



DESDE 1902
**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização molecular de estafilococos
associados a infeções da pele e tecidos moles**

Maria de Fátima Sabarigo Serrano

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE TROPICAL E INTERNACIONAL

OUTUBRO, 2019



DESDE 1902
**INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL**
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização molecular de estafilococos associados a infeções da pele e tecidos moles

Autora: Maria de Fátima Sabarigo Serrano

Orientadora: Doutora Sofia Santos Costa

Coorientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Especialidade em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

Apoio financeiro do projeto BIOSAFE, ref^a LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTDC/CAL-EST/30713/2017, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER)/Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

Parte dos resultados apresentados nesta Dissertação foram objeto de apresentação, em co-autoria, da seguinte comunicação:

Maria Serrano, Sofia Santos Costa, Constança Pomba, Isabel Couto. 2019. Staphylococcal clonal lineages associated with skin and soft tissue infections in humans and pets. P153. Congresso de Microbiologia e Biotecnologia, MicroBiotec'19, 5 a 7 de dezembro, 2019, Coimbra, Portugal.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer a diversas pessoas pela realização deste trabalho.

Agradeço em primeiro lugar à minha orientado, a Doutora Sofia Santos Costa, por toda a transmissão de conhecimento, pelo apoio e ajuda prestados ao longo deste ano e deste trabalho.

À minha co-orientadora, a Professora Doutora Isabel Couto, por me ter aceite no seu laboratório e pela confiança para participar neste enorme projeto.

À Professora Doutora Constança Pomba por ceder as coleções de estafilococos para o estudo e por me deixar utilizar o seu laboratório na Faculdade de Medicina Veterinária.

À Doutora Manuela Oliveira por disponibilizar e confiar em mim para a utilização do aparelho de eletroforese em campo pulsado, sem ela muito deste trabalho não teria sido possível.

Às minhas colegas de laboratório Catarina Morais, Maria Carolina Ferreira, Rute Ribeiro e Valéria Oliveira por se disponibilizarem a me prestarem ajuda sempre que podiam.

À unidade de microbiologia médica, nomeadamente ao Professor Doutor Miguel Viveiros, à Doutora Diana Machado e ao Jorge Ramos pela transmissão de informação e ajuda quando necessária.

Às senhoras da central de esterilização do instituto pela preocupação e disponibilização das soluções necessárias sempre a tempo.

Ao pessoal que me acompanhou na Faculdade de Medicina Veterinária e que me ajudou quando necessário, nomeadamente a aluna de doutoramento Adriana Belas.

À Professora Doutora Maria Luísa Vieira e à Doutora Teresa Carreira por disponibilizarem algum material, me ensinarem a utilizar alguns dos equipamentos e por estarem sempre dispostas a ajudar no que podiam.

A todos os professores que me acompanharam durante este processo, quer tenha sido no início ou mesmo no final.

AGRADECIMENTOS

Às minhas colegas de almoço Inês Morais, Márcia Sousa e Rute Ribeiro por me acompanharem nesta experiência facilitando a partilha de ideias.

Agradeço mais uma vez à Rute Ribeiro, mas também à Miriam Arrulo por tornarem possível a entrega da minha tese a tempo e horas.

Agradeço, sobretudo, aos meus queridos pais e manos pelo investimento que tem feito pelo meu futuro, ao me possibilitarem a continuação dos estudos e me facultando tudo o que conseguem.

Aos meus manos e à minha cunhada Mónica por me facilitarem a vida nas deslocações para conseguir chegar ao instituto, mesmo que isso dificultasse as deles.

Agradeço ainda à minha cunhada Mónica pela partilha da experiência dela comigo e por me abrir sempre os olhos de como seria, para que estivesse preparada para os momentos bons, mas também para as dificuldades.

À minha avó Maria pelos beijinhos de boa viagem e ao meu Pinguças pela alegria de quando regresso a casa fazendo parecer que nunca sai.

Aos meus tios por serem os meus segundos pais nesta etapa e por toda a ajuda, disponibilidade, quilinhos e paciência que tem tido comigo ao longo destes últimos anos.

Aos meus primos Sílvia e Vasco por me acompanharem e apoiarem ao longo destes últimos anos da minha vida e em todo o processo.

A todos os meus amigos pelo apoio e pela força que me dão para continuar, mas principalmente às que foram minhas colegas de universidade em Évora e que também se encontram na mesma posição que eu, como aluna de mestrado.

Também não posso deixar de agradecer à minha melhor amiga Daniela por toda a força, por acreditar em mim e não me deixar baixar a cabeça perante as dificuldades.

Agradeço por último ao meu namorado por nunca me deixar desistir, mesmo quando senti as coisas menos bem, fazendo me ver sempre o lado positivo e apoiando para que continuasse em frente como investimento no meu futuro.

A todos o meu enorme obrigada!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de estafilococos associados a infecções de pele e tecidos moles (SSTIs) em humanos ou animais de companhia e identificar as principais linhagens clonais presentes nas coleções estudadas. A coleção compreende todos os isolados associados a SSTIs identificados como *S. aureus* (n=55), *S. epidermidis* (n=14) ou *S. schleiferi* (n=27) em dois laboratórios de pesquisa veterinária em Lisboa, durante 19 anos (1999-2018); bem como isolados de *S. aureus* (n=34) de origem humana associados a SSTIs identificados em um laboratório de diagnóstico clínico em Lisboa, de fevereiro a junho de 2014.

Todos os isolados de estafilococos foram submetidos a tipificação molecular por análise dos perfis de macrorestrição por *Sma*I, que foram resolvidos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os perfis de macrorestrição foram analisados com o auxílio do software *Bionumerics*, utilizando o algoritmo UPGMA. Os isolados de *S. aureus* representativos de cada pulstipo foram selecionados para posterior tipificação por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST), realizada de acordo com o esquema disponível no banco de dados PubMLST. Para representação das possíveis relações entre linhagens clonais, o *freeware* PHYLOViZ foi usado com o algoritmo *goeBurst*.

A coleção de *S. epidermidis* associados a animais de companhia foi a mais diversa (índice Simpson, SID = 0,93), enquanto a coleção de *S. schleiferi* foi a menos diversa (SID = 0,68). Relativamente a *S. aureus*, a coleção de origem humana (SID = 0,92) foi mais diversa que a de origem animal (SID = 0,84). As linhagens clonais de *S. aureus* identificadas por MLST corroboram a tipificação por *Sma*I-PFGE. Entre os isolados de origem humana, as linhagens pertencentes a CC5 (ST5, New1, ST105) foram as mais frequentes (11/34 isolados), enquanto que o CC22 (ST22) foi o mais frequente entre os isolados animais (25/55 isolados). Algumas linhagens clonais encontradas (ST5, ST105, ST7, ST72, ST97, ST15, ST22) foram detetadas em *S. aureus* tanto de origem humana como animal. De um modo geral, as linhagens clonais encontradas em animais refletem os clones de *S. aureus* prevalentes a nível hospitalar.

Este estudo indica uma elevada diversidade das várias espécies de estafilococos associados a SSTIs em animais de companhia ou humanos. Os resultados obtidos apontam ainda para a presença frequente de linhagens de *S. aureus* nosocomiais associadas à comunidade, tanto em humanos quanto em animais.

Palavras-chave: estafilococos, SSTIs, clonalidade, humanos, animais.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of staphylococci associated with skin and soft tissue infections (SSTIs) in humans or companion animals and to identify the main clonal lineages present in the collections studied. The collections comprise all isolates associated with SSTIs identified as *S. aureus* (n=55), *S. epidermidis* (n=14) or *S. schleiferi* (n=27) in two veterinary research laboratories in Lisbon, over 19 years (1999-2018); as well as isolates of *S. aureus* (n=34) associated with human SSTIs identified in a clinical diagnostic laboratory in Lisbon from February to June 2014.

All staphylococcal isolates were subjected to molecular typing by analysis of *Sma*I macrorestriction profiles, which were resolved by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The macrorestriction profiles were analysed with the aid of the *Bionumerics* software, using the UPGMA algorithm. *S. aureus* isolates representative of each pulsotype were selected for further characterization by multilocus sequence typing (MLST), performed according to the scheme available in the PubMLST database. Possible relationships between clonal lineages were inferred with the PHYLOViZ freeware together with the *goeBurst* algorithm.

The *S. epidermidis* collection associated with SSTIs in pets was the most diverse (Simpson's index, SID = 0,93) whereas *S. schleiferi* was the collection with less genetic diversity (SID = 0,68). Regarding *S. aureus*, the isolates of human origin presented a higher genetic diversity (SID = 0,92) when compared with *S. aureus* of animal origin (SID = 0,84). The *S. aureus* clonal lineages identified by MLST corroborated *Sma*I-PFGE typing. Amongst the isolates of human origin, the lineages belonging to CC5 (ST5, New1, ST105) were the most frequent (11/34 isolates) whereas CC22 (ST22) was the most frequent among animal isolates (25/55 isolates). Some of the clonal lineages found (ST5, ST105, ST7, ST72, ST97, ST15, ST22) were detected among *S. aureus* of both human and animal origins. In the overall, the lineages present in the animal strains reflected the prevalent clones of hospital origin.

This study indicates the high diversity of various staphylococcal species associated with SSTIs in companion animals or humans. Of utmost importance, our findings pinpoint the frequent presence of nosocomial associated *S. aureus* lineages among strains from human or animal SSTIs outside the hospital environment.

Key words: staphylococci, SSTIs, clonality, humans, animals.

ÍNDICE GERAL

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS.....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE GERAL	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E DE UNIDADES	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Género <i>Staphylococcus</i>.....	1
1.1.1. Características gerais	1
1.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
1.1.4. <i>Staphylococcus schleiferi</i>	4
1.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos	5
1.2.1. Principais mecanismos de ação dos antibióticos	5
1.2.2. Principais mecanismos de resistência aos antibióticos.....	6
1.2.3. Evolução da resistência aos antibióticos em estafilococos.....	8
1.3. Tipificação molecular.....	10
1.3.1. Eletroforese em campo pulsado.....	10
1.3.2. Sequenciação de múltiplos <i>loci</i>	11
1.3.3. Outros métodos moleculares de tipificação.....	12

1.4. Diversidade e dispersão clonal do género <i>Staphylococcus</i>	14
1.4.1. <i>S. aureus</i> de origem humana	14
1.4.2. <i>S. aureus</i> de origem animal	18
1.4.3. <i>S. epidermidis</i> de origem animal	21
1.4.4. <i>S. schleiferi</i> de origem animal	23
1.5. Objetivos da Dissertação	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Material	25
2.1.1. Estirpes bacterianas	25
2.1.2. Outro material biológico	29
2.1.3. Meios de cultura, enzimas e soluções	30
2.2. Métodos	32
2.2.1. Manutenção e crescimento dos isolados	32
2.2.2. Tipificação molecular por resolução de perfis de macrorestrição por PFGE	32
2.2.3. Identificação por PCR da linhagem clonal ST398 de <i>S. aureus</i>	35
2.2.4. Tipificação por sequenciação de múltiplos <i>loci</i>	36
2.2.5. Cálculo de diversidade genética	38
3. RESULTADOS	39
3.1. Tipificação molecular por análise de perfis de macrorestrição	39
3.2. Identificação da linhagem clonal <i>S. aureus</i> ST398	44
3.3. Tipificação por sequenciação de múltiplos <i>loci</i>	45
3.4. Diversidade genética das coleções em estudo	47
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	49
4.1. Problemáticas	49
4.1.1. Técnicas de tipificação	49

4.1.2. Sistemas de classificação dos perfis de macrorestrição.....	49
4.2. Clonalidade da coleção de <i>S. aureus</i> de origem humana.....	50
4.3. Clonalidade da coleção de <i>S. aureus</i> de origem animal	52
4.4. <i>S. epidermidis</i> de origem animal.....	56
4.5. <i>S. schleiferi</i> de origem animal	56
4.6. Considerações finais.....	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema clínico e epidemiológico das principais espécies de estafilococos, baseado na coagulase como fator de virulência e no impacto na saúde humana e animal	2
Figura 2.	Principais mecanismos de ação de antibióticos e mecanismos de resistência aos antibióticos em estafilococos	7
Figura 3.	Esquema ilustrativo da resolução de perfis de macrorestrição pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado	11
Figura 4.	Esquema ilustrativo da técnica de tipificação por sequenciação de múltiplos <i>loci</i>	12
Figura 5.	Diversidade e dispersão clonal de <i>S. aureus</i> de origem humana nos diferentes continentes e em Portugal	16
Figura 6.	Diversidade e dispersão clonal de <i>S. aureus</i> de origem animal nos diferentes continentes e em Portugal	19
Figura 7.	Diversidade e dispersão clonal de <i>S. epidermidis</i> de origem animal nos diferentes continentes e em Portugal	21
Figura 8.	Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 34 isolados de <i>S. aureus</i> de origem humana	39
Figura 9.	Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 55 isolados de <i>S. aureus</i> de origem animal	41
Figura 10.	Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 14 isolados de <i>S. epidermidis</i> de origem animal	42
Figura 11.	Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 27 isolados de <i>S. schleiferi</i> de origem animal	43
Figura 12.	Análise dos produtos de PCR para identificação da linhagem clonal ST398 em <i>S. aureus</i> de origem animal por amplificação de sequências A07 e C01 em gel de agarose a 1%	44
Figura 13.	Análise dos produtos de PCR para identificação da linhagem clonal ST398 em <i>S. aureus</i> de origem animal em gel de agarose a 1%	44

Figura 14.	Diversidade das linhagens clonais presentes nas coleções de <i>S. aureus</i> associados a SSTIs em humanos e animais de companhia	53
Figura 15.	Análise comparativa das linhagens clonais identificadas nas duas coleções de <i>S. aureus</i> e distribuição de estirpes MSSA/MRSA	54
Figura 16.	Linhagens clonais de <i>S. aureus</i> associados a SSTIs de origem animal ao longo do tempo	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Dispersão e diversidade clonal de <i>S. aureus</i> de origem humana	17
Tabela 2.	Dispersão e diversidade clonal de <i>S. aureus</i> de origem animal	20
Tabela 3.	Dispersão e diversidade clonal de <i>S. epidermidis</i> de origem animal	22
Tabela 4.	Origem e data de isolamento dos 34 isolados de <i>S. aureus</i> de origem humana estudados neste trabalho	25
Tabela 5.	Origem e data de isolamento dos 55 isolados de <i>S. aureus</i> de origem animal recolhidos num laboratório de investigação veterinária ou laboratório de diagnóstico veterinário	26
Tabela 6.	Origem e data de isolamento dos 14 isolados de <i>S. epidermidis</i> de origem animal recolhidos num laboratório de investigação veterinária ou laboratório de diagnóstico veterinário	27
Tabela 7.	Origem e data de isolamento dos 27 isolados de <i>S. schleiferi</i> de origem animal recolhidos num laboratório de investigação veterinária ou laboratório de diagnóstico veterinário	28
Tabela 8.	Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados neste estudo e tamanho esperado de cada amplificação	29
Tabela 9.	Composição dos meios de cultura usados neste trabalho	30
Tabela 10.	Enzimas utilizadas ao longo deste trabalho	30
Tabela 11.	Composição e preparação das soluções utilizadas neste trabalho	31
Tabela 12.	Condições usadas na análise de perfis de macrorestrição por PFGE	34
Tabela 13.	Programa de amplificação para identificação da linhagem clonal ST398 de <i>S. aureus</i>	35
Tabela 14.	Programa de amplificação do MLST	36
Tabela 15.	Perfis alélicos e respetivas sequências tipo dos isolados de <i>S. aureus</i> representativos da coleção de origem humana	45
Tabela 16.	Perfis alélicos e respetivas sequências tipo dos isolados de <i>S. aureus</i> representativos da coleção de origem animal	46
Tabela 17.	Grau de diversidade genética das coleções em estudo	47

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Adenina

C – Citosina

CA-MRSA – MRSA associado à comunidade, de *Community-Acquired/Associated MRSA*

CC – Complexo clonal, de *Clonal Complex*

CoNS – Estafilococo coagulase-negativo, de *Coagulase-Negative Staphylococci*

CoPS – Estafilococo coagulase-positivo, de *Coagulase-Positive Staphylococci*

DNA – Ácido desoxirribonucleico, de *Deoxyribonucleic Acid*

dNTPs – Deoxirribonucleótidos trifosfato, de *Deoxynucleotide Triphosphate*

DO₆₂₀ – Densidade ótica a 620 nm

EtBr – Brometo de etídio

G – Guanina

HA-MRSA – MRSA associado ao ambiente hospitalar, de *Hospital-Acquired/Associated MRSA*

LA-MRSA – MRSA associado a animais de produção, de *Livestock-Associated MRSA*

MLST – Tipificação por sequenciação de múltiplos *loci*, de *Multilocus Sequence Typing*

mRNA – RNA mensageiro, de *messenger RNA*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, de *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina, de *Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus*

NCTC – *National Collection of Type Cultures* (EUA)

PAB – Ácido paraaminobenzóico, de *P-AminoBenzoic acid*

PBP – Proteína de ligação à penicilina, de *Penicillin Binding Protein*

PCR – Reação em cadeia da polimerase, de *Polymerase Chain Reaction*

PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado, de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

RNA – Ácido ribonucleico, de *Ribonucleic Acid*

SCCmec – Cassete cromossomal *mec* de *Staphylococcus*, de *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

SLV – Variação num único *loci*, de *Single Locus Variant*

SSTIs – Infecções da pele e tecidos moles, de *Skin and Soft Tissue Infection*

LISTA DE ABREVIATURAS E DE UNIDADES

ST – Sequência tipo, de *Sequence Type*

T – Timina

TLV – Variação em três *loci*, de *Triple Locus Variant*

tRNA – RNA transportador, de *transfer RNA*

TSA – Agar tríptico de soja, de *Tryptone Soya Agar*

TSB – Caldo tríptico de soja, de *Tryptone Soya Broth*

UPGMA – Método de agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas, de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*

VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência intermédia à vancomicina, de *Vancomycin Intermediate-resistant Staphylococcus aureus*

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina, de *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*

LISTA DE UNIDADES

°C – Graus Celsius

cm – Centímetro; µm – Micrómetro; nm – Nanometro

g – Grama; mg – Miligrama

Kb – Kilobases; pb – Par de bases

L - Litro; mL – Mililitro; µL – Microlitro

M – Molar; µM – Micromolar

min – Minuto

rpm – Rotações por minuto

V – Volt

1. INTRODUÇÃO

1.1. Género *Staphylococcus*

1.1.1. Características gerais

As bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* caracterizam-se por apresentarem uma coloração Gram-positiva e por serem cocos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro que ocorrem isolados, aos pares, em cadeias ou em cachos. Estas bactérias são imóveis e não esporogénicas. A maioria das espécies deste género são ainda catalase-positivas, oxidase-negativas e anaeróbias facultativas. O conteúdo GC dos estafilococos varia de 27 a 41 mol% e o tamanho do genoma apresenta entre 2000 e 3000 kb [1-3].

O género *Staphylococcus* engloba 54 espécies e 28 subespécies [4] e é comumente dividido em dois grandes grupos, com base na produção da enzima coagulase; estafilococos coagulase-positivos (CoPS, de *Coagulase-Positive Staphylococci*) e em estafilococos coagulase-negativos (CoNS, de *Coagulase-Negative Staphylococci*) (Figura 1). No grupo dos CoPS encontram-se as espécies mais frequentemente associadas a doença em humanos, como é o caso de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, e em animais, como *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* [1-3]. As patologias associadas a estas espécies são várias; entre as infeções mais comuns contam-se infeções respiratórias, infeções da pele e tecidos moles, infeções do trato urinário, endocardites, septicemias e osteomielites [1, 2, 5]. No entanto, a maioria das espécies pertence ao grupo dos CoNS, algumas das quais tendo ganho, nas últimas décadas, reconhecimento como agentes patogénicos oportunistas associados a uma variedade de infeções nosocomiais em humanos e/ou animais imunocomprometidos [2, 3, 6]. Entre estas espécies não produtoras de coagulase encontra-se *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* [1, 2, 7]. As doenças mais frequentemente associadas a CoNS são septicemias, endocardites, osteomielites, peritonites, infeções do trato urinário e infeções associadas à implantação de material protético [1, 2].

Os estafilococos encontram-se dispersos pela natureza [1]. Muitas das espécies são comensais da pele e das mucosas do Homem e de outros animais, fazendo parte da microflora destes de forma permanente ou transiente [1-3, 7]. As espécies encontradas

1 INTRODUÇÃO

com maior frequência na pele de humanos são *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Staphylococcus hominis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* [1, 2]. Estas espécies são encontradas geralmente nas glândulas sudoríparas e nas membranas mucosas que rodeiam as aberturas corporais, como por exemplo, as fossas nasais [1-3]. Na pele dos animais de companhia podemos encontrar de forma frequente *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. schleiferi*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *Staphylococcus felis*, entre outras [1, 2].

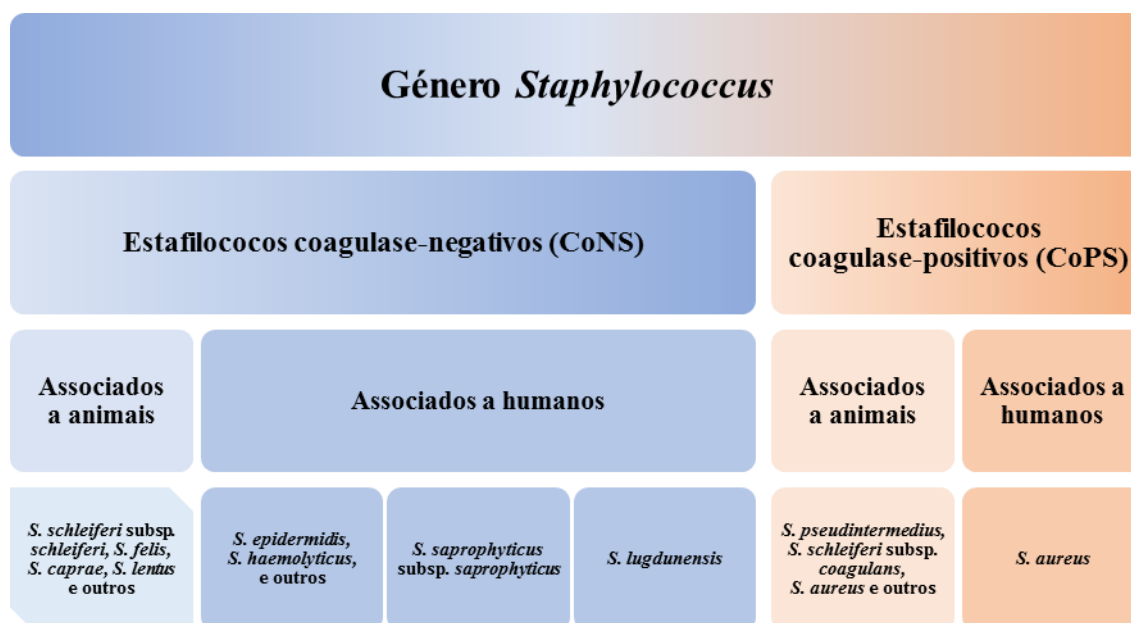


Figura 1. Esquema clínico e epidemiológico das principais espécies de estafilococos, baseado na coagulase como fator de virulência e no impacto na saúde humana e animal [7].

1.1.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é a espécie de maior significado clínico em humanos, por ser um agente patogénico frequente associado a uma elevada taxa de mortalidade e morbilidade [1]. *S. aureus* tem a capacidade de colonizar assintomaticamente indivíduos saudáveis [8], estimando-se que cerca de um terço da população se encontra colonizada. Este é considerado um fator importante na transmissão deste agente patogénico, a qual pode ocorrer por contacto direto entre humanos, mas também entre humanos e animais [9, 10]. Os fatores de virulência associadas à espécie e os fatores debilitantes do hospedeiro predispõem este a uma infeção de severidade variada, como infeções da pele e tecidos moles, pneumonia, infeções oculares, osteomielite, artrite séptica, endocardite, infeções do sistema nervoso central, e septicemia, assim como a síndrome da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico [11-13]. *S. aureus* também apresenta a capacidade de causar infeção em animais, sendo as mais comuns mastites, artrites, furúnculos, dermatite supurativa e septicemia [1, 14, 15].

1.1.3. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis é o principal colonizador da epiderme humana, mas está também muitas vezes associado a infeções oportunistas, resultantes do crescente número de doentes hospitalares imunocomprometidos, de procedimentos cirúrgicos invasivos e da implantação de material protético como cateteres e próteses [1, 2, 7, 16, 17]. Esta espécie está associada a septicemias, endocardites, osteomielites, peritonites e infeções do trato urinário como cistites, uretrites e pielonefrites [1, 7, 17]. *S. epidermidis* também está associado a mastite em bovinos e a infeções da pele e tecidos moles, conjuntivites, otites e infeções do trato urinário em animais de companhia [18]. Um dos fatores que confere características crónicas a estas infeções é a capacidade de *S. epidermidis* produzir biofilmes, os quais protegem estas bactérias da ação tóxica de antibióticos utilizados no seu tratamento [6, 7, 17, 19].

1.1.4. *Staphylococcus schleiferi*

A espécie *S. schleiferi* encontra-se dividida em duas subespécies, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, as quais podem ser diferenciadas por várias características incluindo a produção de coagulase e de urease [20, 21]. Enquanto *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* não produz coagulase ou urease, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* é produtora de ambas as enzimas [22, 23]. *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* é um agente patogénico oportunista em humanos, associado a infeções de pele, osteomielites, artrite séptica, endocardite, empiema cerebral, bacteremia e infeções associadas à implantação de material protético [7, 24]. Em animais, esta subespécie tem sido associada a infeções dermatológicas e otológicas [23]. Por sua vez, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* é um agente patogénico oportunista em cães, associado a infeções de pele e otites [22, 25]. No entanto, a sua associação a infeções em humanos é rara, tendo sido apenas reportada esporadicamente [23, 26-28]. A espécie *S. schleiferi* é mais frequentemente encontrada em cães do que em gatos, e em casos de infeções de pele superficiais recorrentes, nas quais o animal tenha sido sujeito a antibioterapia prévia. É ainda considerada a segunda espécie de estafilococos mais frequentemente associada a este tipo de infeções [14, 29, 30].

1.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos em estafilococos

1.2.1. Principais mecanismos de ação dos antibióticos

Os antibióticos são substâncias com a capacidade de inibir o crescimento bacteriano ou provocar a morte das células bacterianas, ajudando o hospedeiro a combater as infecções bacterianas [31, 32]. O primeiro antibiótico a ser descrito foi a penicilina, por Alexander Fleming em 1928 [32-35]. Atualmente, existem várias classes de antibióticos que apresentam diferentes mecanismos de ação sobre as células bacterianas. Os principais mecanismos de ação dos antibióticos são a inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição da síntese proteica, inibição da síntese do ácido fólico e disrupção da integridade da membrana celular [36, 37] (Figura 2).

No conjunto dos inibidores da síntese da parede celular podemos encontrar os β -lactâmicos como a penicilina, a amoxicilina, a ampicilina, as cefalosporinas, os carbapenemos e os glicopéptidos como a vancomicina [36, 37]. O mecanismo de ação dos β -lactâmicos baseia-se na sua ligação às enzimas *Penicillin Binding Protein* (PBP) envolvidas na síntese da parede celular, inibindo um dos passos da síntese de peptidoglicano, a transpeptidação [8, 38]. O mecanismo de ação da vancomicina passa pela sua ligação aos precursores D-alanina-D-alanina, impedindo que as PBPs os incorporem na parede celular. Esta ação leva à interrupção da síntese da parede celular e, consequentemente, à inibição do crescimento bacteriano [39, 40].

No grupo dos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos encontram-se as fluoroquinolonas e as rifamicinas [37]. As fluoroquinolonas inibem a topoisomerase IV e a DNA girase, que participam na síntese de DNA [31]. Por sua vez, as rifamicinas formam um complexo estável com a RNA polimerase, impedindo o início do processo de transcrição do DNA [31].

Várias classes de antibióticos causam a inibição da síntese proteica, como os aminoglicosídeos, as tetraciclina, as oxazolidinonas e os macrólidos [37]. Os aminoglicosídeos ligam-se a proteínas específicas da subunidade ribossomal 30S, provocando leituras incorretas do mRNA [31]. As tetraciclina também se ligam à subunidade ribossomal 30S, bloqueando a ligação do complexo tRNA-aminoácido ao

ribossoma [31]. A linezolida liga-se à subunidade ribossomal 50S impedindo a formação do complexo ribossomal [31]. Os macrólidos também se ligam à subunidade ribossomal 50S impedindo a translocação do ribossoma ao longo do mRNA [31].

As sulfonamidas, análogos estruturais do ácido paraaminobenzóico (PAB), e o trimetoprim, inibem a síntese do ácido fólico por inibição das enzimas dihidropteroato sintetase e dehidrofolato reductase, respetivamente [31]. O antibiótico lipopeptídico daptomicina liga-se à membrana celular, provocando a sua destabilização e posterior disrupção, levando à saída de iões intracelulares essenciais e à morte celular [31].

1.2.2. Principais mecanismos de resistência aos antibióticos

As principais estratégias utilizadas pelas bactérias para sobreviverem à ação dos antibióticos são a inativação enzimática do antibiótico, a modificação do alvo celular, a proteção do alvo bacteriano, o efluxo do antibiótico e a redução da permeabilidade da célula à entrada do antibiótico [37] (Figura 2).

A inativação enzimática consiste na modificação da estrutura molecular do antibiótico por enzimas [37]. Entre os antibióticos afetados por esta estratégia contam-se os β -lactâmicos, através da hidrólise do anel β -lactâmico por β -lactamases, impedindo a sua ligação às PBPs [8, 36, 41]. Outra classe de antibióticos afetada por esta estratégia são os aminoglicosídeos, que são modificados enzimaticamente nos grupos amino ou hidroxilo [34, 42].

Os mecanismos de resistência provocados pela modificação do alvo celular interferem com a ação da vancomicina, das fluoroquinolonas, rifamicinas e dos macrólidos [37]. A aquisição do operão *van* através do transposição (*Tn1546*) com origem em *Enterococcus spp.* promove resistência à vancomicina. Isto porque o gene *vanA* codifica um resíduo diferente, D-Alanina-D-Lactato, um dipéptido ao qual o antibiótico não se consegue ligar [40-42]. A resistência às fluoroquinolonas pode surgir por modificações pontuais nos genes *griA/B* e/ou *gyrA/B*, que codificam para a topoisomerase IV e DNA girase [43], enquanto a resistência à rifampicina ocorre por mutações no gene *rpoB*, que codifica para a subunidade beta da RNA polimerase [42].

A proteção do alvo e *bypass* interfere com a atividade da meticilina, vancomicina, sulfonamidas, trimetopim e tetraciclina [37]. Um dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos ocorre por aquisição de uma PBP adicional (PBP2a), que é codificada pelo gene *mecA*, o qual se encontra numa cassete de origem exógena, *SCCmec*, integrada no cromossoma. A PBP2a apresenta baixa afinidade aos antibióticos β -lactâmicos, garantindo a continuação da síntese da parede celular na presença do antibiótico [8, 36, 41]. Uma estirpe de *S. aureus* que possua o gene *mecA* é classificada como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, de *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*). As estirpes MRSA apresentam resistência a todos os β -lactâmicos, exceto às cefalosporinas de 5ª geração, como é o caso da ceftarolina [8, 36, 41, 44].

Em estafilococos, a redução da permeabilidade da célula foi descrita para estirpes *S. aureus* com resistência intermédia à vancomicina (VISA, de *Vancomycin Intermediate-resistant Staphylococcus aureus*) por aumento da produção dos resíduos D-Alanina-D-Alanina, resultando no espessamento da parede celular e limitando a ligação do antibiótico ao seu alvo [40, 41, 45].

O efluxo previne a interação antibiótico-alvo, através da redução da concentração de antibiótico no interior da célula [42]. Esta estratégia de resistência afeta as fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos, entre outros [37].

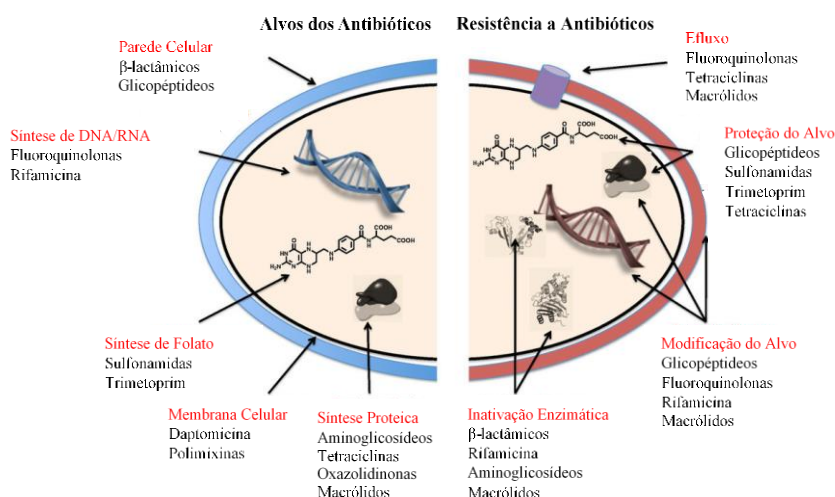


Figura 2. Principais mecanismos de ação de antibióticos e mecanismos de resistência aos antibióticos em estafilococos [37].

1.2.3. Evolução da resistência aos antibióticos em estafilococos

A descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming teve um grande impacto na terapêutica das infecções bacterianas, incluindo as causadas por estafilococos [31-35, 46]. A penicilina foi introduzida na prática clínica no início da década de 1940 [46], mas nos anos seguintes surgiram os primeiros casos de resistência a este antibiótico [31-35, 46], relacionados com a produção de β -lactamases codificadas pelo gene *blaZ* [8, 36, 41]. Nas décadas seguintes, foram descobertos e introduzidos na prática clínica antibióticos pertencentes a classes diferentes os aminoglicosídeos, mais concretamente, a estreptomicina [32, 35, 46]; as cefalosporinas [32]; as tetraciclina [32, 35, 46] e os macrólidos, como a eritromicina [32]. No entanto, a emergência de resistência a estes antibióticos foi surgindo logo após a introdução destes antibióticos na antibioterapia [32, 35, 42, 46]. Nos anos 60, foi desenvolvida a metilicina, um β -lactâmico semissintético não inativado por β -lactamases [33]. Todavia, os primeiros relatos de resistência a este antibiótico surgiram um ano mais tarde [32, 33, 35, 46]. Desde a emergência das estirpes MRSA nos anos 1960 surgiram os antibióticos das classes das fluoroquinolonas e a oxazolidinonas [32]. Uma vez mais, foram necessários poucos anos para surgirem os primeiros casos de resistência [32]. O aumento de infecções por MRSA com resistência a múltiplos antibióticos levou a um maior uso de vancomicina [11, 47]. As estirpes de *S. aureus* com resistência intermédia à vancomicina (VISA) estão associadas a antibioterapias prolongadas [8, 47]. No final dos anos 1990, foram documentados os primeiros casos de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA, de *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*) [32, 46]. A primeira estirpe VRSA descrita na Europa foi isolada em Portugal, no ano de 2013 numa estirpe MRSA da linhagem clonal ST105 [48]. Entre os fatores que têm contribuído para a emergência e disseminação da resistência aos antibióticos em *S. aureus* e outras bactérias encontram-se a pressão seletiva exercida pela utilização inadequada e em larga escala de antibióticos, especialmente em ambientes hospitalares e como promotores do crescimento animal [35, 41, 49-51]. *S. aureus* é notável na sua capacidade de adquirir resistência a antibióticos. Durante décadas, MRSA foi sobretudo nosocomial podendo atingir e até ultrapassar os 50% dos *S. aureus* de infecções graves (EUA, Europa, entre outros) [52]. No entanto, durante a década de 1990, houve um aumento no número de estirpes em indivíduos sem exposição prévia a este ambiente, sendo essas estirpes denominadas de CA-MRSA (MRSA associado à

comunidade, de *Community-Acquired/Associated* MRSA). As estirpes CA-MRSA eram, ao princípio, distinguíveis das estirpes HA-MRSA (MRSA associado ao ambiente hospitalar, de *Hospital-Acquired/Associated* MRSA) pela sua menor resistência a antibióticos, mas sobretudo pela sua maior virulência [8]. Nas últimas duas décadas, as taxas de infecções por CA-MRSA aumentaram rapidamente entre a população em geral. Este aumento foi acompanhado por um desvanecer nas distinções entre estirpes HA-MRSA e CA-MRSA [53]. Portugal é um país com alta prevalência de MRSA nosocomial. Todavia, nos últimos anos as estirpes de MRSA associadas a ambiente hospitalar têm rapidamente dispersado para a comunidade [34]. Para além dos humanos, os animais também podem estar colonizados e infetados por MRSA [34, 46], podendo atuar como reservatórios de estirpes resistentes [54]. Em 2005, estirpes MRSA associadas a animais de produção (LA-MRSA, de *Livestock-Associated* MRSA), pertencentes à linhagem clonal ST398, emergiram em suínos e foram posteriormente descritas em vitelos, cavalos, cães e gatos [54]. Foi igualmente documentada a capacidade destas estirpes de causar infeção em humanos [54]. No nosso país a linhagem clonal ST398 associada a LA-MRSA pode ser encontrada em estirpes MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina, de *Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus*) e CA-MRSA em humanos [55, 56].

1.3. Tipificação molecular

A diferenciação de estirpes bacterianas baseou-se, inicialmente, em características fenotípicas [57, 58]. Contudo, o progresso que se tem observado nas últimas décadas na área da biologia molecular permitiu o desenvolvimento de diversas técnicas de tipificação baseadas na amplificação de ácidos nucleicos. O recurso à tipificação molecular tem possibilitado um avanço notável no conhecimento que temos acerca da epidemiologia molecular de diversos agentes patogénicos, em particular sobre a sua evolução, transmissão e emergência de determinadas características como a resistência aos antimicrobianos [57-59]. A aplicação destas técnicas tem tido enorme repercussão no controlo e prevenção de doenças infecciosas em ambiente hospitalar e na comunidade [59, 60].

Vários métodos de tipificação molecular têm sido desenvolvidos e otimizados para o estudo de estafilococos, em particular para *S. aureus*. Estes métodos apresentam diferenças no seu poder discriminatório, reprodutibilidade, custos e trabalho envolvido. Os métodos mais utilizados são a análise de perfis de macrorestrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE, de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) e a sequenciação de múltiplos loci (MLST, de *Multilocus Sequence Typing*) [8, 19, 60-64].

1.3.1. Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) consiste na digestão do DNA genómico de determinado microrganismo com enzimas de restrição cujos locais de corte ocorrem raramente nesse genoma. Os fragmentos de alto peso molecular obtidos na digestão são separados em gel de agarose através de um campo elétrico pulsado. A alteração constante do campo elétrico permite uma mudança na direção do movimento do DNA, possibilitando a separação de fragmentos de grande dimensão de acordo com seu peso molecular [8, 64] (Figura 3).

As principais limitações desta técnica são o facto de ser demorada e exigente do ponto de vista de protocolos laboratoriais, o custo elevado e a necessidade de equipamento específico. Para além destes fatores, a padronização do método é difícil limitando a

comparação interlaboratorial e a sua aplicação como ferramenta na vigilância epidemiológica [63, 65]. No entanto, alguns programas bioinformáticos, como o sistema *Bionumerics*, permitem a normalização dos perfis obtidos e comparação intra- e interlaboratorial [62]. A técnica de PFGE continua a ser uma técnica útil para a caracterização de surtos epidêmicos [8, 19, 58]. É uma técnica ainda considerada *gold standard*, uma vez que todas as estirpes são tipáveis e por ter uma boa reprodutibilidade e elevado poder discriminatório [3, 60, 66, 67].

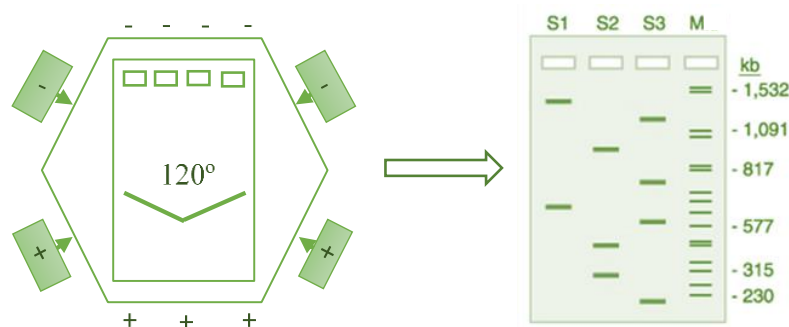


Figura 3. Esquema ilustrativo da resolução de perfis de macrorestrição pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) [Adaptado de <https://uvmgg.fandom.com/>].

1.3.2. Sequenciação de múltiplos *loci* (MLST)

O método de tipificação por MLST consiste na amplificação por PCR e sequenciação de fragmentos internos (com tamanho aproximado de 450 pb) de sete genes essenciais para o funcionamento celular dos organismos (*housekeeping genes*) [11, 61]. As sequências nucleotídicas obtidas são analisadas e comparadas com bases de dados, sendo atribuído um código alélico único a cada sequência. A combinação do código alélico dos sete genes (perfil alélico) corresponde a uma sequência tipo (ST, de *Sequence Type*) (Figura 4). As estirpes cujas sequências tipo diferem por polimorfismos de nucleótido único em menos de 3 *loci* são consideradas intimamente relacionadas e agrupadas em complexos clonais (CC), usando programas bioinformáticos como o PHYLOViZ, que usa o algoritmo *goeBurst* para estabelecer relações entre estirpes [8, 66-68].

O MLST apresenta algumas limitações, como o tempo e custos associados, a necessidade de ter acesso a sequenciação para a sua execução, fatos que condicionam a sua utilização na rotina. Por outro lado, proporciona grande facilidade na comparação interlaboratorial

dos resultados, pela definição simples e inequívoca de tipos facilmente comparáveis e pela disponibilidade de bancos de dados centralizados e de acesso livre, com informação global acerca da estrutura populacional de uma determinada bactéria, que permitem a sua utilização como ferramenta epidemiológica global [63, 65, 66]. O MLST permite assim indexar variações que se acumulam lentamente ao longo do tempo, podendo ser utilizado para medir longos períodos de evolução entre linhagens e é altamente reprodutível [8, 67].

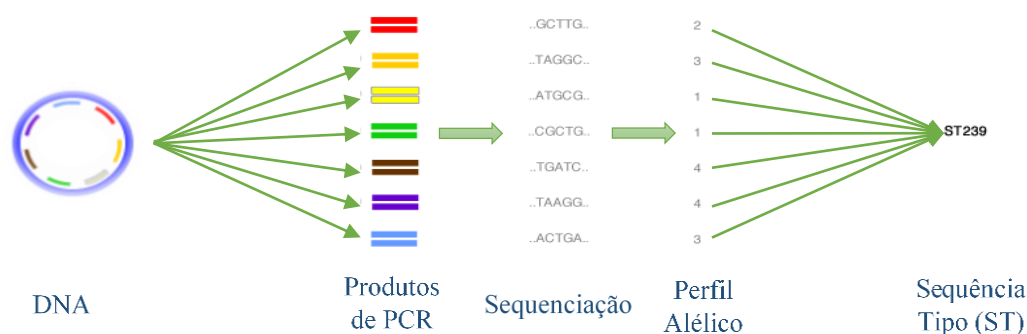


Figura 4. Esquema ilustrativo da técnica de tipificação por sequenciação de múltiplos loci (MLST)
[Adaptado de <http://beta.mlst.net/Instructions/default.html>].

1.3.3. Outros métodos moleculares de tipificação

Existem vários outros métodos moleculares para a tipificação de estafilococos. O método de *spa typing* consiste na amplificação e sequenciação da região polimórfica X do gene que codifica a proteína A, *spa*, de *S. aureus*. Esta região pode ter um número variável de repetições em *tandem* (geralmente de 24 pb), podendo ainda conter mutações pontuais numa dada repetição [8]. O *spa typing* é uma análise relativamente barata, com alto poder discriminatório, que permite adquirir dados robustos para determinar relações epidemiológicas e filogenéticas para *S. aureus*, tendo ainda um alto nível de concordância com métodos como o PFGE e o MLST [8, 60]. Outro método usado na tipificação de CoPS consiste na amplificação do gene *coa*, que codifica para a coagulase, e posterior análise de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) utilizando enzimas de restrição. A diferença dos fragmentos de restrição obtidos é analisada permitindo estabelecer relações entre estirpes [69]. A tipificação molecular por *dru typing* consiste na identificação de diferenças numa zona de 40 pares de bases localizada na cassete

SCCmec, aplicável somente a estirpes MRS (de *Methicillin-Resistant Staphylococci*) [70]. A tipificação por *whole genome sequencing* consiste na sequenciação de todo o genoma de uma estirpe com a redução dos erros associados à sequenciação. Provavelmente será a técnica mais utilizada no futuro, devido à redução de tempo para obtenção de resultados globais, substituindo muitas das outras já existentes [60, 67, 71, 72]. Atualmente a tipificação por *whole genome sequencing* apresenta ainda alguns problemas quanto à validação e implementação de algoritmos bioinformáticos de consenso internacional [73]. Em alguns casos, têm sido desenvolvidas abordagens moleculares para identificar especificamente linhagens clonais de interesse. Um exemplo é o desenvolvimento de uma estratégia baseada em PCR para detecção da linhagem clonal ST398 [74].

1.4. Diversidade e dispersão clonal do género *Staphylococcus*

A tipificação molecular tornou-se uma ferramenta essencial na caracterização epidemiológica de estafilococos, permitindo avaliar a distribuição geográfica e temporal de determinadas linhagens clonais, originando dados que permitem implementar e melhorar medidas para o controlo e prevenção de infeções [8, 75]. A tipificação molecular é ainda importante para a perceção das características fenotípicas e genotípicas dos isolados que circulam num dado espaço geográfico, como virulência ou resistência, e o seu potencial impacto na saúde humana ou animal [60].

1.4.1. *S. aureus* de origem humana

Como referido anteriormente, *S. aureus* é um importante agente clínico, sendo essencial a sua caracterização ou tipificação molecular para a perceção das características do agente envolvido em episódios de colonização ou infeção [8]. A espécie *S. aureus* é altamente clonal [76, 77]. Nos humanos podemos dividir a diversidade de *S. aureus* em três grandes grupos, MSSA, HA-MRSA e CA-MRSA, tendo sido identificado um grupo restrito de linhagens clonais com dispersão global nestas [75, 78-81].

Em relação às estirpes MSSA, encontram-se principalmente quatro linhagens clonais distribuídas mundialmente, correspondentes a ST5, ST30, ST34 e ST45, que posteriormente deram origem a linhagens clonais de MRSA [78]. Na Austrália Ocidental o perfil encontrado é um pouco diferente do resto do mundo, tendo como linhagens clonais MSSA mais comuns a ST15, ST45, ST73 e ST93 [82] (Figura 5). Em Portugal, a linhagem clonal MSSA com maior impacto é a ST30, havendo linhagens com um menor impacto, como a ST1, ST5, ST7, ST8, ST15, ST34, ST72 e ST398 [56]. Em geral, as estirpes MSSA apresentam maior diversidade do que estirpes MRSA [55].

A nível hospitalar, os complexos clonais MRSA com dispersão global por ordem de prevalência são CC5, CC22, CC8 (ST8 e ST239), CC30 (ST36) e CC45 [8, 75, 79, 80] (Figura 5). O complexo clonal CC5, é encontrado sobretudo em isolados da Ásia, América (EUA) e Europa (Alemanha, Espanha, Dinamarca, República Checa e Suíça) [75, 80, 81, 83, 84]. Já o CC22 inclui a linhagem clonal ST22, que teve a sua origem no Reino Unido, mas divergiu separadamente para a Alemanha e para Portugal [81]. O CC22

(ST22) e o CC8 (ST239) são também identificados frequentemente em isolados da Austrália. O complexo clonal CC8 encontra-se na América, na Ásia e na Europa. O CC8 (ST239) e o CC88 (ST88) são ainda predominantes na África [81, 84]. Em Portugal, as linhagens clonais HA-MRSA estão relacionadas com os clones pandémicos mundialmente CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45 [55].

Apesar da distinção entre as estirpes de HA-MRSA e CA-MRSA se estar a desvanecer [53], as CA-MRSA, na sua maioria, estão integradas nos complexos clonais CC8 (ST8), CC30 (ST30 e ST34), CC59 (ST59), CC80 (ST80) e CC93 (ST93) [81]. Ao contrário de HA-MRSA, as CA-MRSA distribuem-se essencialmente por complexos clonais específicos para cada continente, nomeadamente CC8 (ST8) no continente americano, CC30 (ST30) e CC59 (ST59) na Ásia, CC80 (ST80) na Europa e CC93 (ST93) juntamente com o CC30 na Oceânia (Austrália) [81]. A linhagem clonal ST80 é comum na Europa, pensando-se que tenha tido a sua origem no médio oriente ou no norte de África [84, 85] (Figura 5). Alguns dos complexos clonais encontrados na comunidade têm origem hospitalar, por exemplo em Portugal, onde a maioria dos CA-MRSA tem origem hospitalar [55], nomeadamente CC22, que é o HA-MRSA predominante no país [81, 86, 87].

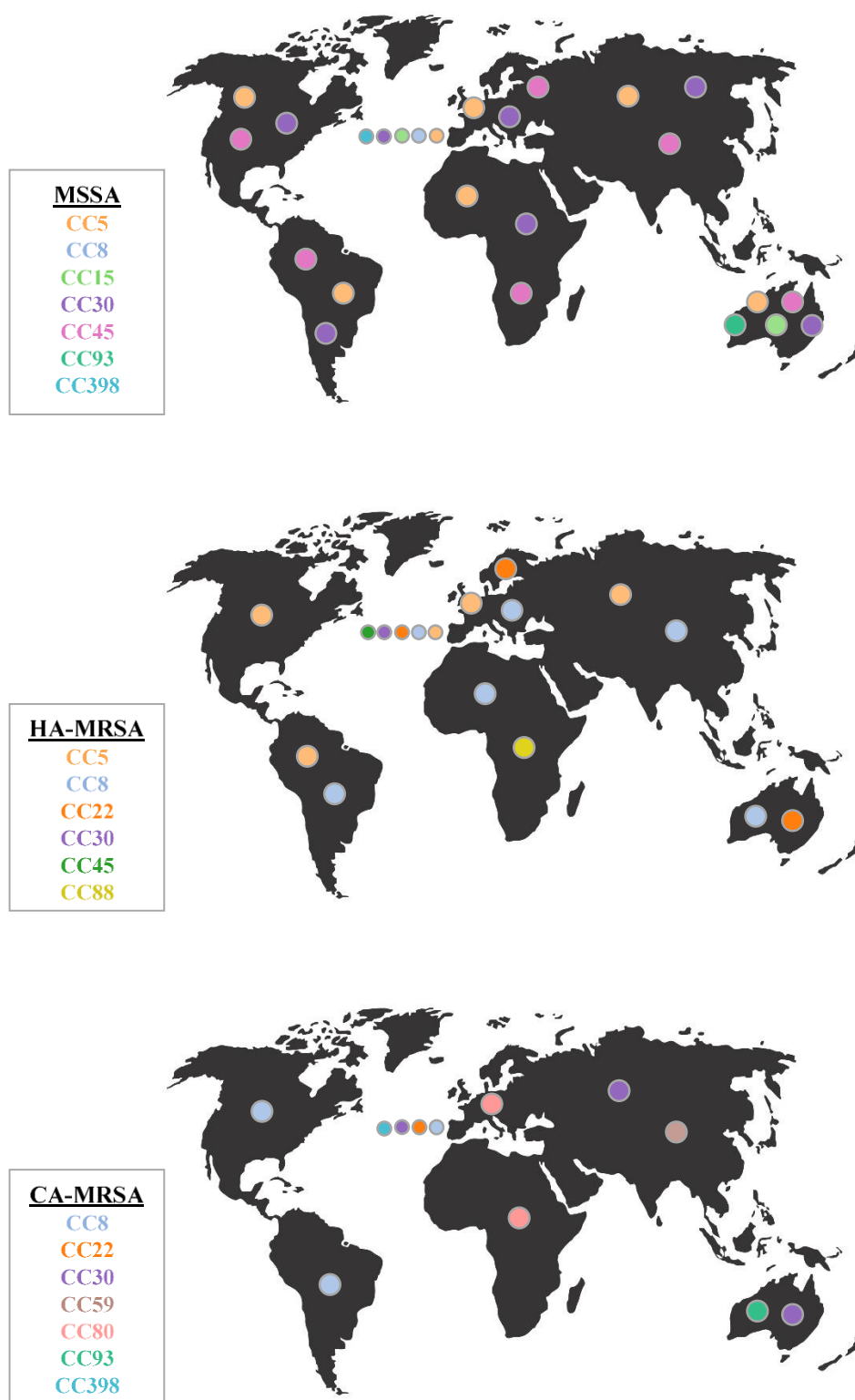


Figura 5. Diversidade e dispersão clonal de *S. aureus* de origem humana nos diferentes continentes e em Portugal.

Tabela 1. Dispersão e diversidade clonal de *S. aureus* de origem humana.

Tipo de <i>S. aureus</i>	Complexo Clonal (CC)	Sequência Tipo (ST)	Localização Geográfica	Referências Bibliográficas
MSSA	CC5	ST5, ST73	Mundial	[56, 78, 82]
	CC15	ST15	Austrália Ocidental	[56, 82]
	CC30	ST30, ST34	Mundial	[56, 78]
	CC45	ST45	Mundial	[78, 82]
	CC93	ST93	Austrália Ocidental	[82]
HA-MRSA	CC1	ST1	Europa	[83]
	CC5	ST5	América, Ásia e Europa	[55, 81, 84, 86, 89, 90]
		ST125, ST228	Europa	[81, 84]
		ST170, ST225	América e Europa	[81, 84]
		ST8	América Latina	[55, 81, 84, 86, 91]
	CC8	ST239	Mundial	[81, 84, 86, 89, 90, 92]
		ST247	Europa	[78]
		ST9	Europa	[88]
	CC9	ST12	Europa	[88]
	CC12	ST15	Europa	[88]
	CC15	ST22	Austrália e Europa	[55, 81, 84, 86, 87, 90]
	CC22	ST36	-	[55, 81, 84, 90]
	CC30	ST45	-	[55, 81, 84]
	CC45	ST49	Europa	[88]
	CC49	ST88	África	[81, 72, 89]
	CC88	ST97	Europa	[88]
	CC97	ST130	Europa	[7, 88]
	CC130	ST133	Europa	[88]
	CC133	ST425	Europa	[88]
	-			
CA-MRSA	CC8	ST8	América	[81, 90]
	CC22	ST22	Austrália e Europa	[81, 86, 87]
	CC30	ST30, ST34	Austrália e Ásia	[81, 90]
	CC59	ST59	Ásia	[81, 92]
	CC80	ST80	Europa e África	[81, 84, 85]
	CC93	ST93	Austrália	[81, 90]
	-	ST152	Europa e África	[84]

1.4.2. *S. aureus* de origem animal

As linhagens clonais encontradas em animais de companhia refletem os clones epidémicos humanos locais [81]. Por exemplo na Austrália, foram encontrados cães infetados com um dos principais HA-MRSA em humanos (ST239), no Reino Unido e em Portugal os isolados MRSA de animais pertenciam à estirpe local associada localmente aos cuidados de saúde (ST22), enquanto nos EUA 50% dos cães encontravam-se infetados por estirpes MRSA encontradas nos humanos (ST5). Estes estudos indicam uma correlação entre o contacto próximo com os seres humanos e o aumento do risco da colonização de animais de estimação por *S. aureus* [81].

Para animais de companhia, em Portugal, os complexos clonais de estirpes MRSA com maior relevância são o CC22 e o CC5, enquanto para animais de produção é o CC398 [52, 93]. Os complexos clonais encontrados em animais de companhia, mas também em humanos e já referidos anteriormente são o CC22 [94] e o CC5 [95, 96]. ST22 está ainda associado a equinos na Europa, mas existem também registos no Canadá e na Europa de cavalos colonizados por MRSA ST398 [81] (Figura 6). O CC398 (ST398) foi inicialmente descrito na Holanda em 2006, em suínos, mas posteriormente espalhou-se podendo ser encontrado em vários animais de companhia, incluindo cães e gatos, e mesmo em humanos [88, 95-97]. No entanto, enquanto a colonização em animais por ST398 é frequente, a infeção é rara, sendo encontrado sobretudo na Europa e na América do Norte [81].

O género *Staphylococcus* tem também grande relevância devido à sua capacidade zoonótica, ou seja, a capacidade de transmissão entre animais e seres humanos [97, 98]. Assim, as principais linhagens clonais de estafilococos em animais e humanos deve ser monitorizada, tendo em conta os possíveis perigos de transmissão entre espécies hospedeiras, assim como, a emergência de clones adaptados ao hospedeiro, especialmente aos humanos [99].



Figura 6. Diversidade e dispersão clonal de *S. aureus* de origem animal nos diferentes continentes e em Portugal.

1 INTRODUÇÃO

Tabela 2. Dispersão e diversidade clonal de *S. aureus* de origem animal.

Complexo Clonal (CC)	Sequência Tipo (ST)	Espécie Hospedeira	Localização Geográfica	Referências Bibliográficas
CC1	ST1	Animais selvagens, cavalos e suínos	África e Europa	[81, 88, 100, 101]
CC5	ST5	Animais de companhia , animais selvagens e aves	América e Europa	[52, 81, 88, 93, 95, 96]
CC6	ST6	Animais de companhia e animais selvagens	Europa	[88]
CC7	ST7	Animais selvagens	Europa	[88]
CC8	ST8	Animais de companhia , animais selvagens e cavalos	América e Europa	[81, 88, 95]
	ST239	Cães	Austrália	[81]
	ST254	Cavalos	América e Europa	[81]
CC9	ST9	Animais de companhia , animais selvagens e suínos	Ásia e Europa	[81, 88, 95, 102]
CC12	ST12	Animais selvagens	Europa	[88]
CC15	ST15	Animais de companhia e animais selvagens	África e Europa	[88, 101]
CC22	ST22	Animais de companhia e animais selvagens	Europa	[52, 81, 88, 93, 94, 96]
CC25	ST25	Animais selvagens	Europa	[88]
CC30	ST30	Animais selvagens	América e Europa	[88, 103]
CC45	ST45	Animais de companhia	Europa	[95]
CC49	ST49	Animais selvagens	Europa	[88, 104]
CC59	ST59	Animais de companhia e animais selvagens	Europa	[88, 104]
CC88	ST88	Animais selvagens	África e Europa	[88, 101]
CC97	ST97	Gado e veados	Europa	[81, 88]
CC121	ST121	Animais de companhia	Europa	[95]
CC130	ST130	Animais de companhia , animais selvagens e bovinos	Europa	[81, 88, 104]
CC133	ST133	Animais de companhia e animais selvagens	Europa	[88]
CC398	ST398	Animais de companhia , animais selvagens, aves, bovinos, cavalos e suínos	África, Canadá e Europa	[52, 81, 88, 93, 95-97, 101, 104]
CC425	ST425	Animais de companhia , animais selvagens e bovinos	Europa	[81, 88, 104]

1.4.3. *S. epidermidis* de origem animal

A distribuição de *S. epidermidis* em animais de companhia é ainda pouco compreendida. Argudín *et al.* (2015) [105] realizaram um estudo em que compararam amostras de *S. epidermidis* recolhidas em rebanhos, criadores de gado e isolados humanos de ambiente hospitalar por tipificação molecular através de PFGE e MLST.

Este estudo revelou linhagens comuns a todos os grupos estudados (ST2), comuns a animais e humanos (ST6, ST7, ST16 e ST22) e linhagens de ocorrência exclusiva em animais (ST91) ou em humanos (ST5, ST19, ST21, ST23, ST85 e ST88) [105-109]. Alguns destes tipos de sequência também se podem encontrar em animais de companhia (ST2, ST5 e ST22) ou em casos de mastite bovina (ST5 e ST7) [18, 110].

Os STs encontrados no estudo de Argudín *et al.* (2015) [105] relacionados com os complexos clonais CC2, CC5 e CC22, correspondem aos STs de *S. epidermidis* mais prevalentes a nível hospitalar, podendo ser também encontrados na comunidade a nível mundial como estirpes *S. epidermidis* sensíveis ou resistentes à meticilina (MRSE, de *Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis*) [18, 52, 63, 106, 108, 111-114] (Figura 7). A maioria das estirpes MRSE em Portugal pertence ao complexo clonal CC5 [52].



Figura 7. Diversidade e dispersão clonal de *S. epidermidis* de origem animal nos diferentes continentes e em Portugal.

1 INTRODUÇÃO

Tabela 3. Dispersão e diversidade clonal de *S. epidermidis* de origem animal.

Complexo Clonal (CC)	Sequência Tipo (ST)	Espécie Hospedeira	Referências Bibliográficas
CC2	ST2	Animais de companhia , criadores de gado, isolados hospitalares e rebanho	[18, 63, 110]
CC5	ST5	Animais de companhia , criadores de gado, isolados hospitalares e gado bovino	[18, 52, 63, 110, 113, 114]
-	ST6	Criadores de gado e rebanho	
-	ST7	Criadores de gado, gado bovino e rebanho	
-	ST16	Isolados hospitalares e rebanho	
-	ST17	Criadores de gado e isolados hospitalares	
CC19	ST19, ST21	Criadores de gado	
-	ST22	Animais de companhia , criadores de gado e rebanhos	[18, 110]
-	ST23	Isolados hospitalares	
-	ST35	Aves de rapina, criadores de gado e isolados hospitalares	[115]
-	ST59	Animais de companhia , criadores de gado, isolados hospitalares, gado bovino e rebanho	[18, 110]
-	ST73	Criadores de gado e isolados hospitalares	
-	ST85	Isolados hospitalares	
-	ST87	Criadores de gado e isolados hospitalares	
-	ST88	Criadores de gado e isolados hospitalares	
-	ST89	Criadores de gado e rebanho	
-	ST91	Gado bovino e rebanho	
-	ST100	Gado bovino e rebanho	
-	ST130	Criadores de gado	
-	ST179	Criadores de gado	
-	ST194	Criadores de gado e rebanho	
-	ST284	Criadores de gado e isolados hospitalares	
-	ST357	Criadores de gado, isolados hospitalares e rebanho	<u>Referências Gerais:</u>
-	ST447	Animais de companhia e isolados hospitalares	[105-109]

1.4.4. *S. schleiferi* de origem animal

Devido à baixa frequência de infecções causadas por *S. schleiferi* em animais e humanos, não existe ainda um esquema de MLST estabelecido para esta espécie. O número de estudos com caracterização por PFGE de *S. schleiferi* é bastante restrito. No entanto, os poucos dados disponíveis, indicam que esta espécie apresenta uma heterogeneidade moderada, podendo ser agrupados, demonstrando alguma clonalidade [22, 24, 116]. Nestes grupos encontram-se amostras de todas as regiões geográficas e com diversos tipos de resistência, sobretudo com origem em cães [117]. Alguns estudos demonstraram que ambas as subespécies, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, podem apresentar perfis de macrorestrição idênticos [116, 118].

1.5. Objetivos da Dissertação

O objetivo principal desta Dissertação foi a caracterização por técnicas de tipificação molecular de diferentes espécies de estafilococos associadas a SSTIs em humanos e animais de companhia para identificação das principais linhagens clonais. Conhecer a diversidade clonal destes estafilococos é importante do ponto de vista epidemiológico, pois permite saber quais as linhagens clonais em circulação, as suas principais características e monitorizar a sua evolução. As técnicas de tipificação utilizadas, mais concretamente, a resolução de perfis de macrorestrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a sequenciação de múltiplos *loci* (MLST), deverão apoiar outros estudos realizados no âmbito do Projeto BIOSAFE, no qual se procura caracterizar perfis de suscetibilidade a antimicrobianos de estafilococos associados a SSTIs em humanos e animais de companhia, nomeadamente através da definição das relações filogenéticas entre os isolados caracterizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Estirpes bacterianas

Neste trabalho estudaram-se duas coleções de estafilococos associados a infeções da pele e tecidos moles (SSTIs, de *Skin and Soft Tissue Infection*) em humanos e animais. A primeira coleção incluía 34 isolados de *S. aureus* de origem humana, enquanto a segunda coleção era composta por isolados de origem animal de *S. aureus* (n=55), *S. epidermidis* (n=14) e *S. schleiferi* (n=27, dos quais 26 *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e um *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*). Estas coleções foram cedidas pela Professora Doutora Constança Pomba, do Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Os isolados de *S. aureus* de origem humana foram recolhidos num laboratório de diagnóstico clínico em Lisboa, de fevereiro a junho de 2014. Os isolados de origem animal correspondem a todos os isolados de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. schleiferi*, associados a SSTIs, recolhidos num laboratório de investigação veterinária em Lisboa entre 1999 e 2018 e num laboratório de diagnóstico veterinário em Lisboa em 2017 (apenas *S. aureus*) e 2018. A origem e a data de recolha de cada isolado encontram-se discriminadas nas Tabela 4 a 7.

Tabela 4. Origem e data de isolamento dos 34 isolados de *S. aureus* de origem humana estudados neste trabalho.

Isolado	Data de isolamento	Isolado	Data de isolamento
BIOS-H1	março de 2014	BIOS-H10	junho de 2014
BIOS-H2 ^A	março de 2014	BIOS-H11 ^D	fevereiro de 2014
BIOS-H3 ^A	março de 2014	BIOS-H12	maio de 2014
BIOS-H4 ^B	abril de 2014	BIOS-H13	fevereiro de 2014
BIOS-H5 ^C	fevereiro de 2014	BIOS-H14	junho de 2014
BIOS-H6 ^C	fevereiro de 2014	BIOS-H16	março de 2014
BIOS-H7	maio de 2014	BIOS-H17 ^E	junho de 2014
BIOS-H8	maio de 2014	BIOS-H18 ^E	junho de 2014
BIOS-H9	abril de 2014	BIOS-H19	março de 2014

Nota: A, B, C, D, E, F - isolados recolhidos do mesmo indivíduo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 4. Continuação.

Isolado	Data de isolamento	Isolado	Data de isolamento
BIOS-H20	junho de 2014	BIOS-H28	março de 2014
BIOS-H21	junho de 2014	BIOS-H29	maio de 2014
BIOS-H22	abril de 2014	BIOS-H30	junho de 2014
BIOS-H23	março de 2014	BIOS-H31	maio de 2014
BIOS-H24 ^B	abril de 2014	BIOS-H32	maio de 2014
BIOS-H25	abril de 2014	BIOS-H33 ^D	fevereiro de 2014
BIOS-H26 ^F	abril de 2014	BIOS-H34	abril de 2014
BIOS-H27 ^F	abril de 2014	BIOS-H35	abril de 2014

Nota: A, B, C, D, E, F - isolados recolhidos do mesmo indivíduo.

Tabela 5. Origem e data de isolamento dos 55 isolados de *S. aureus* de origem animal recolhidos num laboratório de investigação veterinária (*, n=21, 1999 a 2018) ou laboratório de diagnóstico veterinário (, n=34, 2017-2018).**

Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento	Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento
BIOS-V4*	Cão	2013	BIOS-V76*	Gato	2012
BIOS-V5*	Cão	2014	BIOS-V85 ^{A,*}	Cão	2003
BIOS-V6*	Cão	2014	BIOS-V118*	Cão	2007
BIOS-V19*	Gato	2012	BIOS-V128*	Gato	2018
BIOS-V20*	Gato	2012	BIOS-V129*	Coelho	2003
BIOS-V21*	Gato	2014	BIOS-V147**	Coelho	2017
BIOS-V22*	Gato	2012	BIOS-V150**	Cão	2017
BIOS-V30*	Cão	2014	BIOS-V151**	Gato	2017
BIOS-V31*	Cão	2018	BIOS-V153**	Cão	2018
BIOS-V60*	Cavalo	2001	BIOS-V154**	Gato	2018
BIOS-V61*	Cão	2003	BIOS-V155 ^{B,**}	Gato	2018
BIOS-V62*	Gato	2005	BIOS-V156**	Cão	2018
BIOS-V63*	Cão	2008	BIOS-V157**	Cão	2018
BIOS-V70*	Cão	2015	BIOS-V158**	Gato	2017
BIOS-V74 ^{A,*}	Cão	2003	BIOS-V159**	Gato	2018
BIOS-V75*	Cão	2005	BIOS-V160**	Gato	2018

Nota: A, B, C, D - isolados recolhidos do mesmo animal; E - origem desconhecida.

Tabela 5. Continuação.

Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento	Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento
BIOS-V161**	Coelho	2018	BIOS-V203**	Cão	2018
BIOS-V168**	Gato	2018	BIOS-V204 ^{D,**}	Coelho	2017
BIOS-V172**	Cão	2018	BIOS-V245**	Cão	2018
BIOS-V178**	Gato	2018	BIOS-V250**	Cão	2018
BIOS-V183**	Cão	2017	BIOS-V255**	Cão	2018
BIOS-V184 ^{B,**}	Gato	2018	BIOS-V257**	Gato	2017
BIOS-V185**	Cão	2018	BIOS-V258 ^{D,**}	Coelho	2017
BIOS-V186**	Cão	2018	BIOS-V279**	Gato	2018
BIOS-V187**	Cão	2018	BIOS-V295**	— ^E	2018
BIOS-V200 ^{C,**}	Cão	2018	BIOS-V296**	Cão	2018
BIOS-V201 ^{C,**}	Cão	2018	BIOS-V300**	Cão	2018
BIOS-V202**	Gato	2018			

Nota: A, B, C, D - isolados recolhidos do mesmo animal; E - origem desconhecida.

Tabela 6. Origem e data de isolamento dos 14 isolados de *S. epidermidis* de origem animal recolhidos num laboratório de investigação veterinária (*, n=9, 1999 a 2018) ou laboratório de diagnóstico veterinário (**, n=5, 2018).

Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento	Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento
FMV 5*	Gato	2003	BIOS-V24*	Cão	2018
FMV 6*	Cão	2006	BIOS-V100*	Cão	2014
FMV 8*	Cão	2007	BIOS-V216**	Cão	2018
FMV 13*	Cão	2012	BIOS-V220**	Cão	2018
FMV 15*	Cão	2012	BIOS-V266**	Gato	2018
FMV 16*	Gato	2012	BIOS-V278**	Gato	2018
FMV 20*	Gato	2015	BIOS-V282**	Cão	2018

Tabela 7. Origem e data de isolamento dos 27 isolados de *S. schleiferi* de origem animal recolhidos num laboratório de investigação veterinária (*, n=21, 1999 a 2018) ou laboratório de diagnóstico veterinário (, n=6, 2018).**

Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento	Isolado	Espécie Animal	Data de isolamento
BIOS-V1 ^{A,*}	Cão	2015	BIOS-V93*	Cão	2007
BIOS-V2*	Cão	2012	BIOS-V94*	Cão	2007
BIOS-V3*	Cão	2014	BIOS-V95*	Cão	2013
BIOS-V9*	Cão	2018	BIOS-V98*	Cão	2015
BIOS-V35*	Cão	2018	BIOS-V107*	Cão	2015
BIOS-V41*	Cão	2018	BIOS-V126 ^{A,*}	Cão	2016
BIOS-V42*	Cão	2001	BIOS-V139* [#]	Cão	2016
BIOS-V43*	Cão	2004	BIOS-V191**	Cão	2018
BIOS-V44*	Cão	2005	BIOS-V205**	Cão	2018
BIOS-V45*	Cão	2008	BIOS-V232**	Cão	2018
BIOS-V46*	Cão	1999	BIOS-V243**	Cão	2018
BIOS-V47*	Cão	2003	BIOS-V265**	Cão	2018
BIOS-V51*	Cão	2007	BIOS-V289**	Cão	2018
BIOS-V91*	Cão	2004			

Nota: A - isolados recolhidos do mesmo animal; # - único isolado identificado como *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.

A estirpe *S. aureus* subsp. *aureus* NCTC[®] 8325[™] [119] foi utilizada como referência na tipificação molecular por PFGE. Para a identificação da linhagem clonal ST398 por uma abordagem por PCR [74] foram utilizadas as estirpes *S. aureus* 25.1 [93] e *S. aureus* ATCC[®] 25923[™]. Esta última estirpe foi ainda utilizada como controlo na amplificação de fragmentos internos de genes *housekeeping* incluídos no esquema de tipificação por MLST para *S. aureus* [61, 120].

2.1.2. Outro material biológico

Ao longo deste trabalho foram utilizados vários *primers* nas técnicas de tipificação aplicadas, os quais estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados neste estudo e tamanho (em pares de bases) esperado de cada amplificação.

Primers	Sequência (5' → 3')	Alvo	Referência
Para identificação do clone ST398			
A07	up GATCCCAGAATACTTAAATA dn TGACCGTAATCTTGTAATA	Regiões conservadas específicas da linhagem ST398	[74]
C01	up CATTTCATCACACGTATATTC dn GGTGATTATTCATGGTTAAG		
Para MLST de S. aureus			
arcC up	CCTTTATTGATTCACCAGCG	Carbamate Cinase	[120]
arcC dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG		
aroE up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	Chiquimato desidrogenase	
aroE dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC		
glpF up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	Glicerol Cinase	
glpF dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC		
gmk up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	Guanilato Cinase	[61]
gmk dn	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA		
pta up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	Fosfato N-acetiltransferase	
pta dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA		
tpi up	TCGTTCACTCTGAACGTCGTGAA	Triose-fosfato isomerase	
tpi dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC		
yqiL up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	Acetil-CoA C-acetiltransferase	
yqiL dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC		

Na tipificação molecular por PFGE foi usado o marcador de pesos molecular *PFG ladder* (New England BioLabs, Massachusetts, EUA). Para análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose foi usado o marcador de peso molecular *GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

2.1.3. Meios de cultura, enzimas e soluções

Os meios de cultura e as soluções usadas neste trabalho foram preparados com água destilada autoclavada e, quando necessário, autoclavados a 121°C, durante 15 minutos.

Os meios de cultura utilizados encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Composição dos meios de cultura usados neste trabalho.

Meio de cultura ⁽¹⁾	Composição (por litro)
Tryptone Soya Agar (TSA)	15 g de caseína de pâncreas digerida; 5 g de enzima de feijão de soja digerida; 5 g de cloreto de sódio; 15 g de ágar pH 7,3 ± 0,2 @ 25°C
Tryptone Soya Broth (TSB)	17 g de caseína de pâncreas digerida; 3 g de enzima de feijão de soja digerida; 5 g de cloreto de sódio; 2,5 g de fosfato dipotássico de hidrogénio; 2,5 g de glucose pH 7,3 ± 0,2 @ 25°C

(1) Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra.

Ao longo deste trabalho também foram utilizadas diferentes enzimas, que se encontram descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Enzimas utilizadas ao longo deste trabalho.

Enzima	Composição
RNase ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C
Lisostafina ⁽¹⁾	15 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C
Lisozima ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C
Proteinase K ⁽²⁾	20 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C
NZY Taq II DNA Polimerase ⁽²⁾	Solução 'stock' a 5 U/μL. Mantida a -20°C

(1) Sigma-Aldrich, Missouri, EUA; (2) NZY Tech, Lisboa, Portugal.

A composição e preparação das soluções tampão utilizadas ao longo do trabalho experimental encontram-se descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Composição e preparação das soluções utilizadas neste trabalho.

Solução	Composição
Tris	1 M Tris ⁽¹⁾ pH 8,0 ajustado com ácido clorídrico ⁽²⁾ a 37% (v/v)
EDTA	0,5 M EDTA ⁽¹⁾ pH 8,0 ajustado com hidróxido de sódio ⁽²⁾
PIV	10 mM de Tris; 1,0 M NaCl ⁽²⁾ pH 8,0 ajustado com hidróxido de sódio
Solução EC	6 mM Tris; 1M NaCl; 100 mM EDTA; 0,2% (p/v) deoxicolato de sódio ⁽¹⁾ ; 0,5% (p/v) sarcosil ⁽³⁾ pH 8,0 ajustado com hidróxido de sódio
Solução de lise EC	Solução EC suplementada com 0,05 mg/mL RNase A; 0,1 mg/mL lisozima; 0,05 mg/mL lisostafina
Solução ES	0,25 M EDTA; 1% (p/v) sarcosil pH 9,0 ajustado com hidróxido de sódio
Solução ESP	Solução ES suplementada com 1 mg/mL Proteinase K
TE 1X	10 mM Tris base; 1 mM EDTA pH 8,0
Tampão de amostra	10 mM Tris base; 0,03% (p/v) azul de bromofenol ⁽¹⁾ ; 0,03% (p/v) xileno cianol FF ⁽¹⁾ ; 60% (v/v) glicerol; 60 mM EDTA
Tampão de corrida TBE 10X ^(4,5)	1M Tris base; 20mM EDTA pH 8,3 ajustado com ácido bórico
Tampão de corrida TAE 50X	2M Tris base; 50mM EDTA pH 8,0 ajustado com ácido acético ⁽¹⁾
Brometo de Etídeo (EtBr) ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril, necessário aquecimento para dissolução completa Mantida a 4°C

(1) Sigma-Aldrich; (2) Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; (3) USB Corporation, Cleveland, EUA; (4) NZYTech; (5) Bio-Rad, Califórnia, EUA.

2.2. Métodos

2.2.1. Manutenção e crescimento dos isolados

Todos os isolados bacterianos estudados encontram-se armazenados a -80°C em meio TSB suplementado com glicerol a 10% (v/v). A partir de cada stock, foram preparadas placas de isolamento em meio de TSA por incubação a 37°C durante a noite (cerca de 17/18 horas).

2.2.2. Tipificação molecular por resolução de perfis de macrorestrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Todos os isolados em estudo foram tipificados por macrorestrição do DNA genômico com *Sma*I e resolução dos padrões obtidos por eletroforese em campo pulsado. A preparação dos discos de DNA foi feita de acordo com o procedimento descrito por Chung *et al.*, 2000 [121]. Para cada isolado em estudo, a partir de uma cultura fresca em TSA, transferiu-se uma colônia isolada para 5 mL de meio TSB, incubando a 37°C durante a noite sob agitação a 180 rpm. No dia seguinte, as células bacterianas foram recolhidas a partir de 0,5 mL de cultura por centrifugação (Heraeus® Biofuge Pico™) a 13.000 rpm durante 5 minutos. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento bacteriano em 0,5 mL de PIV e, de seguida, centrifugou-se a 13.000 rpm durante 5 minutos. Removeu-se de novo o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento bacteriano em 0,2 mL de PIV. A densidade ótica a 620 nm (DO₆₂₀) de cada suspensão celular, diluída 1:200 (5 µL da suspensão celular e 0,995 mL de PIV), foi medida num espectrofotómetro Bio-Rad® SmartSpec™ 3000, devendo encontrar-se entre 0,025 e 0,15. A cada suspensão celular foi adicionado PIV de modo a obter uma DO₆₂₀ ajustada a 0,5.

Para preparar os discos de agarose com DNA, transferiram-se 0,15 mL de cada suspensão celular ajustada para um novo tubo, o qual foi colocado a 42°C num bloco de aquecimento (Grant® Water Bath JB2™), durante pelo menos 10 minutos. A cada tubo, adicionaram-se 0,15 mL de agarose *low melting* 1,5% (p/v) (Sigma-Aldrich), preparada previamente em PIV e equilibrada a 42°C. Depositaram-se gotas de 0,02 mL numa placa de vidro revestida com parafilme e cobriram-se essas mesmas gotas com uma lâmina. Os discos de agarose-DNA foram deixados solidificar a -20°C durante 5 minutos e, posteriormente,

à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após solidificados, transferiram-se os discos, cuidadosamente, para um tubo de 15 mL contendo 1 mL de solução de lise EC. A lise celular foi efetuada a 37°C durante 3 a 5 horas, sendo alargada (1 a 2 horas) sempre que necessário. Após lise celular completa, decantou-se cuidadosamente a solução de lise EC, os discos foram lavados com 1 mL de solução ES e incubados em 1 mL de solução ESP a 50°C durante a noite (cerca de 18h). Posteriormente, a solução ESP foi decantada e os discos lavados com 1 mL de tampão TE 1X. Procedeu-se de seguida a cinco ciclos de lavagem dos discos de 30 minutos em 12 mL de tampão TE 1X sob agitação suave à temperatura ambiente por 30 minutos. Após as lavagens, os discos foram mantidos em 1 mL de tampão TE 1X a 4°C. Para a restrição dos discos de DNA com *SmaI* (Thermo Fisher Scientific), foi selecionado um disco de DNA intacto, sendo este equilibrado em 0,1 mL de tampão de restrição 1X num banho de água (Grant® Water Bath JB2™) a 25-28°C durante 1 hora. Posteriormente, removeu-se o tampão de restrição e adicionaram-se 0,05 mL de tampão de restrição 1X e 2 µL de *SmaI* (10U), sendo a mistura incubada a 25-28°C durante a noite (cerca de 18h). No dia seguinte, adicionou-se 3 µL de tampão de amostra para parar a reação de restrição e permitir a visualização dos discos.

O gel de agarose (SeaKem LE Lonza, Rockland, EUA) a 1% (p/v) foi preparado em tampão TBE 0,5X, tendo os marcadores e discos de DNA sido colocados nos poços do gel e selados com agarose. Em cada gel, foram colocados o marcador PFG DNA Ladder (New England Biolabs) e discos da estirpe de referência *S. aureus* NCTC 8325 entre cada 5 isolados em estudo. A eletroforese foi efetuada num aparelho CHEF-DR® III™ System (Bio-Rad) em 2 L de tampão TBE 0,5X, a 14°C. As condições de corrida variaram de acordo com a espécie a estudar (Tabela 12).

Após a corrida, corou-se o gel de agarose por imersão em solução de brometo de etídeo a 0,5 mg/L à temperatura ambiente durante 30 minutos. O gel foi depois descorado em água destilada durante 30 minutos. Os padrões de macrorestrição foram depois registados, sob luz UV, num aparelho Gel-Doc XR (Bio-Rad).

Tabela 12. Condições usadas na análise de perfis de macrorestrição por PFGE.

<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> [121]	<i>S. schleiferi</i> [122]
t _{inicial} : 5 segundos	t _{inicial} : 5 segundos
t _{final} : 35 segundos	t _{final} : 40 segundos
t _{total} : 23 horas	t _{total} : 21 horas
Voltagem: 200 V (6 V/cm)	Voltagem: 200 V (6 V/cm)
Temperatura: 14°C	Temperatura: 14°C
Ângulo: 120°	Ângulo: 120°

Os perfis de macrorestrição foram analisados segundo os critérios de Tenover *et al.*, 1995 [119]; considerando que os isolados com perfil de macrorestrição igual são pertencentes ao mesmo pulsotipo ou a sub-pulsotipos diferentes se apresentarem até sete diferenças, enquanto os isolados com mais de sete diferenças de banda são considerados de pulsotipos diferentes. Para simplificar a escrita, daqui em diante pulsotipo e sub-pulsotipo serão referidos como tipo e sub-tipo, respectivamente. Posteriormente, a análise dos perfis de macrorestrição foi efetuada com ajuda do *software Bionumerics* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), usando o coeficiente de similaridade de *Dice*. A construção de dendrogramas foi feita com base no método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), com uma otimização de 0,5% (*S. aureus* e *S. schleiferi*) ou 0,8% (*S. epidermidis*) e uma tolerância de posição de banda de 1%. Para *S. aureus* e *S. schleiferi*, isolados com padrão de macrorestrição com um grau de semelhança de 81% e de 97% foram considerados como pertencentes ao mesmo tipo ou do mesmo sub-tipo, respectivamente [123]. Para *S. epidermidis*, a classificação em tipo e sub-tipo foi feita com base num grau de semelhança de 79% e 95%, respectivamente [106].

2.2.3. Identificação por PCR da linhagem clonal ST398 de *S. aureus*

Os isolados de *S. aureus* pertencentes à linhagem clonal ST398 foram identificados por uma abordagem por PCR descrita por Wamel *et al.*, 2010 [74], a qual se baseia na amplificação de duas sequências conservadas apenas na linhagem ST398.

Cada reação foi preparada num volume final de 25 µL contendo 2,5 µL (1X) de tampão de reação 10X NZY Tech, 1,75 µL (1,75 mM) de MgCl₂, 2 µL (0,2 mM) de dNTPS, 0,5 µL (0,4 mM) de cada *primer*, 15,1 µL de H₂O MQ e 0,15 µL (0,03U/µL) de NZY Taq II DNA Polimerase (NZY Tech) e 2,5 µL de DNA total diluído (1:10). Para cada PCR, preparou-se um controlo negativo, em que o volume de DNA foi substituído por água bidestilada estéril, um controlo positivo, *S. aureus* 25.1 e um controlo negativo, *S. aureus* ATCC® 25923™. As reações de PCR foram realizadas num aparelho Biometra® Uno II™ Thermoblock Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), usando o programa de amplificação descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Programa de amplificação para identificação da linhagem clonal ST398 de *S. aureus* [74].

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94°C	3 minutos	1 ciclo
94°C	30 segundos	30 ciclos
51°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1 ciclo

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYTech) a 1% (p/v) em TAE 1X durante 1 hora a 80 volts, utilizando o marcador *GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific). Após a corrida, o gel foi corado numa solução de EtBr 0,5 mg/L e os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-Doc XR (Bio-Rad).

2.2.4. Tipificação por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST)

Após a classificação dos isolados de *S. aureus* em tipos e sub-tipos com base nos perfis de macrorestrição, foram selecionados isolados representativos (um isolado por tipo e/ou sub-tipo) para caracterização por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST). O esquema de MLST para *S. aureus* baseia-se na amplificação de fragmentos internos de sete genes *housekeeping*, nomeadamente carbamate cinase, chiquimato desidrogenase, glicerol cinase, guanilato cinase, fosfato N-acetiltransferase, triose-fosfato isomerase e acetil-CoA C-acetiltransferase [61, 120].

Cada reação de PCR foi preparada num volume final de 50 μ L contendo 5 μ L (1X) de Buffer 10X NZY Tech, 3 μ L (1,5 mM) de $MgCl_2$, 4 μ L (0,2 mM) de dNTPS, 1 μ L (0,4 mM) de cada *primer*, 30,2 μ L de H_2O MQ e 0,2 μ L (0,02 U/ μ L) de NZY *Taq* II DNA Polimerase (NZY Tech) e 5 μ L de DNA total diluído (1:10). Para cada PCR, preparou-se um controlo negativo, em que o volume de DNA foi substituído por água bidestilada estéril e um controlo positivo, *S. aureus* ATCC[®] 25923[™]. As reações de PCR foram realizadas num aparelho Biometra[®] Uno II[™] Thermoblock Thermal Cycler, usando o programa de amplificação descrito na Tabela 14.

Tabela 14. Programa de amplificação do MLST [61, 120].

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94°C	4 minutos	1 ciclo
94°C	1 minuto	35 ciclos
55°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	1 ciclo

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYTech) a 1% (p/v) em TAE 1X durante 1 hora a 80 volts, utilizando o marcador *GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder*. Após a corrida, o gel foi corado numa solução de EtBr 0,5 mg/L e os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-Doc XR.

A purificação dos produtos de PCR foi feita através da utilização do kit *NZYGelpure* (NZYTech) segundo o protocolo para purificação de produtos de PCR fornecido pelo fabricante.

Os produtos purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYTech) a 1% (p/v) em TAE 1X durante 1 hora a 80 volts, utilizando o marcador *GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder*. Após a corrida, o gel foi corado numa solução de EtBr 0,5 mg/L e os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-Doc XR.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de Sanger pela empresa MacroGen (Madrid, Espanha) em placa de 96 poços (Life Technologies™). Em cada poço, foi adicionado 5 µL de produto de PCR purificado e 5 µL do *primer* apropriado a 10µM. As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas com o programa *SnapGene® Viewer 4.3.8* (GSL Biotech LLC) e alinhadas com *Clustal Omega* (disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/>). Cada sequência curada foi submetida na plataforma PubMLST (disponível em: <https://pubmlst.org/>) para obtenção do número alélico para cada um dos sete genes em análise. Após obtenção do número alélico dos sete genes, o perfil alélico foi submetido para identificação da sequência tipo (ST) associada a cada isolado. Para representar as possíveis relações entre isolados, utilizou-se o *freeware* PHYLOViZ (disponível em: <http://www.phyloviz.net/>), com o algoritmo *goeBurst* [77]. As sequências tipo podem estar relacionadas e ser agrupadas em complexos clonais, dependendo das diferenças alélicas encontradas entre si [76, 77]. Nesta dissertação recorreu-se à definição de complexo clonal (CC) utilizada pela plataforma PubMLST, na qual um ST é agrupado num complexo quando apresente até três diferenças alélicas (TLV, de *Triple Locus Variant*) de um genótipo central, à exceção dos casos em que esse ST se apresente mais próximo de outro genótipo central. Os STs que apresentam mais de três diferenças alélicas consideram-se como pertencendo a complexos clonais diferentes. Assim, nesta Dissertação foram considerados os complexos descritos na base de dados PubMLST.

2.2.5. Cálculo de diversidade genética

O grau de diversidade genética de cada coleção em estudo foi determinado pelo cálculo do índice de diversidade de Simpson (SID, de *Simpson's index of diversity*), usando um intervalo de confiança (CI, de *confidence interval*) de 95% [55, 124]. Este cálculo teve como base os tipos de PFGE determinados por *Bionumerics* para cada espécie em estudo.

Índice de Diversidade de Simpson

$$SID = 1 - \frac{\sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)}{N(N - 1)}$$

Intervalo de Confiança a 95%

$$\sigma^2 = \frac{4}{N} \left[\sum \pi_j^3 - \left(\sum \pi_j^2 \right)^2 \right]$$

$$CI = \left[SID - 2\sqrt{\sigma^2}, SID + 2\sqrt{\sigma^2} \right]$$

Em que,

N = número total de isolados

S = número de tipos definidos por PFGE

n_j = número de estirpes pertencentes ao tipo j

π_j = frequência n_j/N

3. RESULTADOS

3.1. Tipificação molecular por análise de perfis de macrorestrição

Os perfis de macrorestrição obtidos para cada isolado foram analisados, por espécie, com base nos critérios de Tenover *et al.* (1995) [119]. Esta análise foi posteriormente complementada por análise computacional, usando o software *Bionumerics* 7.6, com os parâmetros previamente estabelecidos para cada espécie em estudo (ver ponto 2.2.2). A análise dos perfis de macrorestrição dos 34 isolados de *S. aureus* de origem humana utilizando os critérios de Tenover e *Bionumerics* identificou 16 e 15 tipos (A a O), divididos em 26 e 27 sub-tipos, respectivamente (Figura 8).

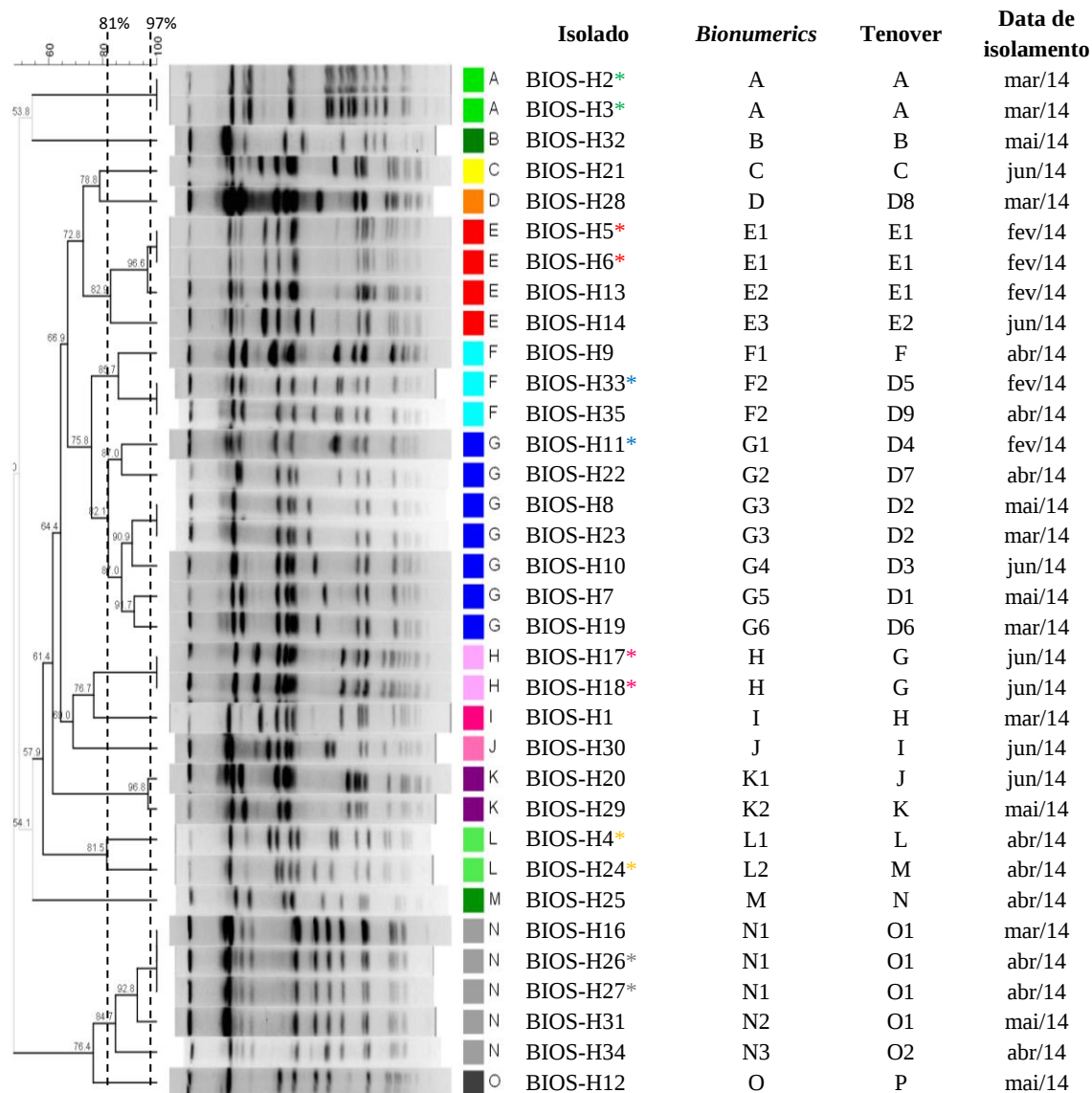


Figura 8. Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 34 isolados de *S. aureus* de origem humana. *isolados com origem no mesmo indivíduo; as cores identificam os diferentes tipos identificados por *Bionumerics*.

3 RESULTADOS

Os tipos mais frequentes, G, N e E, englobam cada um 7, 5 e 4 isolados, respetivamente. No seu efeito, correspondendo a 47% do total de isolados de origem humana. No entanto, cada um destes tipos apresenta vários sub-tipos, demonstrando assim uma grande diversidade entre os isolados de um mesmo tipo. Os restantes tipos são representados por apenas um ou dois isolados (Figura 8). Alguns tipos encontram-se relativamente próximos com coeficientes de semelhança entre 75 a 81%, como acontece com os tipos C e D, F e G, H e I, N e O (Figura 8). Encontramos alguns tipos com menor diversidade.

Relativamente aos pares de isolados com origem no mesmo indivíduo (BIOS-H2/H3; BIOS-H5/H6; BIOS-H33/H11; BIOS-H17/H18; BIOS-H4/H24; BIOS-H26/H27), quatro dos seis pares (BIOS-H2/H3; H5/6; BIOS-H17/H18; BIOS-H26/H27) apresentam o mesmo perfil de macrorestrição, sugerindo que se trata da mesma estirpe. O par de isolados BIOS-H4/H24 apresenta perfis muito semelhantes sendo classificados como diferentes sub-tipos do mesmo tipo de PFGE e o último par (BIOS-H33/11) apresenta perfis de macrorestrição distintos entre si correspondendo a duas estirpes distintas (Figura 8).

A análise da coleção de *S. aureus* de origem animal pelos critérios de Tenover e por *Bionumerics* definiu 11 tipos e 29 sub-tipos e 15 tipos com 31 sub-tipos, respetivamente (Figura 9). Para seis dos 55 isolados não foi possível obter perfis de macrorestrição por ausência da digestão do DNA genómico pela enzima *Sma*I. Esta característica é típica da linhagem clonal ST398, pelo que foi aplicada uma abordagem por PCR para identificação específica desta linhagem (ver ponto 3.2.).

O tipo A é o mais frequente, correspondendo a cerca de um terço dos isolados (18/55) e contendo 6 sub-tipos com coeficientes de semelhança entre 84 e 96%. Seguindo-se os tipos N e B que apresentam 8 e 7 isolados, respetivamente, divididos em vários sub-tipos (Figura 9). Como referido anteriormente, os tipos A e B definidos pelo *Bionumerics* (e considerados o mesmo de acordo com os critérios de Tenover), são próximos com coeficiente de semelhança de 79%. Os restantes tipos definidos englobam apenas um a dois isolados.

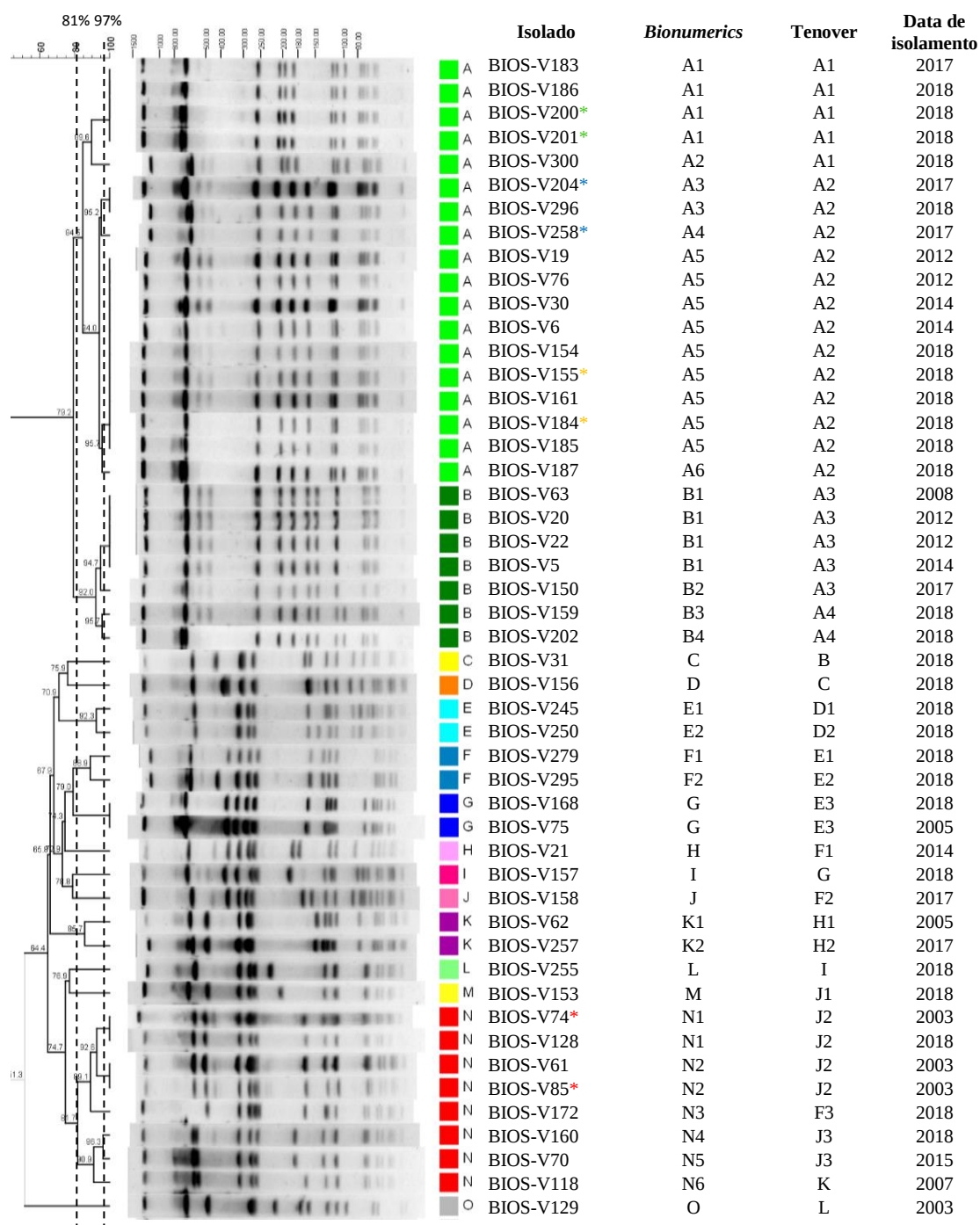


Figura 9. Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 55 isolados de *S. aureus* de origem animal. *isolados com origem no mesmo animal; não contêm os seis isolados sem perfil de macrorestrição.

Relativamente aos pares de isolados com origem no mesmo animal (BIOS-V200/V201; BIOS-V204/V258; BIOS-V155/V184; BIOS-V74/V85), dois dos quatro pares (BIOS-V200/V201; BIOS-V155/V184) apresentam o mesmo perfil de macrorestrição, sugerindo que se trata da mesma estirpe, enquanto os outros dois pares de isolados (BIOS-V204/V258; BIOS-V74/V85) apresentam um perfil muito semelhante, correspondendo a sub-tipos diferentes dentro do mesmo tipo (Figura 9).

3 RESULTADOS

A análise da coleção de 14 *S. epidermidis* de origem animal revelou grande diversidade genética entre os isolados. Pela aplicação dos critérios de Tenover foram definidos 10 tipos e 13 sub-tipos, enquanto a análise por *Bionumerics* identificou 11 tipos e 13 sub-tipos, como descrito na Figura 10.

Apesar desta ser a coleção mais pequena, mostrou ser a mais diversa, apresentando 11 tipos (A a K) para 14 isolados. Para além disto, o tipo mais frequente (D) engloba quatro isolados divididos em 3 sub-tipos, com baixos coeficientes de semelhança (Figura 10).

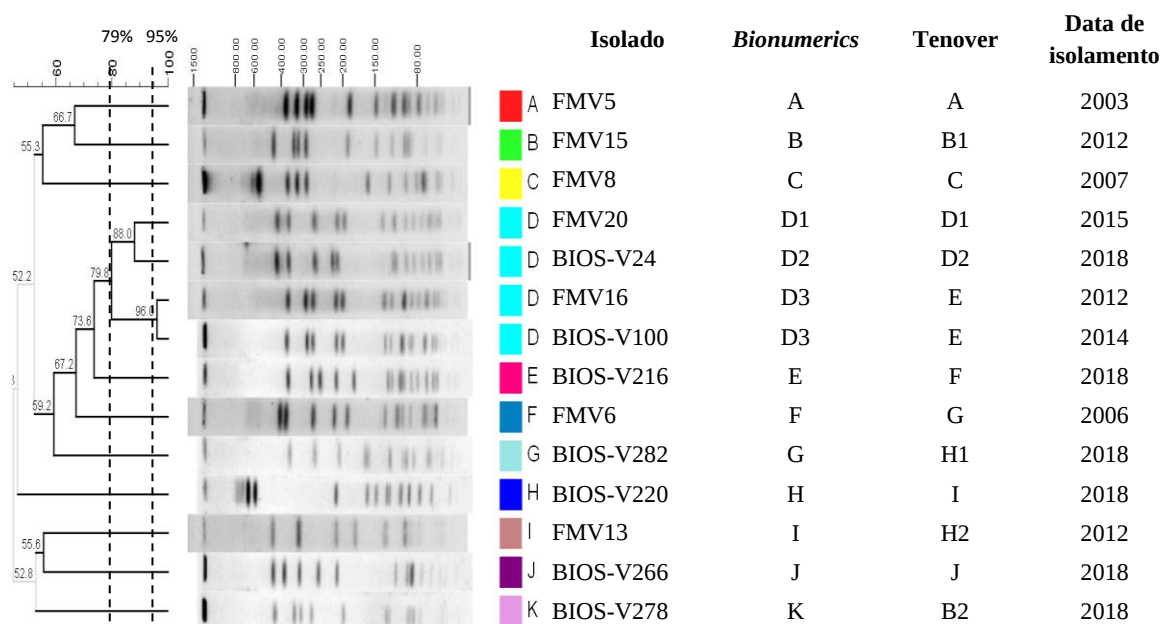


Figura 10. Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 14 isolados de *S. epidermidis* de origem animal.

Quanto à coleção de *S. schleiferi* de origem animal, foram identificados 6 tipos e 14 sub-tipos para os 27 isolados de origem animal pelos critérios de Tenover. Enquanto a análise por *Bionumerics* identificou 9 tipos com 19 sub-tipos (Figura 11). É de salientar que, devido à inexistência de critérios estabelecidos para esta espécie, foram usados os valores de corte definidos para *S. aureus*, nomeadamente 81% e 97% para definição de tipos e sub-tipos, respetivamente.

O tipo mais frequente A inclui 15 isolados. Embora divididos em 8 sub-tipos estes isolados são bastante próximos, apresentando coeficientes de semelhança entre 87 e 96% (Figura 11). Relativamente ao par de isolados com origem no mesmo animal (BIOS-V1/126), este apresenta um perfil semelhante sugerindo que são do mesmo tipo, mas de sub-tipos diferentes, embora tenham sido recolhidos em anos diferentes (Figura 11).

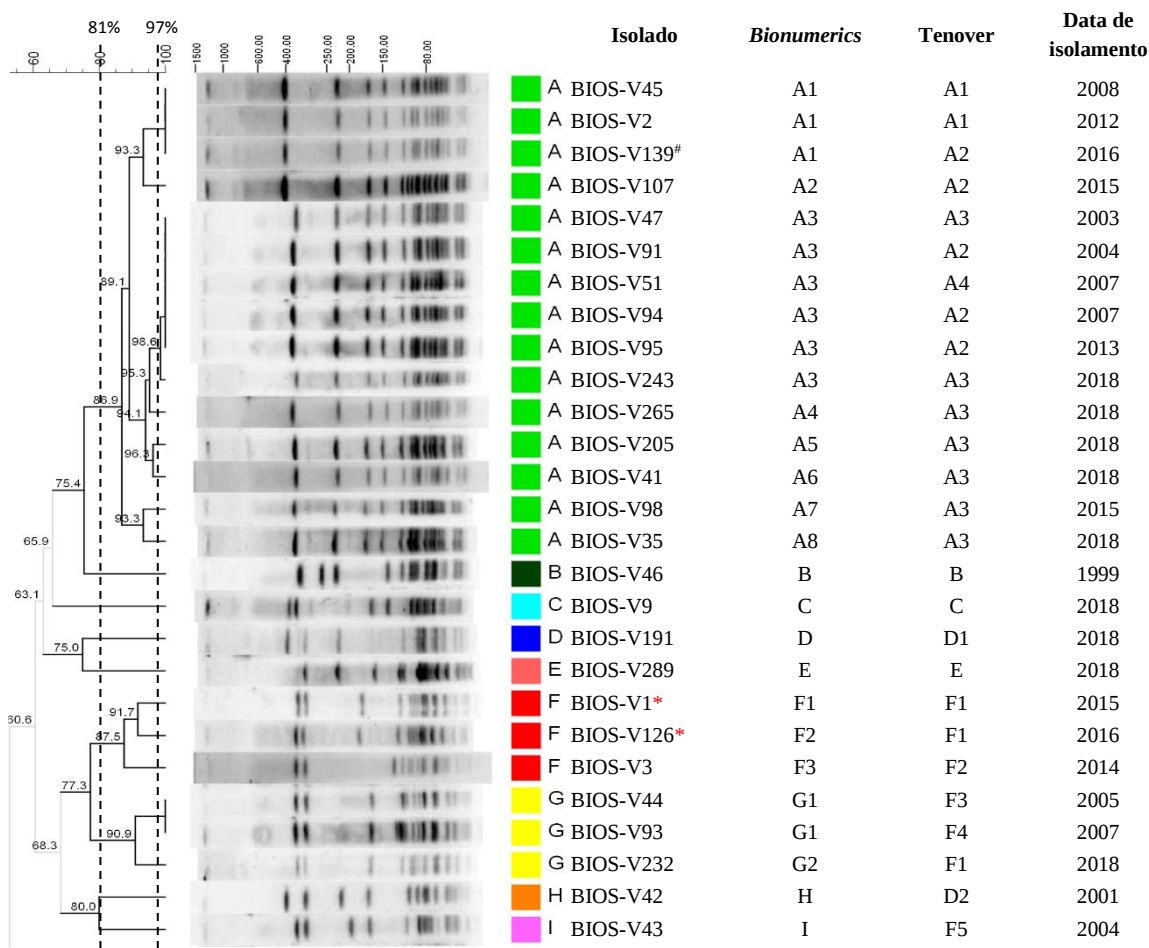


Figura 11. Análise do perfil de macrorestrição por PFGE dos 27 isolados de *S. schleiferi* de origem animal. *isolados com origem no mesmo animal; # - único isolado identificado como *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.

3.2. Identificação da linhagem clonal *S. aureus* ST398

A identificação da linhagem clonal ST398 foi realizada para os isolados de *S. aureus* que não foram cortados pela enzima *Sma*I (ver ponto 3.1) pela amplificação de duas sequências conservadas apenas na linhagem ST398 (Figuras 12 e 13).

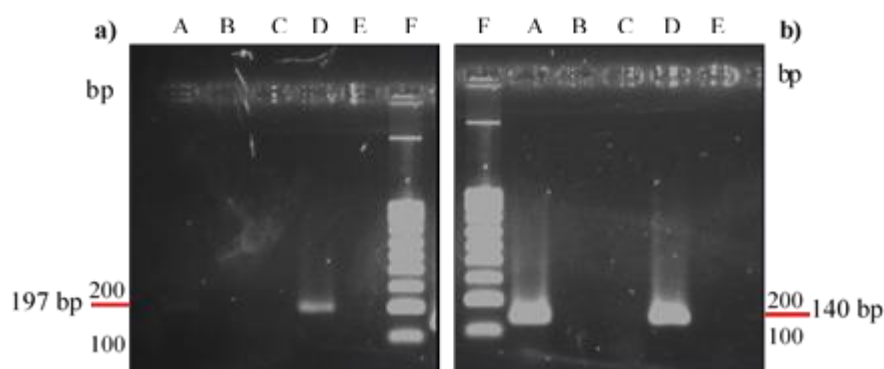


Figura 12. Análise dos produtos de PCR para identificação da linhagem clonal ST398 em *S. aureus* de origem animal por amplificação de sequências A07 (a) e C01 (b) em gel de agarose a 1%. A - Controlo positivo (*S. aureus* 25.1); B - Controlo negativo (*S. aureus* ATCC 25923); C - Controlo negativo (H₂O); D - BIOS-V4; E - BIOS-V60; F - DNA ladder 100 bp plus.

O PCR para identificação da linhagem ST398 foi validado, uma vez que todos os controlos apresentaram os resultados esperados, embora os produtos obtidos no PCR baseado na sequência A07 sejam mais fracos.

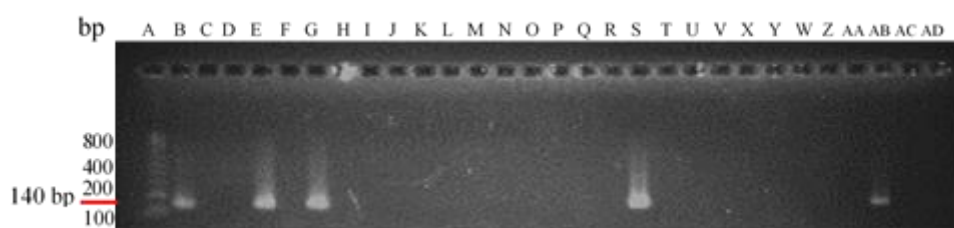


Figura 13. Análise dos produtos de PCR (C01) para identificação da linhagem clonal ST398 em *S. aureus* de origem animal em gel de agarose a 1%. A - DNA ladder 100 bp plus.; B - Controlo positivo (*S. aureus* 25.1); C - Controlo negativo (*S. aureus* ATCC 25923); D - Controlo negativo (H₂O); E - V147; F - V150; G - V151; H - V153; I - V154; J - V155; K - V156; L - V157; M - V158; N - V159; O - V160; P - V161; Q - V168; R - V172; S - V178; T - V183; U - V184; V - V185; X - V186; Y - V187; W - V200; Z - V201; AA - V202; AB - V203; AC - V204; AD - V245.

Esta abordagem permitiu identificar cinco isolados (BIOS-V4, BIOS-V147, BIOS-V151, BIOS-V178 e BIOS-V203) pertencentes à linhagem ST398. Um dos isolados testados (BIOS-V60) que não apresenta restrição por *Sma*I também não foi identificado como ST398.

3.3. Tipificação por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST)

A análise dos tipos identificados por *Bionumerics* serviu de base para a seleção de isolados representativos para tipificação por MLST, a qual permite identificar diferentes linhagens clonais. Foram selecionados 16 isolados da coleção de *S. aureus* de origem humana e 17 da coleção de *S. aureus* de origem animal. As Tabelas 15 e 16 sumarizam os perfis alélicos e respectivas sequências tipo encontradas nas duas coleções.

Tabela 15. Perfis alélicos e respectivas sequências tipo dos isolados de *S. aureus* representativos da coleção de origem humana.

Isolado	Pulsotipo	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqil</i>	ST	CC
BIOS-H2	A	46	75	49	44	13	68	60	152	152
BIOS-H32	B	2	2	2	2	6	3	2	30	30
BIOS-H21	C	3	3	1	1	4	4	3	8	8
BIOS-H28	D	1	4	1	4	12	1	10	5	5
BIOS-H5	E1	3	3	1	1	4	4	3	8	8
BIOS-H9	F1	10	4	1	4	12	1	10	New1	5
BIOS-H35	F2	1	4	1	4	12	1	10	5	5
BIOS-H7	G5	1	4	1	4	12	1	28	105	5
BIOS-H17	H	5	4	1	4	4	6	3	7	7
BIOS-H1	I	1	4	1	8	4	4	3	72	8
BIOS-H30	J	3	1	1	1	1	5	3	97	97
BIOS-H20	K1	13	13	1	1	12	11	13	15	15
BIOS-H4	L1	4	1	4	1	5	5	4	25	25
BIOS-H25	M	452	594	6	23	479	440	new6	New2	-
BIOS-H16	N	7	6	1	5	8	8	6	22	22
BIOS-H12	O	1	14	8	6	10	3	2	278	45

Admitindo que os isolados do mesmo pulsotipo partilham a mesma sequência tipo, a coleção de *S. aureus* de origem humana contém 14 linhagens clonais em 34 isolados. Os complexos clonais com maior relevância nesta coleção correspondem ao CC5, que engloba as linhagens clonais ST5, New1 e ST105 (11/34 isolados) e ao CC8, com as linhagens ST8 e ST72 (6/34 isolados) (Tabela 15). Alguns STs são referidos como New porque apresentam um perfil alélico ainda não descrito na base de dados. O ST New1 e ST105 são SLVs (variação num único loci, de *Single Locus Variant*) da linhagem ST5. Os ST97 e ST72 são TLVs de ST8, enquanto ST7 é TLV de ST72.

Em relação aos pares do mesmo indivíduo, podemos referir que cinco (BIOS-H2/H3, BIOS-H5/H6, BIOS-H17/H18, BIOS-H4/H24, BIOS-H26/H27) são do mesmo tipo de PFGE e também da mesma linhagem clonal, enquanto o sexto par (BIOS-H33/H11) pertence a tipos e linhagens distintas.

3 RESULTADOS

Em relação à coleção de *S. aureus* de origem animal, foram identificadas 15 linhagens clonais em 55 isolados, incluindo três possíveis novos STs (Tabela 16). Em relação aos novos STs identificados, New3 e New5, eles correspondem a SLVs de ST188 e ST5, respectivamente, enquanto New4 é TLV de ST72. Já o ST816 corresponde ao isolado BIOS-V60, que não foi digerido por *SmaI* e que não pertencia ao ST398.

Tabela 16. Perfis alélicos e respectivas sequências tipo dos isolados de *S. aureus* representativos da coleção de origem animal.

Isolado	Pulsotipo	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqil</i>	ST	CC
BIOS-V19	A	7	6	1	5	8	8	6	22	22
BIOS-V63	B	7	6	1	5	8	8	6	22	22
BIOS-V31	C	3	1	1	8	1	1	1	188	1
BIOS-V156	D	3	1	1	8	1	1	new7	New3	1
BIOS-V245	E1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BIOS-V279	F1	1	4	1	8	4	4	3	72	8
BIOS-V75	G	1	4	1	8	4	4	3	72	8
BIOS-V21	H	3	1	1	1	1	5	3	97	97
BIOS-V157	I	new8	3	1	1	4	4	3	New4	8
BIOS-V158	J	5	4	1	4	4	6	3	7	7
BIOS-V62	K1	13	13	1	1	12	11	13	15	15
BIOS-V255	L	1	4	1	4	12	1	28	105	5
BIOS-V153	M	1	4	1	4	12	1	28	105	5
BIOS-V74	N1	1	4	1	4	12	1	10	5	5
BIOS-V61	N2	1	4	1	4	12	1	10	5	5
BIOS-V70	N5	1	4	1	4	12	1	10	5	5
BIOS-V118	N6	6	4	1	4	12	1	484	New5	5
BIOS-V129	O	6	5	6	2	7	14	5	121	-
BIOS-V60	-	18	140	45	2	7	14	7	816	-

Nota: Os isolados pertencentes aos pulsotipos A e B haviam sido previamente caracterizados por MLST [52].

Os complexos clonais com maior peso nesta coleção são o CC22 e o CC5, correspondendo a 25 e 10 isolados, respectivamente (63,3%) (Tabela 16).

Tendo em conta os pares com origem no mesmo animal, podemos referir que todos (BIOS-V200/V201; BIOS-V204/V258; BIOS-V155/V184; BIOS-V74/V85) são do mesmo tipo de PFGE e da mesma linhagem clonal.

3.4. Diversidade genética das coleções em estudo

O grau de diversidade genética foi determinado através do índice de Simpson (SID), tendo sido calculado para cada coleção com base nos tipos de PFGE definidos por *Bionumerics*. O índice de Simpson e intervalo de confiança para cada coleção encontram-se descritos na Tabela 17.

Tabela 17. Grau de diversidade genética das coleções em estudo.

Coleção	SID	CI
<i>S. aureus</i> humana	0,92	0,87 – 0,98
<i>S. aureus</i> animal	0,84	0,77 – 0,92
<i>S. epidermidis</i> animal	0,93	0,83 – 1,03
<i>S. schleiferi</i> animal	0,68	0,50 – 0,87

Pelo cálculo do índice de Simpson, podemos observar que a coleção com maior diversidade genética corresponde a *S. epidermidis* de origem animal, e a menos diversa a coleção de *S. schleiferi* de origem animal. Quanto às duas coleções de *S. aureus*, verifica-se uma maior diversidade genética na coleção de origem humana.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Problemáticas

4.1.1. Técnicas de tipificação

A tipificação molecular por resolução de perfis de macrorestrição por PFGE é ainda considerada uma das técnicas padrão para tipificação molecular de agentes patogênicos, em particular na ausência de esquemas de MLST já estabelecidos. Mesmo quando existem esquemas de MLST, o PFGE apresenta, à partida, maior poder discriminatório, permitindo diferenciar estirpes dentro de uma mesma linhagem. No entanto, tem também várias desvantagens, incluindo um protocolo demoroso e exigente do ponto de vista experimental. Apresenta também dificuldades na análise de resultados, com alguma variabilidade associados aos perfis de restrição obtidos ou sua resolução, nomeadamente nas bandas de menor peso molecular. A coleção mais afetada por este problema é a coleção de *S. schleiferi*, pois esta técnica é das poucas metodologias de tipificação utilizadas nesta espécie, uma vez que não tem um esquema de MLST definido, sendo por isso importante obter padrões de boa qualidade que permitam correlacionar os diferentes isolados. Para a tipificação por PFGE de *S. schleiferi* utilizaram-se as condições aconselhadas por McDougal *et al.*, 2003 [122]. Embora se tenham testado outras condições de corrida, nomeadamente as definidas por Chung *et al.*, 2000 [121] para *S. aureus*, não foi possível melhorar a resolução dos fragmentos de menor dimensão. Ainda assim, a tipificação por PFGE apresenta um poder discriminatório bastante aceitável para *S. schleiferi*, pelo que a análise de futuras coleções poderá justificar uma otimização das condições de corrida especificamente para esta espécie.

4.1.2. Sistemas de classificação dos perfis de macrorestrição (Computacional vs Critérios de Tenover)

Neste trabalho utilizaram-se duas abordagens para classificação dos perfis de macrorestrição. A primeira baseia-se na análise visual dos fragmentos de restrição e aplicação dos chamados de critérios de Tenover. Estes critérios, definidos por Tenover e colegas em 1995 [119] baseiam-se na predição das alterações que podem ocorrer no perfil

de macrorestrição por ocorrência de um número discreto de eventos genéticos (um, dois ou mais eventos), sistematizando esta informação em termos de número de diferentes bandas obtidas em cada caso. Estes critérios foram estabelecidos no contexto de surto epidêmico, no qual temos uma estirpe que deu origem ao surto (estirpe *index*, contra a qual se comparam os perfis obtidos) e geralmente ocorre num período limitado [8, 19, 58]. A sua aplicação fora do contexto de surto, embora apelativa, porque é aparentemente simples e lógica, do ponto de vista biológico, geralmente revela-se problemática em coleções com elevado número de isolados e/ou em períodos de tempo alargados, desde logo pela ausência de uma estirpe *index*. Por outro lado, a análise computacional destes perfis, utilizando o sistema *Bionumerics* ou outro equivalente baseia-se na construção de dendrogramas baseados no método de UPGMA, com a definição de valores limite para a diferenciação dos diferentes perfis obtidos em tipos e sub-tipos. Tem como principais vantagens a análise dos perfis, facilitando ainda a comparação intra- e interlaboratorial.

Assim, embora se tenham utilizado os dois sistemas para classificar os perfis de macrorestrição obtidos, seguiu-se a classificação obtida pela análise computacional (*Bionumerics*). Para as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*, vários estudos reportaram já a robustez da tipificação molecular por *Sma*I-PFGE aliada a análise computacional, tendo sido estabelecidos critérios para a análise de padrões de macrorestrição e para definição de tipo e sub-tipo distintos para cada uma das espécies. Neste ponto, uma vez mais, a ausência de estudos similares e, por conseguinte, falta de critérios de análise e de tipificação para a espécie *S. schleiferi*, limitam a aplicação desta metodologia para esta espécie.

4.2. Clonalidade da coleção de *S. aureus* de origem humana

A análise dos pulsotipos estabelecidos por *Bionumerics* serviu de base para a seleção de isolados para caracterização por MLST, a qual permitiu identificar as diferentes linhagens clonais presentes nesta coleção de *S. aureus* de SSTIs em humanos.

Os complexos clonais CC5 (ST5, ST105 e New1), CC8 (ST8 e ST72) e CC22 (ST22) são os que aparecem com maior frequência nesta coleção, correspondendo a 22 dos 34 isolados (65%). Estes correspondem também aos CCs associados a HA-MRSA mais

prevalentes em Portugal [55] e no resto do mundo [75, 79-81, 84, 88]. Em linha com estes dados e analisando a distribuição de estirpes MRSA e MSSA [125], podemos observar que a linhagem ST22 é composta exclusivamente por estirpes MRSA, enquanto ST5, ST105 e ST8 compreendem tanto estirpes MRSA como MSSA (Figura 15).

Encontraram-se também linhagens clonais já associadas a HA-MSSA (ST15, ST278) e a MRSA (ST15, ST97, ST278). As linhagens ST7, ST15 e ST30 são três das linhagens MSSA com grande impacto em Portugal [56, 126]. A linhagem clonal ST97, geralmente associada a animais, é raramente descrita em humanos [88]. De acordo com estes dados, todas as estirpes desta coleção pertencentes a estes STs são MSSA (Figura 15). Quanto ao ST25, pode encontrar-se tanto em ambiente hospitalar como na comunidade [126, 127] e o ST152 encontra-se associado a MRSA na comunidade [84].

Os *S. aureus* englobados neste estudo foram isolados de infeções de pele e tecidos moles, em particular, de feridas nos membros inferiores e superiores, assim como de outras lesões de pele, em ambulatório. Em termos de SSTIs, as linhagens ST5, ST7, ST8, ST15, ST22, ST25, ST30, ST72, ST97 e ST105 foram até ao momento relacionadas com este tipo de infeções [128-133].

Dos isolados com origem no mesmo indivíduo, apenas um par (BIOS-H33/H11) pertence a linhagens diferentes do mesmo CC, uma estirpe MRSA pertencente ao ST5 e uma estirpe MSSA pertencente ao ST105, o que poderá ter implicações na terapêutica da infeção [125].

Foi ainda detetada uma nova linhagem clonal, provisoriamente designada New2, que aparenta não ser relacionada com as restantes identificadas (Figuras 15). A pesquisa na base de dados PubMLST indica que a linhagem mais próxima de New2 será ST3901, com o qual partilha seis alelos. Este último ST foi identificado, até ao momento, num único isolado de colonização nasal de um indivíduo na Alemanha, no ano de 2005.

4.3. Clonalidade da coleção de *S. aureus* de origem animal

Os complexos clonais mais frequentes na coleção de *S. aureus* de origem animal são o CC22 (ST22), o CC5 (ST5, ST105, New5), o CC8 (ST72 e New4) e o CC398 (ST398), com 45 em 55 isolados (82%).

Em Portugal, os isolados MRSA de animais de companhia estão frequentemente associados aos complexos clonais encontrados nos cuidados de saúde, nomeadamente CC22, CC5 e CC8 [52, 81, 88, 93-95, 134, 135]. Destaca-se a linhagem ST22 com 25 isolados MRSA. Já o complexo CC5 inclui tanto estirpes MRSA como MSSA [136]. A nova linhagem New4 do CC8 é representada por uma estirpe MRSA (Figura 15).

Em Portugal, como no resto da Europa, a linhagem clonal ST398 (CC398) é a que tem maior relevância em animais de produção [81, 93, 104], mas também está presente em animais de companhia [95, 97]. Neste estudo, apenas uma das estirpes ST398 é MRSA [136].

Nesta coleção encontrámos também as linhagens clonais ST7 e ST15, anteriormente descritas em estirpes MSSA de origem humana em Portugal [56]. Os nossos resultados estão em linha com a literatura, uma vez que estas linhagens são compostas por estirpes MSSA [136]. Em animais, a linhagem ST97 está associada à colonização de porcos, mas também a gado bovino e veados na Europa [81, 88]. O ST121 é mais uma das linhagens clonais descrito quer em humanos quer em animais de companhia na Europa [93]. Quanto ao ST816, o único isolado de um cavalo e que foi já descrito em feridas de cavalo [137].

Em termos de linhagens clonais, a coleção de *S. aureus* de origem humana apresenta uma maior diversidade do que *S. aureus* de origem animal. Considerando os pulsotipos obtidos por PFGE, também se confirma a maior diversidade da coleção de isolados humanos com *index* de Simpson de 0.92 vs. 0.84 para a coleção de origem animal.

Analisando em conjunto, as linhagens clonais identificadas nas duas coleções de *S. aureus* indicam a partilha de algumas linhagens, como é o caso de ST5, ST7, ST15, ST22, ST72, ST97 e ST105 (Figura 14).

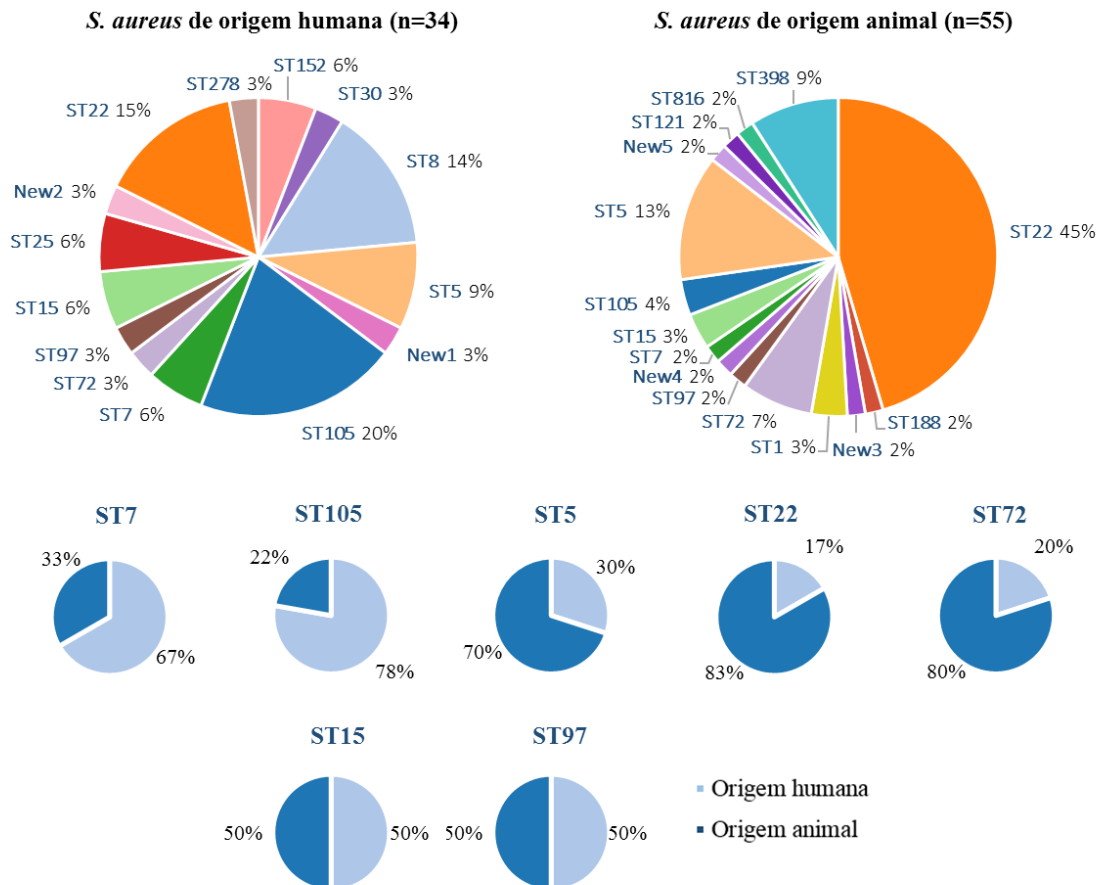


Figura 14. Diversidade das linhagens clonais presentes nas coleções de *S. aureus* associados a SSTIs em humanos e animais de companhia. Na parte inferior da figura destacam-se as linhagens identificadas nas duas coleções.

As linhagens ST7 e ST105 são mais abundantes em *S. aureus* de origem humana, enquanto ST5, ST22 e ST72 são mais observadas em *S. aureus* de origem animal e as linhagens ST15 e ST97 são igualmente dispersas em ambas as coleções (Figura 14).

Os ST5, ST7, ST15, ST22, ST72 e ST105 foram encontrados na coleção de *S. aureus* de origem animal, embora na bibliografia estejam essencialmente associados a isolados de origem humana [75, 79, 80, 82, 93, 126, 127, 135].

No seu conjunto as linhagens clonais ST22, ST5 e ST105 correspondem a mais de metade dos isolados das duas coleções (49/89 isolados) (Figura 14). Em termos globais, as linhagens encontradas nas duas coleções encontram-se agrupadas em 2 complexos clonais (Figura 15). É relevante observar que a maioria dos STs engloba tanto isolados de humanos como de animais.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

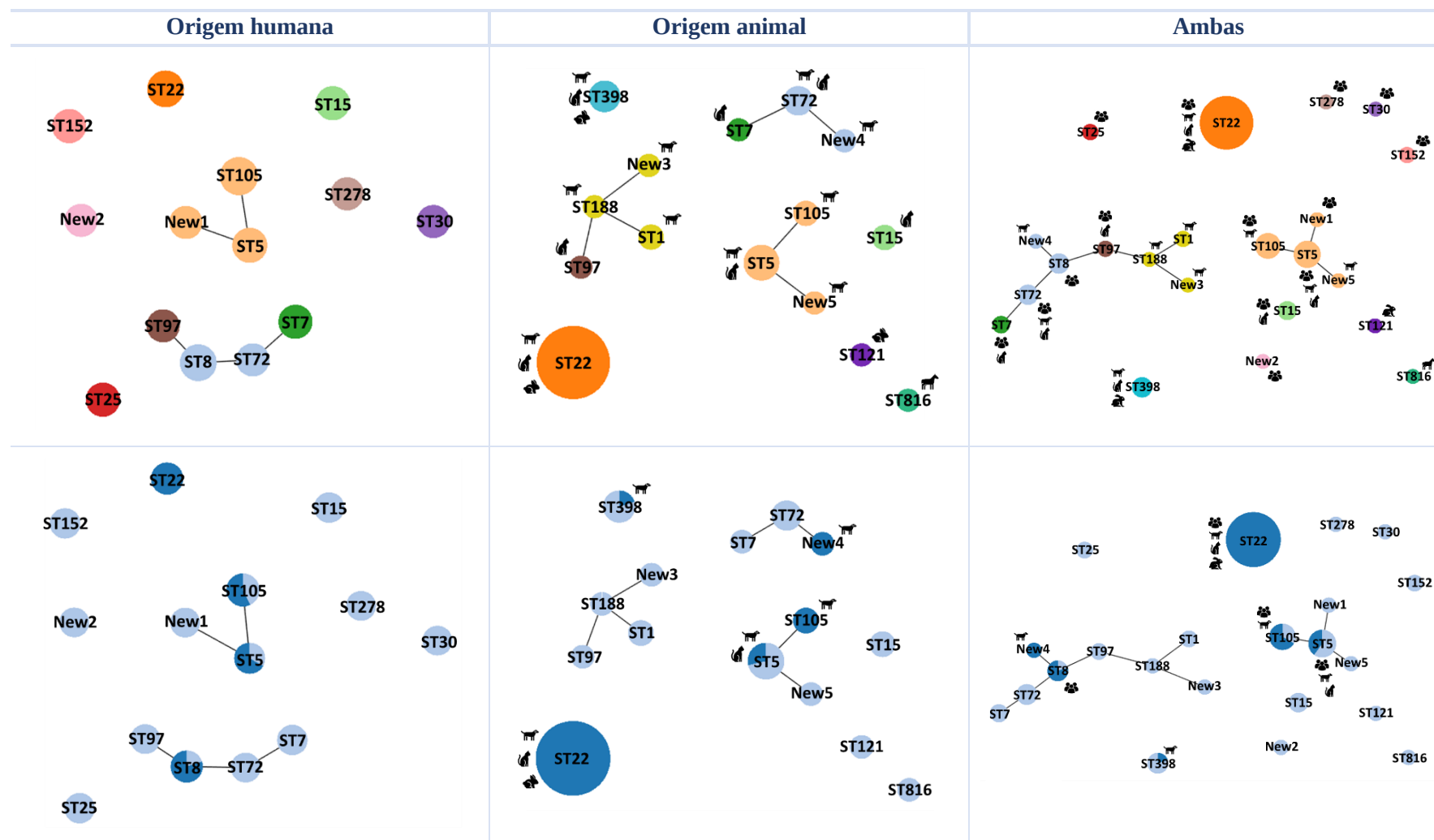


Figura 15. Análise comparativa das linhagens clonais identificadas nas duas coleções de *S. aureus* e distribuição de estirpes MSSA/MRSA. As estirpes MSSA e MRSA estão identificadas no painel inferior a azul claro e escuro, respetivamente. No painel inferior, apenas se destacam os hospedeiros com isolados MRSA.

A coleção de *S. aureus* de origem animal abarca todos os isolados recolhidos ao longo de dezanove anos (1999 a 2018) num laboratório e ao longo de dois anos (2017-2018) num segundo laboratório. A análise temporal da distribuição das diferentes linhagens clonais identificadas neste trabalho ao longo deste período e hospedeiros associados (Figura 16) permite detetar o aparecimento da linhagem ST22 no ano de 2008 em cães e a sua evolução até ao ano de 2018, distribuído por diferentes hospedeiros (Figura 18). Analisando o ano de 2014, o único para o qual se tem dados de estirpes humanas, verifica-se que o CC22 é o mais prevalente nas duas coleções, observando-se também a presença de ST97 em ambas.

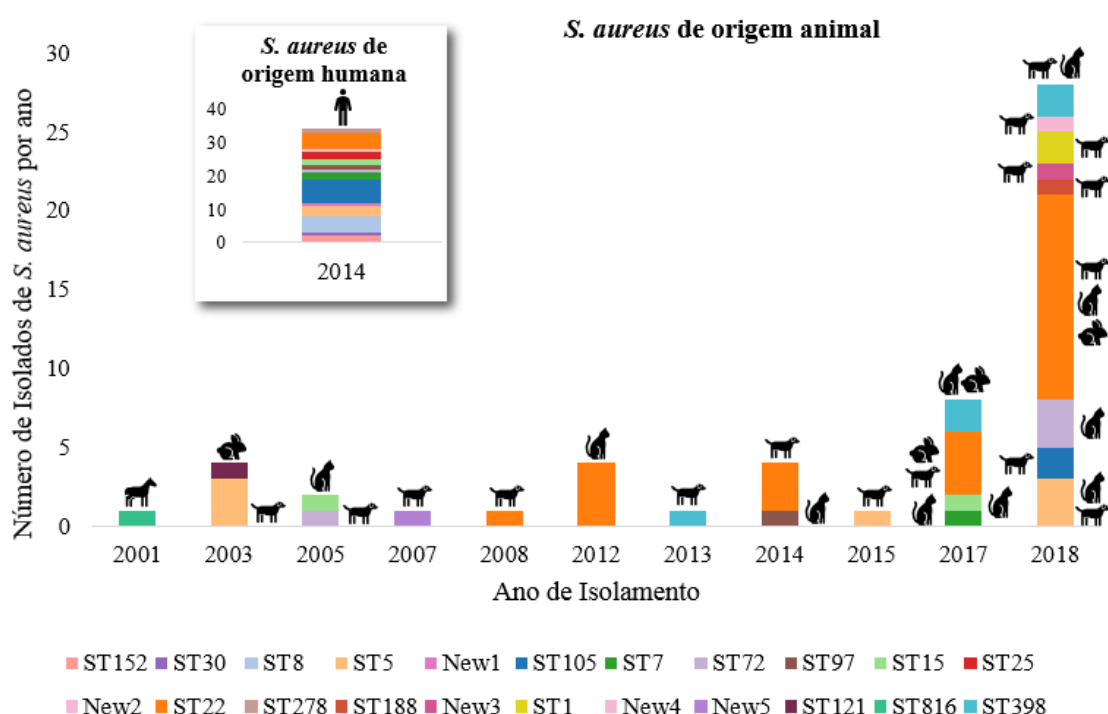


Figura 16. Linhagens clonais de *S. aureus* associados a SSTIs de origem animal ao longo do tempo. A título comparativo, indicam-se no gráfico interno as linhagens dos isolados de origem humana para o ano de 2014; os anos 2017 e 2018 incluem os isolados dos dois laboratórios.

Podemos referir que quase todas as linhagens clonais, dependendo do ano de isolamento, dizem respeito a único animal, com a exceção da linhagem ST22 (2017 e 2018), mas também das linhagens ST398 (2017 e 2018) e ST5 (2018). Embora o número de isolados seja relativamente pequeno, é de realçar que correspondem a todos os isolados de SSTIs recolhidos nos dois laboratórios no período de tempo estudado, pelo que deverão ser representativos da distribuição de *S. aureus* para este tipo de infeções nestes animais.

4.4. *S. epidermidis* de origem animal

Apesar do reduzido número de isolados analisados, a coleção de *S. epidermidis* mostrou ser a mais diversa (SID = 0,93). Embora, apenas se conheça a linhagem clonais de uma fração desta coleção, foram identificadas as linhagens ST5 e ST190, geralmente encontradas em humanos [18, 110]. Em particular, a linhagem ST5 pertence ao complexo clonal CC5, descrito como o mais prevalente nas infecções nosocomiais de *S. epidermidis* em Portugal [52, 106, 108], o que aparece apontar para uma partilha de clones entre animais de companhia e os seus respetivos donos, situação descrita recentemente por Gómez-Sanz *et al.*, 2019 [114].

4.5. *S. schleiferi* de origem animal

A coleção de *S. schleiferi* de origem animal mostrou ser a menos diversa do nosso estudo (SID = 0,68), com os diversos isolados agrupados em 19 perfis de restrição, o que sugere alguma clonalidade para esta espécie, como já proposto por outros autores [22, 24, 116]. Os dois isolados resistentes à metilicina (MRSS) pertencem a tipos diferentes, dos quais são os únicos representantes [138]. O único isolado *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* está incluído no pulsotipo A, que também engloba isolados de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, com perfis indistinguíveis entre si [116].

4.6. Considerações finais

Nesta Dissertação caracterizaram-se as linhagens clonais de três espécies de estafilococos associados a SSTIs em animais e humanos. Os dados obtidos são de relevância para um melhor conhecimento das estirpes associadas a este tipo de infeção em humanos e animais de companhia. No caso deste trabalho, permitiram ainda documentar a diversidade das coleções estudadas de cada espécie e assim assegurar a sua representatividade em trabalhos adicionais que venham a ser realizados com estas coleções.

As linhagens clonais identificadas pelas abordagens moleculares utilizadas demonstram uma partilha significativa de clones de *S. aureus* entre humanos e animais, com particular destaque para as linhagens de MRSA CC22 e CC5, associadas a estirpes hospitalares.

Estes dados enfatizam a importância de se conhecer a clonalidade das estirpes associadas a SSTIs em animais de companhia, que pela sua proximidade com o homem, podem representar um risco de transmissão, cuja direccionalidade poderá ser compreendida usando estas mesmas abordagens.

Por último, a partilha de linhagens clonais destes importantes agentes patogénicos entre humanos e animais, documentada nesta Dissertação, reforça a necessidade de uma abordagem *OneHealth* no seu estudo e disponibiliza dados epidemiológicos relevantes para uma melhor monitorização da sua evolução.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Götz F, Bannerman T, Schleifer KH. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Em: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The prokaryotes. Nova Iorque: Springer US, 2006. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/0-387-30744-3_1
- 2 Schleifer KH, Bell JA. *Staphylococcus*. Em: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Dedysh S, Hedlund B. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118960608.gbm00569>
- 3 Becker K, Skov RL, von Eiff C. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. Em: Pfaller MA, Richter SS, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Carroll KC, Warnock D. Manual of clinical microbiology. Washington: American Society of Microbiology, 2015. Disponível em: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381.mcm11.ch21>
- 4 EUZÉBY JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acesso em: 13 de outubro de 2019.
- 5 Miragaia M, de Lencastre H, Barroso H, Melo-Silvestre A, Taveira N. Bacteriologia médica – *Staphylococcus aureus* e espécies relacionadas. Em: Microbiologia médica – fundamentos da microbiologia, conceitos básicos de resposta imunológica, princípios de diagnóstico microbiológico médico e bacteriologia. Lisboa: LIDEL, 2014.
- 6 Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Veterinary Microbiology. 2009. 134, 45–54.
- 7 Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clinical Microbiology Reviews. 2014. 27, 870–926.
- 8 Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology. 2009. 7, 629–41.
- 9 Schaumburg F, Pauly M, Anoh E, Mossoun A, Wiersma L, Schubert G, Flammen A, Alabi AS, Muyembe-Tamfum JJ, Grobusch MP, Karhemere S, Akoua-Koffi C, Couacy-Hymann E, Kremsner PG, Mellmann A, Becker K, Leendertz FH, Peters G.

- Staphylococcus aureus* complex from animals and humans in three remote African regions. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015. 21, 345.e1–8.
- 10 Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus*. Em: Taylor TA, Unakal CG. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
 - 11 Zhao C, Liu Y, Zhao M, Liu Y, Yu Y, Chen H, Sun Q, Chen H, Jiang W, Liu Y, Han S, Xu Y, Chen M, Cao B, Wang H. Characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infection in Beijing: high prevalence of PVL+ ST398. *PLoS ONE*. 2012. 7, 1–6.
 - 12 Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015. 28, 603–61.
 - 13 Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics in Review*. 2018. 39, 287–98.
 - 14 Weese JS. Staphylococcal control in the veterinary hospital: infection control of staphylococcal infection. *Veterinary Dermatology*. 2012. 23, 292–358.
 - 15 Bar-Gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehrlich R, Monecke S, Leitner G. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Veterinary Microbiology*. 2015. 176, 143–54.
 - 16 Otto M. *Staphylococcus epidermidis* — the «accidental» pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 2009. 7, 555–67.
 - 17 Nguyen TH, Park MD, Otto M. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections. *Frontiers in Cellular Infection and Microbiology*. 2017. 7, 1–7.
 - 18 Kern A, Perreten V. Clinical and molecular features of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci of pets and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013. 68, 1256–66.
 - 19 Lee F. Diagnostics and laboratory role in outbreaks. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2017. 30, 419–24.
 - 20 Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, Nervi C, F Jean. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two

- species from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1988. 38, 168–72.
- 21 Igimi S, Takahashi E, Mitsuoka T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1990. 40, 409–11.
 - 22 Roberts S, O'Shea K, Morris D, Robb A, Morrison D, Rankin S. A real-time PCR assay to detect the Pantón Valentine Leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals. *Veterinary Microbiology*. 2005. 107, 139–44.
 - 23 Swe T, Naing AT, Baqui A, Khillan R. Methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* infection in a patient with hepatocellular carcinoma. *Journal of Investigative Medicine*. 2016. 4, 1–3.
 - 24 Kluytmans J, Berg H, Steegh P, Vandenesch F, Etienne J, van Belkum A. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. 36, 2214–9.
 - 25 May ER, Hnilica KA, Frank LA, Jones RD, Bemis DA. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2005. 227, 928–31.
 - 26 Vandenesch F, Lebeau C, Bes M, McDevitt D, Greenland T, Novick RP, Etienne J. Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptional and post-transcriptional defects. *Journal of Medical Microbiology*. 1994. 40, 344–9.
 - 27 Leung MJ, Nuttall N, Mazur M, Taddei TL, McComish M, Pearman JW. Case of *Staphylococcus schleiferi* endocarditis and a simple scheme to identify clumping factor-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. 37, 3353–6.
 - 28 Thibodeau E, Boucher H, DeNofrio D, Pham DT, Snyderman D. First report of a left ventricular assist device infection caused by *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*: a coagulase-positive organism. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012. 74, 68–9.

- 29 Frank LA, Kania SA, Hnilica KA, Wilkes RP, Bemis DA. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2003. 222, 451–4.
- 30 Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). Veterinary Dermatology. 2006. 17, 332–7.
- 31 Stratton C. Molecular mechanisms of action for antimicrobial agents: general principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. Em: Lorian V, Rice L, Stratton C. Antibiotics in laboratory medicine. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. Disponível em: https://www.academia.edu/32438978/Antibiotics_in_Laboratory_Medicine_5th_Edition
- 32 Cheesman M, Ilanko A, Blonk B, Cock I. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? Pharmacognosy Reviews. 2017. 11, 57–72.
- 33 Landecker H. Antibiotic resistance and the biology of history. Body & Society. 2016. 22, 19–52.
- 34 Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. Clinical Microbiology Reviews. 2018. 31, 1–103.
- 35 Podolsky SH. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). Palgrave Communications. 2018. 4, 1–8.
- 36 McDermott PF, Walker RD, White DG. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. International Journal of Toxicology. 2003. 22, 135–43.
- 37 Wright GD. Q&A: antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? BMC Biology. 2010. 8, 1–6.
- 38 Waxman DJ, Strominger JL. β -Lactam antibiotics: biochemical modes of action. Em: Morin RB, Gorman M. The biology of β -lactam antibiotics. Cambridge: Academic Press, 1982. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125063036>

- 39 Barna JCJ, Williams DH. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annual Reviews in Microbiology*. 1984. 38, 339–57.
- 40 Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 2014. 124, 2836–40.
- 41 Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiology Reviews*. 1987. 51, 88–134.
- 42 Rice L. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Em: Lorian V, Rice L, Stratton C. *Antibiotics in laboratory medicine*. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. Disponível em: https://www.academia.edu/32438978/Antibiotics_in_Laboratory_Medicine_5th_Edition
- 43 Hooper DC. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs*. 1999. 2, 6–10.
- 44 Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarull LI, Carrasco-Lopez C, Kumarasiri M, Lastochkin E, Fishovitz J, Dawley M, Hesek D, Lee M, Johnson JW, Fisher JF, Chang M, Mobashery S, Hermoso JA. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. 110, 16808–13.
- 45 Howden BP, Peleg AY, Stinear TP. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014. 21, 575–82.
- 46 Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015. 40, 277–83.
- 47 Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *Journal of Clinical Investigation*. 2004. 114, 1693–6.
- 48 Friães A, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M, Melo-Cristino J. Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. *Epidemiology and Infection*. 2015. 143, 745–8.
- 49 Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 2003. 111, 1265–73.
- 50 Love DM. Antimicrobial resistance is a shared global problem. *Veterinary Record*. 2018. 183, 626.

- 51 Hassan YI, Kosir V, Yin X, Ross K, Diarra MS. Grape pomace as a promising antimicrobial alternative in feed: a critical review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019. 67, 9705–18.
- 52 Couto N, Monchique C, Belas A, Marques C, Gama LT, Pomba C. Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016. 71, 1479–87.
- 53 Mollaghan AM. Changing epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Sciences*. 2011. 68, 171–3.
- 54 Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*. 2014. 22, 42–7.
- 55 Tavares A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in Portugal: origin, epidemiology and virulence. Tese de Doutorado. Oeiras: Instituto de Tecnologia Química e Biológica - Universidade Nova de Lisboa, 2014. Disponível em: <https://run.unl.pt/handle/10362/14236>
- 56 Tavares A, Faria NA, de Lencastre H, Miragaia M. Population structure of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) in Portugal over a 19-year period (1992–2011). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014. 33, 423–32.
- 57 Farber JM. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*. 1996. 59, 1091–101.
- 58 Figueroa CJ, Tang Y-W, Taur Y. Principles and applications of genomic diagnostic techniques. Em: Tang Y, Sussman M, Liu D, Poxton I, Joseph Schwartzman J. *Molecular medical microbiology*. Amesterdão: Elsevier, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971692000226>
- 59 Shopsis B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*. 2001. 7, 323–6.
- 60 Hallin M, Deplano A, Struelens MJ. Molecular typing of bacterial pathogens: a tool for the epidemiological study and control of infectious diseases. Em: Morand S, Beaudeau F, Cabaret J. *New frontiers of molecular epidemiology of infectious diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/226251890_Molecular_Typing_of_Bacter

- ial_Pathogens_A_Tool_for_the_Epidemiological_Study_and_Control_of_Infectious_Diseases
- 61 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*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38, 1008–15.
 - 62 Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjö U, Coombes G, Cookson B. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 european laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. 41, 1574–85.
 - 63 Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012. 31, 7–20.
 - 64 Parizad EG, Valizadeh A. The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016. 10, 1–4.
 - 65 van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyörälä S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011. 66, 2705–14.
 - 66 Wang X, Jordan IK, Mayer LW. A phylogenetic perspective on molecular epidemiology. Em: Tang Y, Sussman M, Liu D, Poxton I, Joseph Schwartzman J. *Molecular medical microbiology*. Amesterdão: Elsevier, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971692000299>
 - 67 Ruppitsch W. Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation. *Journal of Land Management, Food and Environment*. 2016. 67, 199–224.
 - 68 Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*. 2005. 33, 728–33.

- 69 Javid F, Taku A, Bhat MA, Badroo GA, Mudasir M, Sofi TA. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. *Veterinary World*. 2018. 11, 423–30.
- 70 Goering RV, Morrison D, Al-Doori Z, Edwards GFS, Gemmell CG. Usefulness of *mec*-associated direct repeat unit (*dru*) typing in the epidemiological analysis of highly clonal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Scotland. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008. 14, 964–9.
- 71 Ekblom R, Wolf JBW. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary Applications*. 2014. 7, 1026–42.
- 72 He Y. Bacterial whole-genome determination and applications. Em: Tang Y, Sussman M, Liu D, Poxton I, Joseph Schwartzman J. *Molecular medical microbiology*. Amsterdão: Elsevier, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971692000202>
- 73 Deplano A, Dodémont M, Denis O, Westh H, Gumpert H, Larsen AR, Larsen J, Kearns A, Pichon B, Layer F, Schulte B, Wolz C, Spiliopoulou I, Brennan G, Empel J, Hryniewicz W, de Lencastre H, Faria NA, Codita I, Sabat AJ, Friedrich AW, Deurenberg RH, Tristan A, Laurent F, Vandenesch F. European external quality assessments for identification, molecular typing and characterization of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018. 73, 2662–6.
- 74 van Wamel WJB, Maňásková SH, Fluit AC, Verbrugh H, de Neeling AJ, van Duijkeren E, van Belkum A. Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010. 29, 119–22.
- 75 Harris SR, Feil EJ, Holden MTG, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, Gardete S, Tavares A, Day N, Lindsay JA, Edgeworth JD, de Lencastre H, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science*. 2010. 327, 469–74.
- 76 Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology*. 2003. 185, 3307–16.

- 77 Feil EJ. Linkage, selection, and the clonal complex. Em: Robinson DA, Falush D, Feil EJ. *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470600122.ch2>
- 78 Aires-de-Sousa M, Conceição T, Simas C, de Lencastre H. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from portuguese hospitals and the community. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. 43, 5150–7.
- 79 Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002. 40, 4289–94.
- 80 Achtman M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2012. 367, 860–7.
- 81 Aires-de-Sousa M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017. 23, 373–80.
- 82 O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Gracey M, Moss F, Christiansen KJ, Grubb WB. Population dynamics of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in remote communities. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009. 64, 684–93.
- 83 Nübel U, Dordel J, Kurt K, Strommenger B, Westh H, Shukla SK, Žemličková H, Leblois R, Wirth T, Jombart T, Balloux F, Witte W. A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*. 2010. 6, 1–12.
- 84 Willems RJL, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011. 35, 872–900.
- 85 Stegger M, Wirth T, Andersen PS, Skov RL, De Grassi A, Simões PM, Tristan A, Petersen A, Aziz M, Kiil K, Cirković I, Udo EE, del Campo R, Vuopio-Varkila J, Ahmad N, Tokajian S, Peters G, Schaumburg F, Olsson-Liljequist B, Givskov M, Driebe EE, Vigh HE, Shittu A, Ramdani-Bougessa N, Rasigade JP, Price LB,

- Vandenesch F, Larsen AR, Laurent F. Origin and evolution of european community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. mBio. 2014. 5, 1–12.
- 86 Espadinha D, Faria NA, Miragaia M, Lito LM, Melo-Cristino J, de Lencastre H. Extensive dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the hospital and the community in a country with a high prevalence of nosocomial MRSA. PLoS ONE. 2013. 8, 1–8.
- 87 Faria NA, Miragaia M, de Lencastre H. Massive dissemination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infections in a high MRSA prevalence country: establishment and diversification of EMRSA-15. Microbial Drug Resistance. 2013. 19, 483–90.
- 88 Monecke S, Gavier-Widén D, Hotzel H, Peters M, Guenther S, Lazaris A, Loncaric I, Müller E, Reissig A, Ruppelt-Lorz A, Shore AC, Walter B, Coleman DC, Ehrlich R. Diversity of *Staphylococcus aureus* isolates in european wildlife. PLoS ONE. 2016. 11, 1–27.
- 89 Breurec S, Zriouil SB, Fall C, Boissier P, Brisse S, Djibo S, Etienne J, Fonkoua MC, Perrier-Gros-Claude JD, Pouillot R, Ramarokoto CE, Randrianirina F, Tall A, Thiberge JM, Laurent F, Garin B. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: emergence and spread of atypical clones. Clinical Microbiology and Infection. 2011. 17, 160–5.
- 90 Turnidge J, Coombs G, Daley D, Nimmo G. MRSA: a tale of three types 15 years of survey data from AGAR. Em: Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR). Australian Commission on Safety and Quality in Health Care. Sydney: ACSQHC, 2016. Disponível em: <https://www.safetyandquality.gov.au/sites/default/files/migrated/MRSA-A-Tale-of-Three-Types.pdf>
- 91 Challagundla L, Luo X, Tickler IA, Didelot X, Coleman DC, Shore AC, Coombs GW, Sordelli DO, Brown EL, Skov R, Larsen AR, Reyes J, Robledo IE, Vazquez GJ, Rivera R, Fey PD, Stevenson K, Wang SH, Kreiswirth BN, Mediavilla JR, Arias CA, Planet PJ, Nolan RL, Tenover FC, Goering RV, Robinson DA. Range expansion and the origin of USA300 north american epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. mBio. 2018. 9, 1–15.

- 92 Peng H, Liu D, Ma Y, Gao W. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017. *Scientific Reports*. 2018. 8, 1–8.
- 93 Couto N, Belas A, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C. Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015. 70, 2483–7.
- 94 Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C, Cuny C, Verspohl J, Witte W, Schwarz S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006. 57, 461–5.
- 95 Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Zarazaga M. High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2013. 36, 83–94.
- 96 Haenni M, Châtre P, Dupieux-Chabert C, Métayer V, Bes M, Madec J-Y, Laurent F. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses, cats, and dogs over a 5-year period in France. *Frontiers in Microbiology*. 2017. 8, 1–8.
- 97 Uhlemann AC, Porcella SF, Trivedi S, Sullivan SB, Hafer C, Kennedy AD, Barbian KD, McCarthy AJ, Street C, Hirschberg DL, Lipkin WI, Lindsay JA, DeLeo FR, Lowy FD. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. *mBio*. 2012. 3, 1–9.
- 98 Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, Mateus A, Moreno MA, Pyörälä S, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Kunsagi Z, Torren-Edo J, Jukes H, Törneke K. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016. 72, 957–68.
- 99 Zarazaga M, Gómez P, Ceballos S, Torres C. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* lineages in the animal–human interface. Em: Fetsch A.

- Staphylococcus aureus*. Amesterdão: Elsevier, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096710000103>
- 100** Elstrom P, Grontvedt CA, Gabrielsen C, Stegger M, Angen O, Åmdal S, Enger 3, Urdahl AM, Jore S, Steinbakk M, Sunde M. Livestock-associated MRSA CC1 in Norway: introduction to pig farms, zoonotic transmission, and eradication. *Frontiers in Microbiology*. 2019. 10, 1–11.
- 101** Lozano C, Gharsa H, Slama KB, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. a review in the african continent. *Microorganisms*. 2016. 4, 1–19.
- 102** Ye X, Fan Y, Wang X, Liu W, Yu H, Zhou J, Chen S, Yao Z. Livestock-associated methicillin and multidrug resistant *S. aureus* in humans is associated with occupational pig contact, not pet contact. *Scientific Reports*. 2016. 6, 1–9.
- 103** Quitoco IMZ, Ramundo MS, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Beltrame CO, Oliveira T, Araújo R, Del Peloso PF, Coelho LR, Figueiredo A. Firt report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). *BMC Research Notes*. 2013. 6, 1–7.
- 104** Becker K, Ballhausen B, Köck R, Kriegeskorte A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of *mecC*, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014. 304, 794–804.
- 105** Argudín MA, Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Vandecandelaere I, André FX, Denis O, Butaye P. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus epidermidis* recovered from animals and humans. *Veterinary Microbiology*. 2015. 178, 105–13.
- 106** Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*. 2007. 189, 2540–52.
- 107** Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007. 45, 616–9.

- 108** Rolo J, de Lencastre H, Miragaia M. Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCCmec. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012. 67, 1333–41.
- 109** Cherifi S, Byl B, Deplano A, Nonhoff C, Denis O, Hallin M. Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013. 51, 1541–7.
- 110** Weiss S, Kadlec K, Feßler AT, Schwarz S. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus pettenkoferi* from a small animal clinic. *Veterinary Microbiology*. 2013. 167, 680–5.
- 111** Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012. 56, 4656–61.
- 112** Barros M, Branquinho R, Grosso F, Peixe L, Novais C. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*, Portugal, 2012. *Emerging Infectious Diseases*. 2014. 20, 903–5.
- 113** Marques C, Belas A, Franco A, Aboim C, Gama LT, Pomba C. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018. 73, 377–84.
- 114** Gómez-Sanz E, Ceballos S, Ruiz-Ripa L, Zarazaga M, Torres C. Clonally diverse methicillin and multidrug resistant coagulase negative staphylococci are ubiquitous and pose transfer ability between pets and their owners. *Frontiers in Microbiology*. 2019. 10, 1–17.
- 115** Sousa M, Silva N, Igrejas G, Silva F, Sargo R, Alegria N, Benito D, Gómez P, Lozano C, Gómez-Sanz E, Torres C, Caniça M, Poeta P. Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp. recovered from birds of prey in Portugal. *Veterinary Microbiology*. 2014. 171, 436–40.
- 116** Cain CL, Morris DO, O'Shea K, Rankin SC. Genotypic relatedness and phenotypic characterization of *Staphylococcus schleiferi* subspecies in clinical samples from dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 2011. 72, 96–102.

- 117 Kunder DA, Cain CL, O'Shea K, Cole SD, Rankin SC. Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Staphylococcus schleiferi* in clinical samples from dogs in different geographic regions of the United States. *Veterinary Dermatology*. 2015. 26, 406–94.
- 118 Davis MF, Cain CL, Brazil AM, Rankin SC. Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: wolves in sheep's clothing? *Frontiers in Microbiology*. 2013. 4, 1–4.
- 119 Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995. 33, 2233–9.
- 120 Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. 98, 9865–70.
- 121 Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Aires-de-Sousa M, Adamsson I, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Sanches IS, Song JH, Tassios PT, Villari P. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microbial Drug Resistance*. 2000. 6, 189–98.
- 122 McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. 41, 5113–20.
- 123 Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazao N, de Lencastre H, Almeida JS. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. 43, 5483–90.

- 124 Carriço JA, Silva-Costa C, Melo-Cristino J, Pinto FR, de Lencastre H, Almeida JS, Ramirez M. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006. 44, 2524–32.
- 125 Ferreira MC. A resistência a biocidas e antibióticos tópicos em *Staphylococcus aureus* de origem humana. Tese de Mestrado. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), 2019.
- 126 Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. 99, 7687–92.
- 127 Day NPJ. A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 2002. 292, 114–116.
- 128 Xiao N, Yang J, Duan N, Lu B, Wang L. Community-associated *Staphylococcus aureus* PVL+ ST22 predominates in skin and soft tissue infections in Beijing, China. *Infection and Drug Resistance*. 2019. 12, 2495–503.
- 129 Kumar N, David MZ, Boyle-Vavra S, Sieth J, Daum RS. High *Staphylococcus aureus* colonization prevalence among patients with skin and soft tissue infections and controls in an urban emergency department. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015. 53, 810–5.
- 130 Ko J, Chung DR, Park SY, Baek JY, Kim SH, Kang C-I, Peck KR, Lee NY, Song J-H. First imported case of skin infection caused by PVL-positive ST30 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in a returning Korean traveler from the Philippines. *Journal of Korean Medical Sciences*. 2013. 28, 1100–2.
- 131 Joo E-J, Chung DR, Ha YE, Park SY, Kang S-J, Kim SH, Kang C-I, Peck KR, Lee NY, Ko KS, Song J-H. Community-associated Pantón–Valentine leukocidin-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST72-MRSA-IV) causing healthcare-associated pneumonia and surgical site infection in Korea. *Journal of Hospital Infection*. 2012. 81, 149–55.
- 132 Gu F-F, Hou Q, Yang H-H, Zhu Y-Q, Guo X-K, Ni Y-X, Han L-Z. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from non-native patients with skin and soft tissue infections in Shanghai. *PLoS ONE*. 2015. 10, 1–12.

- 133** Costa DSPEO. Update on the population structure of MRSA causing infection in a central hospital and in healthcare centers in Portugal. Tese de Mestrado. Lisboa: Instituto de Tecnologia Química e Biológica, 2012. Disponível em: <https://run.unl.pt/bitstream/10362/7101/1/Costa%2c%20Diana%20TM%202012.pdf>
- 134** Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. 46, 2155–61.
- 135** Dabul ANG, Camargo ILBC. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2014. 142, 479–83.
- 136** Ribeiro R. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de animais de companhia. Tese de Mestrado. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), 2019.
- 137** Vincze S. *Staphylococcus aureus* in companion animals: an infection source for the community? Tese de Mestrado. Berlim: Freie University, 2014. Disponível em: https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/fub188/193/Vincze_online.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 138** Oliveira V. Estudo da resistência a biocidas e antibióticos em estafilococos associados a infecções em animais de companhia. Tese de Mestrado. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), 2019.