppl.1) :16-23

- MARANAN MC, MOREIRA B. Antimicrobial resistance in Staphylococci: Epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. *Infect Dis Clin N Am* 1997;11(4):813-49
- AQUINO GV, MALUTA P, ÁVILA FA. Prevalence of methicillin-resistant *staphylococci* on a farm: staff can harbour MRS when animals do not. *Zoonoses and Public Health*. 2012.59: 1-3.
- ARMAND-LEFEVR L, RAYMOND R, ANDREMONT A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis* 11: 2005. 711-714.
- ARRIOLA CS, GUERE M, LARSEN J, SKOV RL. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs in Peru. 2011.PLoS One6:e28529.
- AYLIFFE GAJ. The Progressive Intercontinental Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*,1997 v.24, Suppl 1, p.74-79.
- BABA T, BAE T, SCHNEEWIND O, TAKEUCHI F, HIRAMATSU K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of Bacteriology*. 2008. 190, 300–310.
- BALAKUNTLA J, PRABHAKARA S, ARAKERE G. Novel rearrangements in the staphylococcal cassette chromosome mec type V elements of Indian ST772 and ST672 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *PLoS One*. 2014 Apr 10;9(4):e94293.
- BAGCIGIL FA, MOODLEY A, BAPTISTE KE, JENSEN VF, GUARDABASSI L. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin and erythromycin-resistant staphylococci in nasal cavity of domestic animals. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, 2007 v.121, p.307-315.
- BAKER SR. A pilot study of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in swine populations of Brazil and United States. *Proceedings in: American Association of Swine Veterinarians*, 2008.
- BARCELLOS N, SOBESTIANSKY J, SOBESTIANSKY, TB. Uso de antimicrobianos. In: _____. *Doenças dos suínos*. Goiânia: Canone, 2007. cap 16, p. 685 – 717.
- BARBERATO-FILHO S, BERGAMASCHI CC, DEL FIOLE F, ANTONIAZZI FB. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Americas: systematic review and metanalysis of prevalence in food-producing animals. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 2020. 44-48.
- BASSETTI M, NICCO E, MIKULSKA M. Why is community associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34 (Suppl 1):S15-9.
- BATISTA BG, RAUBER JM, BRUSCHI JS, d'Azevedo PA. New cephalosporin as an alternative for treatment of infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Rev Epidemiol Control Infect*. 2015;5(2):94-9.

BIBERSTEIN EL, HIRSH D, HIRSH DC. ZEE, Y. C. (ed.) Microbiologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 1, p. 108 – 112.

BISDORFF B, SCHOLHÖLTER JL, CLAUßEN K, PULZ M, NOWAK D, RADON K. MRSA-ST398 in livestock farmers and neighboring residents in a rural area in Germany. 2012. *Epidemiology Infectious*, v.140, p.1800–1808.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos, no âmbito da agropecuária (PAN-BR AGRO). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR). Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRENNAN GI, ABBOTT Y, BURNS A, LEONARD F, MACMANUS BA, O'CONNELL B, COLEMAN DC, SHORE AC. The Emergence and Spread of Multiple Livestock-Associated Clonal Complex 398 Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* strains among Animals and Humans in the Republic of Ireland, 2010-2014. *PLoS One*. 2016 Feb 17;11(2):e0149396.

BROENS EM, GRAAT EAM, VAN DER WOLF PJ, VAN DE GIESSEN AW, DE JONG MCM. Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA-positive pig herds in The Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, 2011 v. 102, p.41– 49.

BUSSCHER JF, DUIJKEREN EV. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, 2006 v.113, p. 131-136.

BURN A, SHORE AC, BRENNAN GI, COLEMAN DC, EGAN J, FANNING S. A longitudinal study of *Staphylococcus aureus* colonization in pigs in Ireland. *Vet Microbiol*. 2014 Dec 5;174(3-4):504-513.

CADDICK JM, HILTON AC, ARMSTRONG RA, LAMBERT PA. Description and critical appraisal of principal components analysis (PCA) methodology applied to pulse-field gel electrophoresis profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, 2006. v.65, p. 87-95.

CARFORA, V. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. 2015. *International Dairy Journal*, 42: 12-15.

CARVALHO PLC, VIANA EF. Suinocultura SISCAL e SISCON: análise e comparação dos custos de produção. *Custos e Agronegócio Online*, 2011 v. 7, n. 3.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/mrsa-infection.html> . Acesso em 20 abr. 2021.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-six informational supplement. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019

- CHAMBERS HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? [Review] Emerg Infect Dis 2001;7:178-82.
- CHANG S, SIEVERT DM, HAGEMAN JC, BOULTON ML, TENOVER FC. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med 2003;348:1342-7
- CHAPIN A, RULE A, GIBSON K, BUCKLEY T. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. Environmental Health Perspectives, Carolina do Norte, 2005 v. 113, n. 2, p.137-142.
- CROMBÉ F, WILLEMS G, DISPAS M. Prevalence and Antimicrobial susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among pigs in Belgium. Microbial Drug Resistance, 2012 v. 18, n. 2, p. 126-131.
- CONCEIÇÃO T, COELHO C, DE LENCASTRE H, AIRES S.M. Frequent occurrence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) strains in two African countries. J Antimicrob Chemother. 2015 Dec;70(12):3200-4.
- COSTA M M, SILVA MS, SPRICIGO DA, WITT NM. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. 2006, vol.26, n.1.
- CUCARELLA C, SOLANO C, VALLE J, AMORENA B, LASA I. Bap a *Staphylococcus aureus* surface involved in biofilm formation. Journal Bacteriology, Washington, v.183, p. 2888-2896, 2001
- CUI S, LI J, HU C, JIN S, LI F, GUO Y, RAN L, MA Y. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009 v. 64, p. 680–683.
- CUI L, MA X, SATO K, OKUMA K, TENOVER FC, MAMIZUKA EM, GEMMELL CG, KIM MN, PLOY MC. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1):5-14. d
- DANMAP. Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Food and Humans in Denmark. Denmark: Technical University of Denmark.
- DAVID M Z. [Current Topics in Microbiology and Immunology] || Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. (Chapter 42).
- DAVID MZ, DAUM RS. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. Curr Top Microbiol Immunol. 2017;409:325-383.
- DEMORI AB, LOVATTO PA, ANDRETTA I, KIPPER M, LEHNE C R, REMUS A. Criação intensiva de suínos em confinamento ou ao ar livre: estudo meta-analítico do desempenho zootécnico nas fases de crescimento e terminação e avaliação de carcaça e carne no *Longissimus dorsi*. Ciencia Rural, Santa Maria, 2012 jul v.42, n.7, p.1294-1299.

- DE NEELING AJ, BROEK MJM, SPALBURG EC. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 2007 122, 366–372.
- DENIS O, SUETENS C, HALLIN M, CATRY B, RAMBOER I, DISPAS M, WILLEMS G, GORDTS B, BUTAYE P, STRUELENS M.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*, 2009 v.15, No 7, p.1098–1101.
- ENRIGHT MC, DAY NP, DAVIES CE, PEACOCK SJ, SPRATT BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1008-15.
- EOM HS, BACK SH, LEE HH, LEE GY, YANG SJ. Prevalence and characteristics of livestock-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the pork production chain in Korea. *J Vet Sci.* 2019 Nov;20(6):e69.
- EUZÉBI J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Staphylococcus*. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/search?word=staphylococcus>>. Acesso em: 03 de nov. 2020.
- FELD L, BAY H, ANGEN O, LARSEN AR, MADSEN AM. Survival of LA-MRSA in Dust from Swine Farms. *Ann Work Expo Health.* 2018 Feb 13;62(2):147-156.
- FISCHER J, RODRIGUEZ I, SCHMOGER S, FRIESE A, ROESLER U. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(7): 2012 1793-1795.
- FITZGERALD JR. 2012. Human origin for livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* 3: e00082-12.
- FESSLER, AT, RIEKERINK RGM, ROTHKAMP A. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. *Vet. Microbiol.* 2012, 9, 77–84.
- FLUIT, A. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8): 2012 735-744.
- FOSTER TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12): 2005 948- 958.
- FOSTER TJ, HOOK M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 6(12): 1998 484-488.
- FRIEDMAN ND, KAYE KS, STOUT JE, MCGARRY SA, TRIVETTE SL,; BRIGGS JP, LAMM W, CLARK C, MACFARQUHAR J, WALTON AL, RELLER LB, SEXTON DJ. Health Care–Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Annals of Internal Medicine*, 2002 v.137, p.791-798.
- GEORGOPAPADAKOU NH. Penicillin-Binding Proteins and Bacterial Resistance to β -Lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, 1993 v.37 n.10, p.2045-2053.

GILBERT P, McBAIN AJ, RICKARD AH. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Barking, 2003 v.51, p. 45-248.

GOLDING GR, BRYDEN L, LEVETT PN, MCDONALD RR, WONG A, WYLIE J, GRAHAM MR, TYLER S, DOMSELAAR GV, SIMOR AE, GRAVEL D, MULVEY MR. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in humans, Canada. *Emerging infectious diseases*, 2010 v.16, p. 587-594.

GÓMEZ-SANZ E, TORRES C, LOZANO C, PÉREZ-FERNANDEZ R, ASPIROZ C. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010, 7, 1269–1277.

GOODMAN SL, 1987. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara.

GRAELLS GC, ANTOOINE J, LARSEN J, CATRY B, DENIS O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Epidemiol Infect.* 2012 Mar;140(3):383-9.

GOUSIA P, ECONOMOU V, SAKKAS H, LEVEIDITOU S. Antimicrobial Resistance of major food borne pathogens from major meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011 v.8, n.1.

GUO, LIU Y, CHEN Z, YE X. Phenotypic and molecular characteristics of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from pigs: implication for livestock-association markers and vaccine strategies. *Infect and Drug Resist*11: 2018 1299-1307.

HANAKI H, ARAI-KUWAHARA K, VAVRA-BOYLE S, LABISCHINSKI H. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Aug;42(2):199-209.

HANSON BM, DRESSLER AE, HARPER AL, SCHEIBEL RP, WARDYN SE, ROBERTS LK, KROEGER JS, SMITH TC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health*, v.4, p.169—174, 2011.

HAU SJ, BAYLES DO, ALT DP, FRANA TS, NICHOLSON TL. Complete Genome Sequence of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 Isolated from Swine in the United States. *Genome Announc.* 2017 Aug 10;5(32):e00790-17.

HASMAN, H.; MOODLEY, A. *spa* type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Veterinary Microbiology*, 141(3): 2010 326-331.

HERMANS K, DEVRIESE L, HAESEBROUCK F. *Staphylococcus*. In: GYLES CL. et al. (ed.) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4° ed. Iowa: Wiley - Blackwell, 2010. cap.5, p.75 -89

HIRAMATSU K, HANAKI H, INO T, YABUTA K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997;40:135-6.

HOLT JG, KRIEG NR, SNATH PH. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9. ed. Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HUIJSDENS XW, DIJKE BJV, SPALBURG E, Community-acquired MRSA and pig-farming. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2006 v.5:26.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec;53(12):4961-7.

JESSEN O, ROSENDAL K, BULOW P, FABER V, ERIKSEN KR. Changing staphylococci and staphylococcal infections: A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. N Engl J Med 1969;281:627-35.

JIMÉNEZ JN, VÉLEZ LA, MEDIAVILLA JR, OCAMPO AM, VANEGAS JM, RODRÍGUEZ EA, KREISWIRTH BN, CORREA MM. Livestock-associated Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 infection in womam, Colombia. Emerging infectious diseases, 2011 v.17, p.1970-1971.

JONES RN, BLANCO-GUSMAN M, GALES AC, GALLEGOS B, CASTRO ALL. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program. Braz J Infect Dis17: 2013 672-81.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY E, JANOSI S, DAN A, BLOISS LG. MRSA Transmission between cows and humans. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, 2007 v.13, n.4, p.630-632.

KASIMANICKAM V, KASIMANICKAM M, KASIMANICKAM R. Antibiotics Use in Food Animal Production: Escalation of Antimicrobial Resistance: Where Are We Now in Combating AMR? Med Sci (Basel). 2021 Feb 21;9(1):14.

KARCHMER AW. From theory to practice: resistance in *Staphylococcus aureus* and new treatments. Clinical Microbiology and Infection, 2006 v.12, Suppl 8, p.15-21.

KHANNA T, FRIENDSHIP R, DEWEY C, WEESE JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet. Microbiol. 2008 128, 298–303.

KLUYTMANS JAJW, KLUYTMANS MFQ. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clinical microbiology and infection, 2006 v.12, suppl.1, p.9-15.

KÖCK RJ, HARIZIUS J, BRESSAN N, LAERBERG R, WIELER LH, WITTE W, DEURENBERG RH. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylo-*

coccus aureus (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Nov;28(11):1375-82.

KONEMAN EW. Provas de sensibilidade a agentes antimicrobianos. Un: Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas colorido. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC, 2001 5ed, Medsi, Rio de Janeiro, p.795-865.

KREISWIRTH B, KORNBLUM J, ARBEIT RD, EISNER W, MASLOW JN, MCGEER A, LOW DE, NOVICK RP. Evidence for a Clonal Origin of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Science, 1993 v. 259, p.227-230.

LAMAITA H, CERQUEIRA MMOP, CARMO LS, SANTOS DA, PENNA CFAM, SOUZA MR. *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 57(5): 2005 702-709.

LIMA DF, COHEN RW, ROCHA GA, ALBANO RM, MARQUES EA, LEÃO RS. Genomic information on multidrug-resistant livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from a Brazilian patient with cystic fibrosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017 Jan 1;112(1):79-80.

LIMA ESC, PINTO PSA, SANTOS JL, VANETTI MCD, BEVILACQUA PD, ALMEIDA LP, PINTO MS, DIAS FC. Isolamento de *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno com subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2010 v.24, n.4 p. 185- 190.

LIU J, CHEN D, PETRES BM, LI L, LI B, XU, Z. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microb Pathog. 2016 Dec;101:56-67.

LEE, J. H. Methicilin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 69, n11, p. 6489 – 6494, 2003.

LECLERQ R, DERLOT E, DUVAL J, COURVALIN P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988; 319:157-61.

LECLERQ R, COURVALIN P. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis. 1997 Apr;24(4):545-54.

LOWY FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. [Review] J Clin Invest 2003;111:1265-73.

LOZANO C, REZUTA A, GÓMEZ P, GÓMEZ-BÁEZ N, MARTIN-SACO G, ZARAZAGA M, TOREES C. High prevalence of spa types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother. 2012 Feb;67(2):330-4. doi: 10.1093/jac/dkr497. Epub 2011 Nov 28.

MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, HARBARTH S. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bac-

teria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 2012 v. 18, n. 3, p.268-81.

MANGENEY N, DROLLEE K, BORDES M, FAUBERT E, DUPERYON C. Comparative pulse-field gel electrophoresis typing of gentamicin resistant and susceptible methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in France between 1991 and 1998. Changes in antibiotic susceptibility. *The Journal of Hospital Infection*, London, 2002 v.51, p.262-268.

MARANAN MC, MOREIRA B, BOYLE-VAVRA S, DAUM RS. Antimicrobial resistance in Staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. [Review] *Infect Dis Clin North Am* 1997;11:813-49.

MASSON GCI H, FERREIRA GS, CARVALHO LFSS. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. *Archives of Veterinary Science*, Paraná, 2012 v.17, n 01, p.1-14.

MAZMANIAN S, LIU G. O. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 285(5428): 1999 760-763.

MERIALDI G, FELTRIN F, GAETARELLI B, LOMBARDI G. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) spa type t127, Sequence Type (ST)1, quickly spreads and persists among young pigs. *Pathog Dis*. 2019 Apr 1;77(3):ftz033.

MENIN A, RECK C, SOUZA Dd, KLEIN C, VAZ E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Ciência Rural*, 38(6), 2008 1687–1693.

MELCHIOR MB, VAAKAMP H, FINK-GREEMLS J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal*, 2006 171(3): 398-407.

MERLINO J, WATSON J, ROSE B, BEARD-PEGLER M, GOTTLIEB T, BRADBURY R, HARBOUR C. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v.49, p.793- 801, 2002.

MOMBACH AB, REITER KC, PAIVA RM, BARTH AL. Distribution of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I , II III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, London, v.56, p.1328-1333, 2007.

MORENO LZ, DUTRA MC, MORENO M, FERREIRA TS, SIKVA GF, MATAJIRA CE, SILVA APS, MORENO AM. Vancomycin-intermediate livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398/t9538 from swine in Brazil. *Mem Inst Oswald Cruz* 2016 111:659-661.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA. *Staphylococcus* e *Microrganismos* Relacionados. In: *Microbiologia Médica*, 5. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006 v.1,Cap.22, p.215-230.

- NAVARRE W, SCHNEEWIND O. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 1994 14(1): 115-121.
- NETO EDA, PEREIRA RFA, SNYDER RE, MACHADO TS, ANDRÉ LSO, CARDOSO CPA, AGUIAR-ALVES F. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clonal complex 398 with no livestock association in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017 112:647-9.
- NOBRE ML. Caracterização pelo perfil de resistência antibiótica e fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados em suínos. *Archives of Veterinary Science* 2017.
- NOBREGA DB, BUCK JEROEN, NAQVI SA, LIU G, NAUSHAD S, SAINI V, BARKEMA HW. Comparison of treatment records and inventory of empty drug containers to quantify antimicrobial usage in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2017; 100 (28987586): 9736-9745
- OLIVEIRA DC, TOMASZ A, DE LENCASTRE H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin- resistance *Staphylococcus aureus*. [Review] *Lancet Infect Dis* 2002;2:180-9.
- PACHECO AB, GUTH BE, SOARES KC, NISHIMURA L, ALMEIDA DF, FERREIRA LC. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal cluster among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 1997 35, 1521-1525.
- PANTOSTI A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*. v.3, n.127, p.1-12, 2012.
- PANTOSTI A, SANCHINI A, MONACO M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2007 Jun;2(3):323-34.
- PENNA B, MENDES W, RABELLO RF, LILENBAUM W. Isolation of methicillin-resistant staphylococci in canine skin infections in Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Dermatology* 2013 24: 373-375.
- PEREZ LRR, D'AZEVEDO PA. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in South Brazil. *Rev. Inst. Med. trop.*, 2008 v.50, p.135-137.
- PIROLO M, GIOFFRÈ A, VISAGGIO D, GHERARDI M, PAVIA G, SAMELE P, CIAMBRONE L, DI NATALE R, SPATARI G, CASILINUOVO F, VISCA P. Prevalence, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine in southern Italy. *BMC Microbiol.* 2019 Feb 26;19(1):51.
- QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2.ed. Iowa: Wiley-blackwell, 2011.1231p.
- RABELLO RF, BONELLI RR, PENNA BA, ALBUQUERQUE J P, SOUZA RM, CERQUEIRA A MF. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. *Animals*, 2010 10(4), 552.

REITER KC, MACHADO ABMP, FREITAS ALP, BARTH AL. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with SCCmec type III in cystic fibrosis patients in southern, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2010 v.43, p.377-381.

REYNAGA E, NAVARRO M, VILAMALA A, ROURE P, QUINTANA M, GARCIA-NUNEZ M, FIGUERAS R, TORRES C, LUCCHETTI G, SABRIÀ M. Prevalence of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs and pig farm workers in an area of Catalonia, Spain. *BMC Infect. Dis.* 2016, 16, 716.

RIBEIRO A, DIAS C, CARVALHO MCS, BERQUO´ L, FERREIRA FA, SANTOS RNS, CARVALHO BTF, FIGUEIREDO AM. First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *journal of clinical microbiology*, 2005 Vol.43, NO.4, p. 1985-1988.

ROBERTS MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. v.245, p. 195-203, 2005

RODRIGUES CD, SOVINSKI ÂI, SERENO MJ, PEGORARO K, VIANA C, SANTOS EAR, NERO LA, YAMATOGY RS, BARCELLOS V C, BERSOT LS. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* in the swine production chain. ANAIS 30º CONGRESSO Brasileiro de Microbiologia, CBM 2019.

ROHDE H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D (2001) Correlation of *Staphylococcus aureus icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* 39: 4595-4596.

RUBIN JE, BALL KR, CHIRINO-TREJO M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Can Vet J.* 2011 Feb;52(2):153-7. PMID: 21532820; PMCID: PMC3022451.

SÁ MEP, CUNHA MLRS, ELIAS AO, VICTORIA C, LANGONI H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 41(5):2004 320-326.

SANTOS BMO, DARINI ALC. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores são relacionados de uma creche de hospital universitário. *Medicina Ribeirão Preto, Ribeirão Preto*, v.35, p. 160-172, 2002.

SAKR AO. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol.* 2018 Oct 8;9:2419. doi: 10.3389/fmicb.2018.02419. PMID: 30349525; PMCID: PMC6186810.

SCHITO GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection*, v.12, suppl.1, p. 3-8, 2006.43.

SCHNITT A, TENHAGEN BA. Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Dairy Herds: An Update. *Foodborne Pathog Dis.* 2020 Oct;17(10):585-596.

SERGIO DMB, TSE KOK TH, HSU L, OGDEN BE, GOH ALH, CHOW PKH. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *Journal of Medical Microbiology*, 2007 v. 56, p.1107-1109.

SEO YS, LEE DY, RAYMAHJI N, KANG ML, YOO HS. Biofilm- forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. Research in Veterinary Science 85 (December), 2008 433–438.

SHARIATI A, DADASHI M, MOGHADAM MT, VAN BELKUM AD. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2020 Jul 29;10(1):12689.

SIEBER RN, SKOV R.L, NIELSEN J, SCHULZ J, PRICE LB, AARESTRUP FM. Drivers and Dynamics of Methicillin-Resistant Livestock-Associated *Staphylococcus aureus* CC398 in Pigs and Humans in Denmark. MBio. 2018;9

SILVA NC, GUIMARES FF, MANZI MP, JUNIIOR AF, GOMEZ-SANZ E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. Lett Appl Microbiol 59: 2014 665-669.

SEGUIN JC, WALKER RD, KLOOS WE, GEORGE RJ, HOLLIS RJ. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in veterinary teaching hospital: Potential human-to-animal transmission. Journal of Clinical Microbiology, London, 1999 v.37, n.5, p.1459-1463.

SEVERIN A, TABELI K. *et al.* High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. J Biol Chem 2003 279:3398-407.

SCHULZ J, FRIESE A, KLEES S, TENHAGEN BA, FETSCH A, RÖSLER U, HARTUNG J. Longitudinal Study of the Contamination of Air and of Soil Surfaces in the Vicinity of Pig Barns by Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology, 2012 v. 78, p. 5666-5671.

SOBESTIANSKY J, WENTZ I, SILVEIRA PRS. Suinocultura Intensiva., Embrapa – SPI., Concórdia. 1998 p.67-71; 370-371.

SOBESTIANSKY J, BARCELLOS D. Doenças dos Suínos., Goiânia., Cãnone Editorial., p. 2007 683-717.

SOUZA, JCPVB, TALAMINI DJD, SCHEURMANN GN, SCHMIDT GS. Sonho, desafio e tecnologia: 35 anos de contribuições da Embrapa Suínos e Aves. Livro Técnico (INFOTECA-E), 2011

SUN J, YANG M. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Growing Pigs in the USA. PLoS One. 2015 Nov 24;10(11):e0143670.

SUZUKI E, HIRAMATSU K, YOKOTA T. Survey of Methicillin-Resistant Clinical Strains of Coagulase-Negative Staphylococci for *mecA* Gene Distribution. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1992 v.36, p. 429-434.

TAKEUTI KL, MALGARIN CM, AMARAL AF, BARCELLOS DE. Frequency of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Fattening pigs in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, Acta Scientiae Veterinariae 2016 vol.44, nº1.

- TURNER NA, SHARMA-KUINKEL B, MASKARINEC SA, EICHENBERGER EM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Nat Rev Microbiol. 2019 Apr;17(4):203-218.
- TURUTOGLU H, ERCELİK S, ÖZTÜRK D. Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* an coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. Bull Vet Inst Pulawy 2006 50, 41-45.
- TRISTAN A, YING L Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. Journal of Clinical Microbiology 2003 41, 4465–4467.
- VAN CLEEF BA, VERKADE EJM, WULF MW, BUITING AG, VOSS A, HUIJSDENS XW, PELT WV, MULDER MN, KLUYTMANS JA. Prevalence of Livestock-Associated MRSA in Communities with High Pig-Densities in The Netherlands. PLoS ONE, 2010 v.5, p.01-05.
- VAN CLEEF, MONNET DL, VOSS A, KRZIWANEK K, ALLERBERGER F, STRUELENS M, KLUYTMANS JAJW (2011). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. Emerging Infectious Diseases, 17(3), 502–5.
- VANCRAEYNEST D, HERMAN K. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Veter-inary Microbiology 2004 103, 241–247
- VAN DER WOLF PJ, BROENS EM, GREET EAM. MRSA CC398 in the pig production chain. Prev Vet Med. 2011 Feb 1;98(2-3):182-9.
- VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. Acta Scientiae Veterinaria, Porto Alegre, 2009 v.37, supl.1, p. S147 – S150.
- VELASCO VV, VERGARA JL, BONILLA AM, MUNOZ J, MALLEA A, VALLEJOS D, QUEZADA-AGUILUZ M. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains in the Pork Chain Supply in Chile. Foodborne Pathog Dis. 2018 May;15(5):262-268.
- VON EIFF C, FRIEDRICH AW, PETRES G, BECKER K. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Jul;49(3):157-62.
- VOSS A, LOEFFEN F, BAKKER J, KLAASSEN C, WULF M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg Infect Dis 11: 1965-1966.
- WAGENAAR JA, YUE H, PRITCHARD J, BROEKHUIZEN-STINS M, HUIJSDENS X. 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. Vet Microbiol. 2009 Nov 18;139(3-4):405-9.
- WALTHER B, WIELER L, FRIEDRICH AW, HANSEN AM, KOHN B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at university hospital during routine microbiological examinations. Veterinary Microbiology, Amsterdam, 2008 v.127, p.171-1178.

WEESE JS, DICK H, WILLEY BM, MCGEER A, KREISWIRTH BN, INNIS B, LOW DE. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology*, 2006 v.115, p.148-155.

WEESE JS, DICK H, MCGEER A, KREISWIRTH BN, INNIS B, LOW DE. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, 2000 v.115, p.148-155.

WERTHEIM HF, MELLES DC, VOS MC, LEEWEN WV, BELKUM AV. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309905702954>>.

WHO – World Health Organization. Antimicrobial resistance. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 27 de Nov. 2011.

ZHANG K, MCCLURE JA, ELSAYED S, LOUIE T, CONLY JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 10, p. 5026–5033, 1 out. 2005. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.43.10.5026-5033.2005>>. Acesso em: 27 out. 2020

ZECCONI A, SCALI F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters*, 150(1-2): 2013 12-22.

Tabela 12. Dados demográficos e práticas de manejo adotadas nas granjas de suínos incluídas no estudo obtidos por questionário.

Granja	Município	Coleta	Suíno (n=250)	Humano (n=29)	Comercialização ^a	Higienização ^b	Vazio sanitário ^c	Antimicrobiano	
								Finalidade ^d	Utilizado ^e
A	Rio Claro	2014	10	1	S	A	-	Ttm	Tet
B	Rio Claro	2014	10	0	S, M	A	-	Ttm	Tet
C	Angra dos Reis	2014	10	1	S, M	A	-	Ttm	Tet
D	Barra Mansa	2014	10	0	S, M	A	-	Ttm	Tet
E	Pinheiral	2014	10	0	E	D	+	Ttm, Pfx	Enr, Est, Pen, Sut, Tet
		2016	20	2					
F	Cantagalo	2014	12	0	M	A	-	Não usa	-
G	C. Macacu	2014	7	0	S	A	-	Ttm	Tet
H	C. Goytacazes	2014	10	0	M	A	-	Ttm	Gen
I	S. F. Itabapoana	2014	16	0	S, M	A	-	Ttm	Gen
J	Itaperuna	2014	5	0	M	A	-	Não usa	-
K	Seropédica	2015	21	5	M	D	+	Ttm, Pfx	Enr, Gen, Est, Pen, Sut, Tet, Til
L	Petropolis	2016	20	4	E	D	+	Ttm, Pfx	Amx, Cef, Lin, Sut, Til
M	Tanguá	2019	10	1	M	A	-	Não usa	-
N	Nova Friburgo	2019	25	5	E	D	+	Ttm, Pfx, Prc	Amox, Flor, Nor, Tet
O	C. Macacu	2019	23	6	M	D	+	Ttm	Enr, Pen, Tet
P	Nova Iguaçu	2019	31	4	M	A	-	Não usa	-

^aS: subsistência, M: no município; ^bE: no estado; A: com água, D: com desinfetante; ^c+: realiza; -: não realiza; ^dTtm: tratamento, Prc: promotor de crescimento, Pfx: profilaxia; ^eAmx: amoxicilina, Cef: cefotiofur, Enr: enrofloxacina, Estreptomina, Flor: florfenicol, Gen: gentamicina, Lin: lincamicina, Nor: norfloxacina, Pen: penicilina, Sut: sulfá-trimetoprim, Tet: tetraciclina, Til: tilosina.

Tabela 13. Dados demográficos e epidemiológicos dos contatos humanos de suínos das granjas incluídas no estudo obtidos por questionário.

Humano	Granja	Função ^a	Idade	Sexo ^b	Cor ^c	Uso de antimicrobiano ^d	Diarreia ^{e,f}	Lesão pele ^e	Hospitalização ^{g,h}	CPH ^{e,h}	CTH ^{e,i}	COA ^{e,j}
HSN01	A	Cri, Tra	30	M	B	-	-	-	-	-	-	boi, cão, gato
HSN02	B	Tr	53	M	B	-	-	-	-	-	-	boi, cão, gato
HSN03	A, B, C	Vet	49	M	B	-	-	-	-	-	-	boi, cabra, cão, cavalo, gato
HSN04	E	Vet	38	M	B	Amx	-	-	-	-	+	boi, cavalo, coelho
HSN05	E	Tra	46	M	N	Amx	-	-	-	+	-	-
HSN06	K	Vet	33	M	B	-	-	-	-	-	-	cabra, cavalo, frango
HSN07	K	Tra	58	M	B	-	-	-	-	-	-	-
HSN08	K	Est	24	F	B	-	-	-	-	-	-	-
HSN09	K	Tra	48	M	P	-	-	-	-	-	-	-
HSN10	K	Est	24	F	B	-	-	-	-	-	-	-
HSN11	L	Enc	21	M	N	Amx, Cfl	+	-	+	+	-	-
HSN12	L	Tra	62	M	B	+	-	-	-	-	-	cão
HSN13	L	Tra	33	M	N	-	-	-	-	-	-	-
HSN14	L	Tra	42	M	P	-	-	-	-	-	-	cão
HSN15	M	Cri, Tra	60	M	P	-	-	-	-	-	-	frango

HSN16	N	Tra	77	M	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSN17	N	Tra	18	M	B	-	-	-	-	-	-	-	-	cão
HSN18	N	Tra	37	M	N	-	-	-	-	-	-	-	-	cão
HSN19	N	Tra	26	M	P	-	-	-	-	-	-	-	-	cão
HSN20	N	Adm	51	F	B	-	-	-	-	-	-	-	-	cão
HSN21	O	Vet	56	M	B	-	-	-	-	-	-	-	-	gato
HSN22	O	Tra	59	M	B	-	-	-	-	-	-	-	-	cavalo, frango
HSN23	O	Tra	31	F	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSN24	O	Tra	67	M	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSN25	O	Tra	59	F	B	-	-	-	-	-	-	-	-	cavalo, frango
HSN26	O	Tra	34	F	B	-	-	-	-	-	-	-	-	cavalo, frango
HSN27	P	Cri	69	M	B	-	-	-	-	-	-	-	-	cavalo
HSN28	P	Tra	45	M	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSN29	P	Tra	22	M	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aAdm: administrador, Cri: criador, Enc: encarregado, Est: estagiário em veterinária, Vet: veterinário, ^bF: feminino, M: masculino, ^cB: branca, P: parda, N: negra, ^dNos últimos 6 meses, +: usou, mas não lembra qual; -: não usou; Amx: usou amoxicilina; Cfl: usou cefalexina, ++: sim, -: não; ^eNos últimos 6 meses; ^fNos últimos 12 meses; ^gCPH: contato domiciliar com pessoa hospitalizada nos últimos 6 meses; ^hCTH: contato domiciliar com indivíduo que trabalhou em hospital/unidade de saúde nos últimos 6 meses; ⁱCOA: contato com outros animais além de suínos.