

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO FENOGENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE
MASTITES CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS EM UNIDADES
LEITEIRAS DE MUNICÍPIOS DO RIO DE JANEIRO COMO
SUBSÍDIO PARA IMPLEMENTAÇÃO DE MEDIDAS DE
CONTROLE.**

Elaine Conceição Liporage de Mendonça

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO FENOGENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE
MASTITES CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS EM UNIDADES
LEITEIRAS DE MUNICÍPIOS DO RIO DE JANEIRO COMO
SUBSÍDIO PARA IMPLEMENTAÇÃO DE MEDIDAS DE
CONTROLE.**

Elaine Conceição Liporage de Mendonça

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientção da professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências, no Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

Seropédica, RJ
Março de 2012

636.2089819

M539c

T

Mendonça, Elaine Conceição Liporage de,
1982-

Caracterização fenogenotípica da
resistência antimicrobiana em
Staphylococcus spp. isolados de mastites
clínicas e subclínicas em unidades
leiteiras de municípios do Rio de Janeiro
como subsídio para implementação de medidas
de controle / Elaine Conceição Liporage de
Mendonça. - 2012.

73 f.: il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de
Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 47-62.

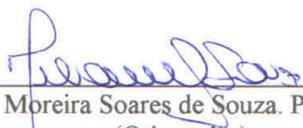
1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Mastite
- Teses. 3. Mastite - Tratamento - Teses.
4. Estafilococos - Teses. I. Souza,
Miliane Moreira Soares de, 1971-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

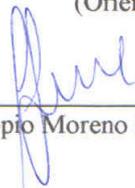
ELAINE CONCEIÇÃO LIPORAGE DE MENDONÇA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

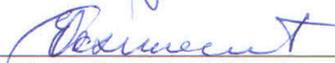
TESE APROVADA EM 16/03/2012.



Miliane Moreira Soares de Souza. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)



José Procópio Moreno Senna Ph.D. FIOCRUZ



Elmiro Rosendo do Nascimento Ph.D. UFF

**Dedico esta vitória à amada Rural,
que se tornou parte da minha vida,
que me acolheu e me fez amadurecer.**

**Obrigada por ter me preparado
para o mundo e não apenas para
ser Médica Veterinária!!!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela minha vida, pela família maravilhosa que tenho, pelo marido que reservou para mim e por todas as pessoas abençoadas que coloca em meu caminho. Obrigada Senhor por ter guardado um espaço no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRuraRJ para mim!!!Sou imensamente grata pela força de todos os dias, pela tua luz e proteção. Que a tua vontade prevaleça sobre a minha vida SEMPRE!

Aos meus pais, ASSUNAURO MENDES DE MENDONÇA e ELIANA LIPORAGE DE MENDONÇA, pelo amor incondicional, por dividirem comigo derrotas e vitórias, pela dedicação de uma vida inteira e por terem investido e acreditado tanto em mim. Muito Obrigada meus amores!!!

Ao meu marido, ANDRÉ EFRAIN DOS ANJOS CAMARA. Obrigada por dar asas aos meus sonhos, por estar sempre ao meu lado vivenciando cada momento, pela tranquilidade que me transmite e por ter tido tanta paciência comigo. A vitória é nossa! Amo muito você, Lindo!!!

À minha irmã MARTA LIPORAGE DE MENDONÇA, agradeço por ser minha grande amiga em todos os momentos, por me incentivar, por apoiar meus passos e pela alegria que me transmite, sendo a luz da minha vida. Te amo muito!!!

Ao meu cunhado, FABIO ADRIANO MOREIRA DA COSTA, pela torcida e grande apoio. Você é um irmão maravilhoso que ganhei de DEUS!!!Muito obrigada por tudo!!!

Aos meus sobrinhos, GUSTAVO LIPORAGE DE MENDONÇA DA COSTA e RAPHAEL LIPORAGE DE MENDONÇA DA COSTA, por encherem minha vida de MUITO mais vida. Obrigada por existirem, queridos!!! Amo vocês demais!!!

À minha avó, TEREZINHA GUIMARÃES LIPORAGE pela paz que me transmite, pelas orações e por torcer por mim sempre. Obrigada!!!

À toda minha família pela torcida!!

À minha orientadora MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA, por ter me aceitado como sua orientada, por seu exemplo de profissional e integridade e pelas responsabilidades que me confiou, permitindo que eu crescesse profissional e pessoalmente. Sou muito grata!!!

À minha co-orientadora SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO, agradeço por tudo que me ensinou, pela paciência, pelas horas de dedicação e doação, e pelo acompanhamento incansável. Obrigada por tudo!!!

À professora IRENE DA SILVA COELHO, por seu carinho, paciência e ajuda sem tamanho, por sua grande dedicação e por ter me ensinado tanto. Muito obrigada, Flor!!!

Vocês três me ensinam a viver e a amar o laboratório intensamente!

À amiga TATIANI ABREU DE ALENCAR, agradeço por todos os momentos felizes e difíceis que vivemos juntas, por tudo que crescemos e aprendemos e pelo grande companheirismo.

À amiga DAYANNE ARAÚJO DE MELO, pelos longos momentos de parceria, alegria e auxílio na realização deste trabalho.

À amiga VIVIANE FIGUEIRA MARQUES, por tudo que dividimos e aprendemos juntas.

Às amigas BIANCA DA S. SOARES e GREICIANE F. B. DE ALMEIDA, obrigada pela ajuda neste trabalho.

Ao amigo MARCELO OLIVA, por tornar o laboratório mais divertido.

Ao estagiário FELIPE CARLOS DUBENCZUR, sou grata por sua dedicação, pelo carinho e pelo compromisso em auxiliar o desenvolvimento deste trabalho.

Às estagiárias CÁSSIA COUTO DA MOTTA e ANNA CAROLINA COELHO M. ROJAS, pelo apoio.

Ao Curso de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ, pela oportunidade de aprendizado e formação.

Agradeço a COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pela bolsa de estudos durante este mestrado. E a FUNDAÇÃO CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) pelo apoio e projetos que nos foram contemplados.

BIOGRAFIA

Elaine Conceição Liporage de Mendonça, filha de Assunauro Mendes de Mendonça e Eliana Liporage de Mendonça, nascida em 10 de dezembro de 1982, na cidade de Duque de Caxias, no Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário e ensino fundamental na escola Educandário Santa Cecília no bairro Vila São Luiz em Duque de Caxias. Curso o ensino médio e Pré-vestibular no Colégio GPI na cidade de Duque de Caxias.

No ano de 2004 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, diplomando-se em março de 2009.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2010, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a. Ph.D. Miliane Moreira Soares de Souza e Co-orientação da Prof.^a Dr.^a Shana de Mattos de Oliveira Coelho. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de agosto de 2010 a fevereiro de 2012.

RESUMO

MENDONÇA, Elaine Conceição Liporage. **Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastites clínicas e subclínicas em unidades leiteiras de municípios do Rio de Janeiro como subsídio para implementação de medidas de controle.** 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A utilização de antibióticos no controle das infecções intramamárias e na eliminação de prováveis fontes de infecção nas fazendas leiteiras se constitui em importante medida de controle. No entanto, o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode gerar o aparecimento de cepas resistentes e comprometer a eficiência do tratamento. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina e são frequentemente resistentes aos antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, principalmente por dois mecanismos distintos: a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção de PBP2a ou PBP2', uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA*. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibióticos betalactâmicos, como a oxacilina e cefoxitina. O gene *mecA* está inserido no cromossomo estafilocócico através de um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*). O presente estudo avaliou o perfil fenogenotípico de resistência aos beta-lactâmicos em 250 isolados de *Staphylococcus* spp, utilizando os marcadores oxacilina e cefoxitina, de modo a produzir dados que possam contribuir para o conhecimento da resistência antimicrobiana em algumas propriedades leiteiras das regiões Sul-Fluminense e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro com o objetivo de subsidiar a implementação de medidas de controle dessa enfermidade. A avaliação da resistência foi feita a partir de 8 diferentes testes fenotípicos, sendo obtidos 54 perfis. Os testes de difusão em disco simples e ágar screen com oxacilina foram utilizados como “padrão ouro” para os cálculos dos valores de sensibilidade, especificidade e predição por serem preconizados pelo CLSI veterinário. O teste de difusão em disco simples com cefoxitina foi o de melhor desempenho na predição da resistência a oxacilina. Na avaliação genotípica, não foi detectado qualquer isolado positivo para o gene *mecA*, já os genes *mecI* e *mecRI* foram detectados igualmente em 11,6% (29/250) dos *Staphylococcus* spp avaliados. Foram detectados os quatro tipos de cassete *mec* analisados (I, II, III e IV), sendo o tipo I o que teve mais ampla distribuição entre as regiões estudadas. Gene *blaZ* foi detectado em 5,2% (13/250) dos isolados, sendo que nestes, todo o sistema *blaZ-blaI- blaRI* foi detectado em 23,1% (3/13) dos isolados.

Palavras-chave: Mastite bovina, resistência antimicrobiana, *Staphylococcus* spp..

ABSTRACT

MENDONÇA, Elaine Conceição Liporage. **Fenogenotípica Characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from clinical or subclinical mastitis in dairy units of municipalities of Rio de Janeiro as a subsidy for implementation of control measures.** 89 p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The use of antibiotic in the control of intramammary infections and in the elimination of its possible sources in dairy farms is an important control measure. However, the inappropriate use of antibiotics can result in the appearance of resistant strains and compromise the efficiency of the treatment. Besides *Staphylococcus* spp. are among the main pathogens of bovine mastitis, they are often resistant to antibiotics, especially beta-lactamics, mainly by two distinct mechanisms: the production of extracellular enzyme beta-lactamase, encoded by the *blaZ* gene, and production of PBP2a or PBP2 ' a penicillin-binding protein with low affinity, encoded by the *mecA* gene. The expression of *mecA* gene is constitutive or induced by beta-lactamic antibiotics, such as oxacillin and ceftiofur. The *mecA* gene is inserted into the chromosome through a staphylococcal mobile genetic element, called staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). The present study evaluated the phenogenotypical resistance profile to beta-lactam antibiotics of 250 *Staphylococcus* spp. isolates, using oxacillin and ceftiofur as markers in order to produce data to the knowledge of resistance in dairy farms located in the South-Fluminense and the Metropolitan regions of the State of Rio de Janeiro to support the implementation of measures to control this disease. The assessment of resistance was made through 8 different phenotypic tests and yielded 54 profiles. Disk diffusion and agar screen with oxacillin were used as "gold standard" for the calculation of sensitivity, specificity and prediction once they are recommended by the CLSI veterinarian as standardized tests. Disk diffusion with ceftiofur achieved the best performance in the prediction of oxacillin resistance. Genotypic detection of *mecA* do not provided any positive isolate, otherwise *mecI* and *mecRI* genes were also detected in 11.6% (29/250) of the studied *Staphylococcus* spp. Four cassette *mec* types were detected (I, II, III and IV), being type I the most disseminated one. Gene *blaZ* was detected in 5.2% (13/250) isolates. From these 13 *blaZ* positive isolates, the whole system comprising *blaRI-blaI-blaZ* was detected in 23.1% (3/13) isolates.

KEY WORD: Bovine mastitis, antibiotic resistance, *Staphylococcus* spp..

LISTA DE ABREVIACÕES

APGF = Água–Pepto–Glico–Fosfatada
BHI = Infuso Cérebro Coração
CCS = Contagem de Células Somáticas
ccr: “Cassete Chromosome Recombinases”
CIM = Concentração Inibitória Mínima
CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
CMT = “California Mastitis Test”
DNA = ácido desoxiribonucléico
ECN: Estafilococos Coagulase Negativos
ECP: Estafilococos Coagulase Positivos
h = horas
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
IS431: ilha de patogenicidade 431
KOH = hidróxido de potássio
MH = “Müeller-Hinton”
mL = mililitros
mm = milímetros
mM = milimolar
MVF: Agar Manitol Vermelho de Fenol
MRSA = “Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*” - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
NaCl = cloreto de sódio
NCCLS: “National Committee for Clinical Laboratory Standards”
nm=nanômetro
ORSA= *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina
pb = pares de base
PBP = “Penicillin Binding Protein” - Proteína Ligadora de Penicilina
pH = potencial hidrogeniônico
PCR = “Polymerase Chain Reaction” - reação em cadeia de polimerase
rpm = rotação por minuto
SCC*mec*: cassete cromossômico de *mec* estafilocócico
SIG: Grupo de *Staphylococcus intermedius*
U = unidades
UI= unidade internacional
V = volts
VP = “Voges Proskauer”
µg = micrograma
µL= microlitro
°C = graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Esquema do funcionamento do operon <i>blaZ</i> que codifica a produção de β -lactamase, uma enzima que inativa a penicilina.	11
Figura 2. Complexo do gene <i>mec</i> .	12
Figura 3. Estruturas dos cassetes estafilocócicos <i>mec</i> tipos I, II, III, IV (subtipos IVa, IVb e IVc) e V.	13
Figura 4. Gráfico apresentando a prevalência de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos isolados das amostras de leite mastítico bovino.	26
Figura 5. Gráfico apresentando a distribuição percentual das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo isolados das amostras de leite mastítico bovino.	27
Figura 6. Genes <i>S. aureus</i> (930 pb) e <i>Staphy</i> (756 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bovino em gel de agarose (1,5%).	27
Figura 7. Gene <i>nuc 3 e 4</i> de <i>S. intermedius</i> (431 pb) em gel de agarose (1,5%).	27
Figura 8. Gene <i>pta</i> (320 pb) de ECP em gel de agarose (1,5%).	28
Figura 9. Método de difusão em disco. A linha demonstra o halo de sensibilidade ao disco em milímetros, os demais isolados são resistentes.	30
Figura 10. Percentual de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina.	31
Figura 11. Percentual dos perfis que se destacaram em cada espécie de <i>Staphylococcus</i> .	33
Figura 12. Teste de Ágar “screen”.	35
Figura 13. Teste de Difusão em disco modificada.	35
Figura 14. Teste de microdiluição em caldo.	36
Figura 15. Teste de microdiluição em ágar.	36
Figura 16. Genes <i>Staphy</i> (756 pb) e <i>mecA</i> (513 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bovino em gel de agarose (1,5%).	38
Figura 17. Gene <i>mecRI</i> (234pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bovino em gel de agarose (1,5%).	38
Figura 18. Gel de produto de PCR do multiplex dos genes de tipos de cassete de <i>Staphylococcus</i> spp. I, II, IV e III são os tipos de cassete.	39
Figura 19. Percentagem dos tipos de cassete encontrados nas espécies de <i>Staphylococci</i> na região de Rio Claro.	41
Figura 20. Percentagem dos tipos de cassete encontrados nas espécies de <i>Staphylococci</i> na região de Piraiá.	41
Figura 21. Percentagem dos tipos de cassete encontrados nas espécies de <i>Staphylococci</i> na região de Paracambi.	42
Figura 22. Percentagem dos tipos de cassete encontrados nas espécies de <i>Staphylococci</i> na região de Seropédica.	42
Figura 23. Teste de produção de betalactamase.	43

Figura 24.	Gene <i>blaZ</i> (861 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bovino em gel de agarose (1,5%).	43
Figura 25.	Gene <i>blaI</i> (331 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bovino em gel de agarose (1,5%).	43
Figura 26.	Gene <i>blaRI</i> (1566 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bovino em gel de agarose (1,5%).	44

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1. Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos.	19
Quadro 2. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.	20
Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos.	23
Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes do sistema <i>bla</i> de <i>Staphylococcus</i> spp.	23
Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes do sistema <i>mec</i> de <i>Staphylococcus</i> spp.	24
Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de tipos de cassette de <i>Staphylococcus</i> spp.	24

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Relação das propriedades com suas respectivas cidades, números de amostra e vacas.	17
Tabela 2. Critério representativo adotado para análise estatística dos testes fenotípicos de resistência à oxacilina.	25
Tabela 3. Percentagem da distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas nas quatro regiões estudadas.	28
Tabela 4. Percentuais de resistência encontrados para os antibióticos testados.	30
Tabela 5. Distribuição dos antibiotipos das diferentes espécies avaliadas de acordo com as regiões envolvidas neste estudo.	34
Tabela 6. Percentagem de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para os testes fenotípicos realizados.	37
Tabela 7. Percentagem dos tipos de cassete detectados nas espécies de <i>Staphylococcus</i> e nas regiões estudadas.	40

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Mastite	3
2.2. Aspectos econômicos e epidemiológicos da mastite bovina	4
2.3. Gênero <i>Staphylococcus</i> e sua importância na etiologia das mastites.	6
2.4. Resistência antimicrobiana em <i>Staphylococcus</i> spp.	7
2.4.1. Fluoroquinolonas	8
2.4.2. Aminoglicosídeos	8
2.4.3. Tetraciclina	8
2.4.4. Betalactâmicos	8
2.4.4.1. Penicilinas	9
2.4.4.2. Cefalosporinas	14
2.5. Importância do Monitoramento da Resistência Antimicrobiana em Animais de Produção.	14
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Origem das amostras de leite	17
4.2. Isolamento Bacteriano	17
4.2.1. Coloração de Gram, Prova do Hidróxido de Potássio (KOH) a 3% e Prova da Catalase	18
4.2.2. Prova da coagulase	18
4.2.3. Resistência à bacitracina	18
4.2.4. Prova de Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução de nitrato	19
4.3. Testes de suscetibilidade antimicrobiana	19
4.3.1. Difusão em disco simples	19
4.3.1.1. Discos de antimicrobianos	20
4.3.2. Teste de suscetibilidade aos betalactâmicos	20
4.3.2.1. Difusão em disco modificada	20
4.3.2.2. Ágar “screen”	20
4.3.2.3. Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima)	20
4.3.2.4. Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)	21
4.4. Produção de betalactamases	21
4.5. Testes de suscetibilidade à cefoxitina	21
4.5.1. Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima)	21

4.5.2. Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima)	22
4.6. Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes de resistência	22
4.6.1. Extração do DNA bacteriano	22
4.6.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR	23
4.6.2.1. Caracterização genotípica das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	23
4.6.2.2. Genes relacionados à produção de β -lactamases de <i>Staphylococcus</i> spp.	23
4.6.2.3. Genes de resistência à oxacilina de <i>Staphylococcus</i> spp.	24
4.6.2.4. Genes do cassette cromossomal estafilocócico (SCC <i>mec</i>) identificados em <i>Staphylococcus</i> spp.	24
4.7. Análise Estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp	26
5.2. Perfil de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp.	30
5.2.1. Perfil de Antibiotipos dos <i>Staphylococcus</i> spp.	32
5.2.2. Resistência aos betalactâmicos oxacilina e cefoxitina	35
5.2.2.1. Testes fenotípicos de resistência à oxacilina e cefoxitina	35
5.2.2.2. Detecção do sistema <i>mec</i> em <i>Staphylococcus</i> spp.	37
5.2.2.3. Detecção Genotípica e Fenotípica da Produção de betalactamases	43
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	
I	64
II	66
III	69
IV	71

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por bactérias, dentre as quais o gênero *Staphylococcus* ocupa um papel importante na sua etiologia, sendo freqüentemente isolado nas infecções clínicas e subclínicas. Apesar de inúmeras pesquisas voltadas para o controle desta enfermidade, a mastite continua sendo o maior problema da indústria leiteira, causando severas perdas econômicas decorrentes da redução da produção láctea, perda da qualidade do leite e pode ser considerada como sério problema para saúde pública.

O controle da mastite tem como chave a prevenção, já que a erradicação desta enfermidade é impossível. O manejo adequado no momento da ordenha (higiene, procedimentos e utensílios) pode diminuir o número de animais acometidos por casos de mastite clínica e subclínica, reduzir a taxa de novas infecções, diminuir a CCS (contagem de células somáticas) do leite dos animais de forma considerável. Além disso, melhorar a qualidade do leite produzido, o que trará benefícios diretos aos produtores de leite, indústrias e consumidores.

Além das medidas higiênicas indicadas durante a ordenha para reduzir os índices de infecção da glândula mamária, a utilização de antibióticos é uma medida importante no controle das infecções intramamárias, além de eliminar prováveis fontes de infecção nas fazendas leiteira. No entanto, o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode gerar o aparecimento de cepas resistentes e comprometer a eficiência do tratamento.

Isolados de *Staphylococcus* spp. são freqüentemente resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo à oxacilina, que representa um marcador para avaliação da resistência cruzada com todos os antimicrobianos desta classe. A resistência estafilocócica aos antibióticos beta-lactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos distintos, como a produção da enzima beta-lactamase codificada na maioria das vezes por plasmídeos e a produção de PBP2a.

O mecanismo de resistência à penicilina associada à produção da beta-lactamase, uma enzima extracelular, é decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico após a exposição do microrganismo ao antibiótico. A síntese de beta-lactamase em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene plasmidial *blaZ* ou cromossomal e pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaRI*. O primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima BlaRI, presente na membrana celular, que por sua vez cliva a enzima BlaI, ativando o promotor de *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de beta-lactamase.

Outro mecanismo de resistência é a alteração do sítio de ação do antibiótico pela produção de uma proteína ligante de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), de baixa afinidade, que está ausente em isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis a meticilina e é codificada pelo gene *mecA*. Pesquisadores identificaram o elemento regulador *mecRI-mecI*, o qual é um divergon do gene *mecA* e está localizado na porção "upstream" deste gene. Os genes *mecI* e *mecRI*, tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA*. A regulação da expressão de resistência ocorre por ligação de um betalactâmico com a proteína MecRI (produto de *mecRI* = anti-repressor de *mecA*), que ativada, cliva a MecI (produto do gene repressor *mecI*) e permite a transcrição de *mecA* com produção de PBP2a. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibiótico betalactâmico, como a oxacilina e meticilina.

O gene *mecA* está inserido no cromossomo estafilocócico através de um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*-

“staphylococcal cassette chromosome”), que pode ser transferido via plasmídeos, transposons, e se integrarem a ilhas de patogenicidade do genoma bacteriano. O SCC*mec* é composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecRI*, e o complexo *ccr* (*Cassete Chromossome Recombinases*), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases. Com base na classe do complexo dos genes *mec* e *ccr* presentes e em suas combinações, os cassetes SCC*mec* são classificados em sete tipos, I, II, III, IV, V, VI e VII.

Diversos estudos que abordaram a suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência. Logo, o conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos efetivos para o controle da doença e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessário.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de conhecer a realidade de algumas propriedades leiteiras das regiões Sul-Fluminense e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, através de visitas que permitiram observar o manejo e as condições sanitárias destas, bem como coletar amostras de leite mastítico buscando isolamento de espécies do gênero *Staphylococcus* e avaliar o perfil fenogenotípico de resistência desses isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite

O termo mastite deriva das palavras gregas *mastos*, que significa “peitos” e *itis* que significa “inflamação”. Logo, pode-se dizer que a mastite caracteriza-se por uma inflamação da glândula mamária cuja etiologia pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo esta última a mais freqüente (FONSECA; SANTOS, 2000).

A mastite é conhecida desde que o homem domesticou a vaca e apesar de todo o avanço científico continua sendo a enfermidade mais comum e dispendiosa no mundo inteiro (WATTS, 1988).

A infecção da glândula mamária bovina continua sendo o maior problema da indústria leiteira, apesar das inúmeras pesquisas voltadas para o controle desta enfermidade, causando severas perdas econômicas decorrentes da redução da produção láctea (COSTA et al. 2000), perda da qualidade do leite (REIS et al. 2003) e pode ser considerada como sério problema para saúde pública (TYLER et al. 1992, CARDOSO et al. 1999). Segundo Santos et al. (2004) a colonização da glândula mamária bovina por bactérias patogênicas resulta em eventos que conduzem a alterações na composição do leite. Inicialmente ocorrem elevados níveis de bactérias patogênicas, seguido pelo aumento marcante no número de células somáticas.

A enfermidade pode ser classificada como:

- Clínica, onde se observa a presença dos sinais evidentes de inflamação como edema, rubor, aumento de temperatura, endurecimento, dor e pus, além de alteração das características do leite como a presença de grumos (BRADLEY et al., 2002).

- Subclínica, ao contrário da forma clínica, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere (PERSSON WALLER et al., 2003). Esta caracteriza-se por alterações na composição do leite, tais como aumento na contagem de células somáticas (CCS), dos teores de cloro e sódio, e dos teores de proteínas séricas; além da diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (GIANOLA et al., 2004); fazendo com que haja menor rendimento na produção de seus derivados, além de diminuir o tempo de prateleira do produto (BRADLEY et al., 2002). Estudos revelaram que a redução na produção do leite é decorrente as alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade do alvéolo secretor durante a infecção (FONSECA; SANTOS, 2000; COSTA et al., 2000).

A mastite pode ser de duas origens:

- Ambiental, neste caso a maioria das novas infecções ocorre durante o período entre as ordenhas, embora também haja ocorrência de novos casos durante a ordenha, especialmente em situações nas quais há problemas de funcionamento do sistema de ordenha. A enfermidade está associada à patógenos ambientais oportunistas que estão presentes no habitat normal dos animais, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas, com destaque para a espécie *Escherichia coli*. Além disso, dada a grande disseminação destas bactérias ambientais na fazenda, todas as categorias animais estão sob risco: vacas em lactação, vacas secas e novilhas (BEAUDEAU et al., 2002).

- Contagiosa, ao contrário da mastite ambiental, este caso de mastite caracteriza-se por baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônicos e apresentam alta contagem de células somáticas (CCS). Esse tipo de mastite é causado por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos. Desta forma, o principal momento de transmissão ocorre durante

a ordenha (SVILAND & WAAGE, 2002; SOMMERHÄUSER et al., 2003). Os agentes mais envolvidos são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. (BRITO & BRITO, 2000). Sendo o primeiro, o patógeno contagioso mais frequentemente isolado do leite mastítico (COELHO et al., 2009; PINHEIRO et al. 2004).

Segundo Pedersen et al. (2003) quando um agente patogênico invade a glândula mamária, o organismo do animal reage, mandando para o local células de defesa, principalmente leucócitos, a maioria neutrófilos polimorfonucleares, para tentar reverter o processo infeccioso. Essas células de defesa somadas as células de descamação do epitélio secretor são chamadas células somáticas.

A mastite faz com que as células epiteliais do tecido secretor, os alvéolos, sejam substituídas por tecido conjuntivo, ocasionando queda na produção de leite, pois para células somáticas alcançarem o interior dos alvéolos e combater as bactérias, passam por entre duas células secretoras de leite e acabam destruindo estas células (SOMMERHAUSER et al., 2003). O aumento na CCS é a principal característica utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica. Dessa forma, existem vários testes que avaliam o teor de células somáticas do leite, e entre esses testes destaca-se o CMT (Califórnia Mastitis Test) (RUPP et al., 2000).

2.2. Aspectos econômicos e epidemiológicos da mastite bovina

Entre as enfermidades que acometem os bovinos leiteiros, a mastite bovina é a que causa os maiores prejuízos à cadeia produtiva (RIBEIRO et al., 2003). Acredita-se que 15 a 20% das vacas leiteiras estejam infectadas por alguma forma de mastite. As perdas econômicas estão relacionadas principalmente a redução da produção leiteira, gastos com o tratamento, descarte e morte prematura dos animais, custos com drogas e com serviços veterinários e prejuízos na indústria leiteira em consequência da perda do valor biológico do leite que altera a qualidade dos subprodutos industrializados (GODDEN et al., 2002; RADOSTITS et al., 2002).

No caso das infecções subclínicas, os prejuízos são maiores, levando-se em consideração a sua frequência nos rebanhos e a longa persistência inaparente de infecções. A contínua ação irritante de microorganismos sobre a mucosa, durante uma ou várias lactações, provoca perda progressiva do epitélio secretor, reduzindo a produção láctea (SOMMERHAUSER et al., 2003).

Busato et al. (2000) afirma que o prejuízo acarretado pela mastite constitui cerca de 25% de todas as doenças de importância econômica, que a mastite clínica representa 18% do prejuízo total por causar morte ou descarte prematuro e que a redução na produção total é representada principalmente pela mastite subclínica (82%). Além disso, compromete a qualidade do leite por determinar sérias alterações na composição do leite, devido à diminuição na gordura, lactose, caseína, cálcio e fósforo.

Estima-se que, anualmente, as perdas mundiais devido à mastite aproximam-se de 35 bilhões de dólares. Nos Estados Unidos, o custo anual da mastite tem sido estimado em 1,5 a 2,0 bilhões de dólares, enquanto que as perdas de produção de leite, devido à mastite subclínica, e custos de reposição associados à alta contagem de células somáticas (CCS) foram estimados em 960 milhões de dólares (Silva, 2008). No Brasil o produtor arca com altos custos para tratar as vacas com mastite. Os prejuízos são calculados com perdas de 17% do volume total de produção de leite em decorrência da doença. Em 2008, por exemplo, quando a produção no país foi de 27 bilhões de litros, segundo a Embrapa, a perda seria de R\$ 2,3 bilhões para o Brasil (EMBRAPA, 2008).

A enfermidade geralmente é o resultado final da interação de vários fatores, que podem ser individuais ou ambientais. Nos fatores individuais, estão incluídos os mecanismos de defesa do animal e a anatomia da glândula mamária. Os ambientais estão relacionados com o tipo de clima da região, limpeza das instalações, alimentação e à capacidade do microrganismo se instalar no organismo do animal (WHIST et al., 2006).

A redução quantitativa e qualitativa do leite provocada pela mastite subclínica no quarto infectado, na vaca ou no rebanho, varia muito, dependendo de fatores ligados à natureza do(s) agente(s) etiológico(s), da resposta imunitária do animal, da evolução e duração da infecção e da propagação da mastite no rebanho. Estas condições ainda são influenciadas pelos cuidados e medidas sanitárias adotadas (BAREILLE et al., 2003).

A demanda por uma maior qualidade dos produtos por parte das indústrias lácteas vem promovendo o desenvolvimento de linhas de investigação orientadas para o desenvolvimento de estratégias de manejo apropriada para controlar as infecções mamárias (BUZZOLA et al., 2001; SORDELLI et al., 2000).

A prevenção é a chave para o controle da mastite, uma vez que sua erradicação não é possível. Um adequado manejo de ordenha (higiene, procedimentos e equipamentos correios) pode diminuir o número de animais acometidos por mastite clínica e subclínica, reduzir a taxa de novas infecções, melhorar a CCS (contagem de células somáticas) do rebanho e a qualidade do leite produzido, o que trará benefícios diretos aos produtores de leite, indústrias e consumidores (RUPP et al., 2000; SANTOS et al., 2003).

Para que se realize um programa de prevenção e controle da mastite, Radotits et al. (2002), recomenda: imersão de tetos pré e pós-ordenha de todos os animais ordenhados com desinfetante germicida que não agrida a pele dos tetos; descarte de animais que apresentam mastite crônica ou mais de três casos clínicos na mesma lactação; tratamento adequado e imediato de todos os casos clínicos; adoção de terapia da “vaca seca” para todos os animais do rebanho; correta manutenção do equipamento de ordenha.

Rupp et al., (2000) afirma que o primeiro passo do programa é verificar o "*status*" de mastite do rebanho antes de qualquer alteração do manejo e que um dos pontos mais importantes no controle da mastite é conscientização dos produtores das perdas econômicas e educação sanitária dos tratadores e ordenhadores, sendo a higiene destes um ponto crucial na profilaxia da enfermidade. As mãos dos ordenhadores são o grande agente transmissor de bactérias para o úbere, o leite e todo o material utilizado (DINGWELL et al., 2004).

Segundo Busato et al. (2000) na prática é muito mais fácil prevenir a mastite contagiosa que a ambiental, e uma particularidade da mastite ambiental é o fato de que geralmente manifesta-se em rebanhos bem manejados e com baixa contagem de células somáticas. Lembra ainda que um rígido manejo e higiene na ordenha sem adoção de medidas de controle ambiental (barro, lama, esterco, cama orgânica, etc), pode resultar na queda significativa na CCS, seguida de surtos de mastite ambiental clínica aguda.

Além das medidas higiênicas indicadas durante a ordenha para reduzir os índices de infecção da glândula mamária, a utilização de antibióticos é uma medida importante no controle das infecções intramamárias, além de eliminar prováveis fontes de infecção nas fazendas leiteiras (ERSKINE et al., 2000). No entanto, o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode gerar o aparecimento de cepas resistentes e comprometer a eficiência do tratamento (BARBERIO et al. 2002).

De acordo com Brito et al. (2001), diversos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana realizados no Brasil com patógenos envolvidos na mastite bovina demonstram um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para *S. aureus*.

2.3. Gênero *Staphylococcus* e sua importância na etiologia das mastites.

O gênero *Staphylococcus* está amplamente distribuído na natureza e faz parte da microbiota normal da mucosa e da pele de mamíferos e aves. Atualmente abrange mais de 50 espécies e 24 sub-espécies registradas no banco de dados *Taxonomy Browser*, sendo 20 espécies associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, comumente isoladas de amostras biológicas em seres humanos e animais. O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae (LUDWIG, 2009), a qual é constituída também pelos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus* (NCBI, 2011).

Os estafilococos são classificados como cocos Gram-positivos organizados em forma de cachos de uva, devido à sua divisão de planos perpendiculares onde as células permanece ligadas um à outra depois de cada divisão sucessiva. Também podem se agrupar aos pares, em tétrades ou em massas irregulares. São imóveis, não esporulados e produtores da enzima catalase. Os membros da família Staphylococcaceae são diferenciados da família Streptococcaceae pela positividade à prova da catalase, que detecta a presença de citocromo oxidase, exceto para *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, que são espécies estritamente anaeróbias. (KONEMAN et al., 2008).

Apresentam colônias grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro, opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie. São mesófilos, apresentando temperatura ótima de 35°C a 37°C e são tolerantes a concentrações de 10% de cloreto de sódio (FRAZIER; WESHOF, 2000). Apresentam capacidade de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento compreendido entre 6,0 e 7,0 (KONEMAN et al., 2008).

Este gênero bacteriano foi observado pela primeira vez em 1878 por Robert Koch (MORSE, 1984) e em 1881, Alexander Ogston, observou a presença desta bactéria em abscessos agudos e crônicos, introduzindo a palavra “*Staphylococcus*” para designar os microrganismos agrupados encontrados no pus. No entanto, foi Anton Julius Friedrich Rosenbach que, em 1884, obteve cultura pura de estafilococos, adotando, portanto o nome do gênero de *Staphylococcus* proposto inicialmente por Ogston. Esta foi à primeira descrição taxonômica, dividindo o gênero em duas espécies com base na presença de pigmento nas colônias: *Staphylococcus pyogenes aureus* (colônias amarelas) e *Staphylococcus pyogenes albus* (colônias brancas) (TOPLEY, 1976).

As espécies de *Staphylococcus* são separadas em dois grupos distintos, com base na sua capacidade de produzir a enzima coagulase, sendo o gênero dividido em dois grupos:

- *Staphylococcus* coagulase-positivos, este grupo inclui as principais espécies patogênicas de *Staphylococcus*, destacando-se *Staphylococcus aureus*, que é capaz de se instalar e causar enfermidade em uma grande variedade de espécies animais (SAKAI, 2004). Na medicina veterinária, outros estafilococos coagulase-positivos são descritos como patógenos importantes, como o *Staphylococcus intermedius*, cuja reclassificação foi proposto por Devriese et al. (2005), criando o grupo de *S. intermedius* (SIG), incluindo *S. intermedius* e as espécies *S. pseudintermedius* e *S. delphini*. Outros significativos coagulase-positivos em animais são *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. aureus* subsp. *anaerobius* (SOUZA et al. 2012)

A proteína coagulase tem a capacidade de transformar o fibrinogênio em fibrina por um mecanismo diferente dos naturais de coagulação (PALMA et al., 1999). Esta proteína é codificada pelo gene *coa* que possui uma conservada e uma região polimórfica repetida, as quais podem ser usadas para medir a afinidade entre os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (REINOSO et al., 2006).

- E o grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECNs), o qual inclui a maioria das espécies de *Staphylococcus*, consideradas tradicionalmente como os menores agentes

infecciosos e agora se tornaram mais comuns (HUXLEY et al., 2002). As espécies que tem sido mais isoladas de espécimes clínicos de animais são *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *chromogenes aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *sciuri aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis* e *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* (LILENBAUM et al, 2000; PEREIRA et al, 2009; PYÖRÄLA et al, 2009; SOARES et al, 2008).

Os métodos convencionais de identificação dos ECNs foram originalmente desenvolvidos para cepas humanas e seu mau desempenho para identificação de cepas de origem animal parece estar relacionada a um número limitado de cepas de veterinária em bancos de dados (Bes et al., 2000). Além disso, o método de referência desenvolvido pela Bannerman (2003) é caro e muito demorado para ser usado em um laboratório clínico. Por isso, vários alvos moleculares têm sido explorados para a identificação molecular de espécies de *Staphylococcus*, incluindo o gene *groEl* (Goh et al., 1996), que será estudado em projetos em andamento do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em geral, os *Staphylococcus* spp. apresentam uma relação de comensalismo com o hospedeiro, estando presente em pele e algumas mucosas de forma equilibrada, sem causar danos. No entanto adquirem potencial patogênico se tiverem acesso aos tecidos pelo rompimento da barreira cutânea, através de microfissuras no teto da vaca, causadas por processos traumáticos, por isso, são ditos microrganismos essencialmente oportunistas, uma vez que prevalecem de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções (CUNHA et al., 2002).

Após a entrada na glândula mamária e a formação de microabscessos, estes poderão romper-se num momento de maior fragilidade do sistema imunológico do animal, liberando o microrganismo no interior da glândula mamária e caracterizando as infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas e com baixas taxas de cura que são próprias do agente (SABOUR et al., 2004). *Staphylococcus* spp. apresentam elevado risco potencial de bacteremia em animais imunocomprometidos (HUDOME; FISHER, 2001; CUNHA et al., 2002).

Burton e Erskine (2003) avaliaram diversos trabalhos sobre mecanismos de controle das mastite e concluíram que as células de defesa (neutrófilos) e os anticorpos são as principais barreiras de defesa do úbere contra infecções bacterianas. Esta resposta varia em intensidade dentre as vacas, havendo aquelas reagem à infecção, podendo se curar, enquanto outras não ou têm uma resposta débil, apresentando casos prolongados, recidivas e casos mais graves. Quando estes sistemas falham ou são insuficientes surgem as mastites clínicas.

2.4. Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp.

Além de sua importância como patógeno em diversos quadros de infecções os estafilococos apresentam elevada resistência aos antimicrobianos, desenvolvida, principalmente devido ao uso inadequado destes fármacos. O que propicia o aparecimento de cepas multi-resistentes, e o conseqüente comprometimento da eficiência do tratamento das enfermidades causadas por esses microrganismos (BARBERIO et al., 2002).

2.4.1. Fluoroquinolonas

As fluorquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacin e norfloxacina) representam uma classe de agentes antimicrobianos amplamente utilizados em medicina humana e veterinária, no tratamento de uma variedade de infecções bacterianas. Estes fármacos possuem amplo espectro de atividade, toxicidade mínima sobre eucariotos e fácil penetração na maioria das células bacterianas (BLONDEAU et al., 2003).

O mecanismo de ação das quinolonas ocorre por inibição da atividade da enzima alvo, DNA girase, uma topoisomerase IV, responsável primariamente pela introdução de um superenovelamento negativo do DNA, na presença de ATP. Estas alterações no estado topológico do DNA desempenham funções nos processos de replicação, transcrição, recombinação e reparação celular (TAKENOUCI et al. 1995, ZHANEL et al. 1995).

A resistência a este fármaco desenvolve-se como resultado de mutações espontâneas na enzima topoisomerase IV ou DNA girase, ou por indução de bomba de efluxo de múltiplos antimicrobianos, denominados NorA, o qual promove o efluxo ativo de diversos compostos, inclusive fluoroquinolonas (LOWY, 2003).

2.4.2. Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos como gentamicina, tobramicina, ampicacina, estreptomicina são comumente usados para o tratamento de infecções por organismos Gram positivos e Gram negativos. Na mastite bovina, a gentamicina apresenta um papel destacado no tratamento desta infecção. Estes agentes se ligam aos ribossomos, interferindo na síntese protéica. A resistência aos aminoglicosídeos está associada a modificações nos grupamentos amino ou nos grupos hidroxila e com isso perdem a habilidade de se ligar ao ribossomo, não inibindo a síntese protéica (SHAW et al., 1993). Além das enzimas modificadoras de aminoglicosídeo, sistema de efluxo e mutações no rRNA têm sido descritos como marcadores responsáveis pela resistência (YOU et al., 2000).

2.4.3. Tetraciclina

As tetraciclinas são bacteriostáticos de amplo espectro que atuam por inibição da síntese de proteínas, bloqueando a união de tRNA ao complexo ribossômico de mRNA. A união reversível se produz na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis. Não inibem a síntese da parede celular bacteriana.

Os determinantes de resistência mais comuns aos estafilococos são codificados pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* que são proteínas que protegem os sítios de ligação das tetraciclinas aos ribossomos bacterianos protegendo-os contra a ação antimicrobiana deste fármaco. De forma menos freqüente, porém usual, um outro mecanismo de resistência às tetraciclinas pode ser determinado pela expressão de proteínas codificadas pelos genes *tet(K)* ou *tet(L)* que promovem o bombeamento do antibiótico para fora das células (CHOPRA; ROBERTS, 2001; CULEBRAS et al., 2002; ZENG et al., 2006). O gene de resistência *tet(M)* é freqüentemente segregado por transposons conjugativos da família Tn916, que também estão envolvidos na segregação de genes do tipo *erm* que promovem a resistência à eritromicina (CHOPRA & ROBERTS, 2001; CULEBRAS et al., 2002; ZENG et al., 2006).

2.4.4 Betalactâmicos

Isolados de *Staphylococcus* spp. são freqüentemente resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo à oxacilina, que representa um marcador para avaliação da resistência

cruzada com todos os antimicrobianos desta classe. Limitando assim, cada vez mais a escolha do antibiótico para o tratamento das infecções (COELHO et al., 2009).

Os beta-lactâmicos representam a classe mais variada e amplamente utilizada de antimicrobianos. Pertencem a este grupo todos os antibióticos que apresentam o anel beta-lactâmico em sua estrutura, sendo a penicilina, a principal família que se divide em, especialmente, três classificações: penicilinas naturais (ex. penicilinas G e V), aminopenicilinas (ex. ampicilina e amoxicilina) e penicilinas antiestafilocócicas, como a oxacilina e a meticilina, sendo esta última, ainda não utilizada no Brasil (BLACK, 2002; LOWY, 2003). Além das penicilinas, também pertencem a este grupo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.

2.4.1.1 Penicilinas

No início da década de 40, quando a penicilina começou a ser comercializada nos Estados Unidos, todas as bactérias do gênero *Staphylococcus* eram susceptíveis a esse medicamento, porém em poucos anos foram isoladas cepas resistentes (ITO et al., 2003). Para combater essas novas infecções, foram utilizados outros antibióticos lançados à época, como eritromicina, tetraciclina e aminoglicosídeos, o que resultou no surgimento de cepas multi-resistentes já na década de 50 (ITO et al., 2003).

Em 1960 foi lançado um novo antibiótico, uma penicilina sintética que possuía atividade bactericida inclusive contra as bactérias multi-resistentes, a meticilina (WASHERA et al., 2006). A comunidade médica e científica ficou então convencida que tinha armas suficientes para combater qualquer tipo de infecção que pudesse surgir (LOWY et al., 2003). Tal consideração, entretanto foi revista quando, somente um ano após o lançamento da meticilina, Jevons *et al.* (1961) descreveu o isolamento de uma cepa resistente ao novo antibiótico.

Embora a maioria dos isolados de estafilococos clinicamente significativos apresentem resistência a penicilina, esses fármacos ainda são amplamente utilizados no tratamento das infecções estafilocócicas em animais, pois oferecem vantagens devido ao baixo custo, sendo, portanto recomendados para o tratamento de várias enfermidades, na tentativa de que os isolados sejam sensíveis (GRAHAN, 2000).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos tem sido relatada em bactérias de origem animal, incluindo as espécies *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. provenientes de animais de produção e animais de companhia, que podem atuar como reservatórios dessa resistência para humanos. Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos incluem: redução do transporte até alvo celular (redução da afinidade de PBPs), alteração do sítio ativo, bombas de efluxo e inativação por β -lactamases (LI; NIKAIDO, 2004). Diversos tipos de enzimas β -lactamases tem sido identificadas em diferentes espécies bacterianas, dentre estas, os *Staphylococcus* spp. apresentam a capacidade de expressar β -lactamases que atuam como mecanismo de resistência para múltiplos antimicrobianos. Os genes que codificam para estas enzimas podem coexistir com outros determinantes para resistência antimicrobiana contidos em transposons, integrons e plasmídeos que contribuem para a disseminação intra e interespecífica (LI et al., 2007).

Antibióticos que possuem o anel beta-lactâmico atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana através da ligação com proteínas específicas associadas à síntese de peptidoglicano (“PBP” – Proteína Ligante de Penicilina), assim denominadas por se ligarem a estes antibióticos. As “PBPs” são proteínas de membrana que estão envolvidas na biossíntese da parede celular e que possuem função de transpeptidase (LOWY, 2003). Estas proteínas catalisam a reação de transpeptidação que faz a ligação cruzada dos peptidoglicanos da parede

celular. As quatro principais “PBPs” são PBP 1, 2, 3 e 4 e são produzidas tanto por isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis como resistentes (CHAMBERS, 1997). Promovem a formação das pontes transversas de pentaglicinas do peptidoglicano, através da ligação da D-alanina de uma cadeia peptídica com a L-lisina da cadeia subsequente. Os antimicrobianos β -lactâmicos ao inibirem estas “PBPs”, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular de forma correta, levando a formação de uma parede celular frágil que não suporta a diferença osmótica, levando a lise celular bacteriana (CHAMBERS, 1999; WEESE et al., 2005).

A resistência estafilocócica aos antibióticos beta-lactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos distintos: a produção da enzima beta-lactamase codificada na maioria das vezes por plasmídeos e a produção de PBP2a.

O mecanismo de resistência à penicilina associada à produção da beta-lactamase, uma enzima extracelular, é decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico após a exposição do microrganismo ao antibiótico (STAPLETON; TAYLOR, 2002; LOWY, 2003). A síntese de beta-lactamase em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene plasmidial *blaZ* ou cromossomal e pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaR1* (HACKBARTH; CHAMBERS, 1993; LOWY, 2003). O primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor. Quando não existe penicilina no meio, BlaI se liga ao promotor de *blaZ*, inibindo a transcrição do gene. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima BlaRI, presente na membrana celular, que por sua vez cliva a enzima BlaI, ativando o promotor de *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de beta-lactamase (GREGORY et al., 1997; LEWIS et al., 1999; CLARKE; DYKE, 2001). A ativação de *blaZ* inicia-se com a acilação irreversível concomitante à abertura do anel betalactâmico. A acilação é o primeiro evento na transdução do sinal (WILKE et al., 2005; GOLEMI-KOTRA et al., 2003). O antibiótico liga-se à parte extracelular (terminal carboxil) de BlaR1 e causa uma mudança conformacional que leva à ativação proteolítica intracelular de BlaRI. O segundo evento na transdução de sinal é uma discreta clivagem proteolítica do domínio intracitoplasmático de BlaRI. A autoclivagem é seguida pela propagação citoplasmática do sinal e posteriormente pela proteólise da proteína repressora. O repressor BlaI após clivado pela protease BlaRI libera *blaZ* do controle transcricional negativo, permitindo a transcrição de *blaZ* e síntese da beta-lactamase (FUDA et al., 2005) (Figura 1).

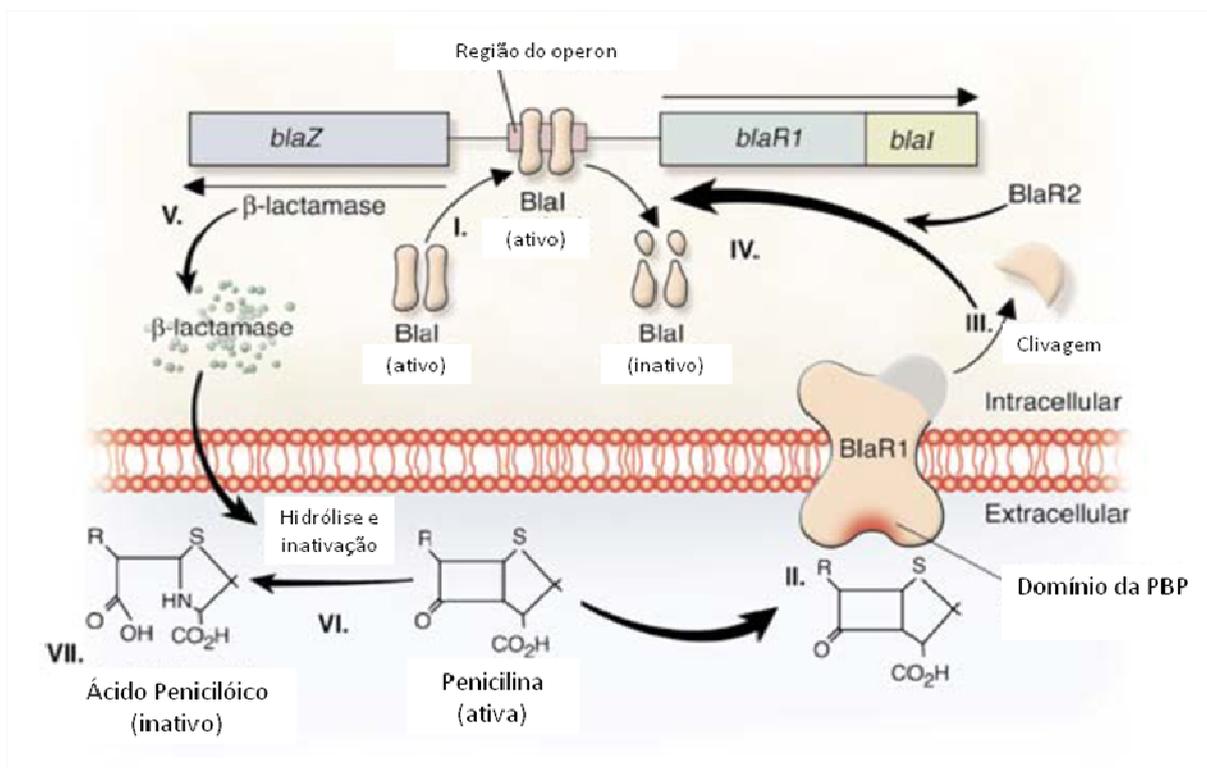


Figura 1. Esquema do funcionamento do operon *BlaZ* que codifica a produção de β-lactamase, uma enzima que inativa a penicilina.
 Fonte: Lowy *et al.* (2003), com adaptações.

A oxacilina foi a primeira penicilina semi-sintética resistente a beta-lactamase, porém o mecanismo de resistência anteriormente baseado na inativação da droga por ação enzimática, foi substituído ou acrescido por um segundo mecanismo baseado na alteração da enzima alvo, a PBP (LOWY, 2003).

Esse mecanismo de resistência está associado à alteração do sítio de ação do antibiótico pela produção de uma proteína ligante de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), de baixa afinidade, que está ausente em isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis a meticilina e é codificada pelo gene *mecA* (KATAYAMA *et al.*, 2001; KURODA *et al.*, 2001). Hiramatsu e colaboradores (2001) identificaram o elemento regulador *mecRI-mecI*, o qual é um divergon do gene *mecA* e está localizado na porção "upstream" deste gene. Os genes *mecI* e *mecRI*, tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA* (MCKINNEY *et al.*, 2001). A regulação da expressão de resistência ocorre por ligação de um betalactâmico com a proteína MecRI (produto de *mecRI* = anti-repressor de *mecA*), que ativada, cliva a MecI (produto do gene repressor *mecI*) e permite a transcrição de *mecA* com produção de PBP2a. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibiótico betalactâmico, como a oxacilina e meticilina (LOWY, 2003) (figura 2). Vale ressaltar que a estrutura de regulação do gene *mecA* é similar ao do gene *blaZ*, que produz a β-lactamase (Figura 1). Apesar da semelhança na cadeia de sinalização e do objetivo desses genes, o meio pelo qual eles conferem resistência à bactéria são muito diferentes.



Figura 2. Complexo do gene *mec*.

Fonte: Lowy *et al.* (2003), com adaptações.

A produção de PBP2a com baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, substitui as funções das PBPs de alta afinidade, permitindo que a célula se desenvolva em concentrações do antibiótico que em outras condições seriam letais. E é, sem dúvida, o principal mecanismo responsável pela resistência à oxacilina, embora outros mecanismos tenham sido descritos, como alteração de outras “PBPs” e a hiperprodução de beta-lactamases (PETINAKI *et al.*, 2001; SWENSON *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o CLSI padronizou o uso do disco de cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração, para detecção do gene *mecA* por ser um forte indutor de seu sistema regulatório. Estudos têm relatado maior eficácia em testes de difusão em disco com cefoxitina correlacionado com a presença do gene *mecA*, em relação ao uso da oxacilina (SWENSON *et al.*, 2005). Este fármaco induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica (DANCER, 2001).

O gene *mecA* regula a produção de uma proteína alvo modificada de baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos, denominada de PBP2a ou PBP2’ (MOON *et al.*, 2007). Este gene é inserido no cromossomo estafilocócico através de um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*-“staphylococcal cassette chromosome”), que pode ser transferido via plasmídeos, transposons, e se integram a ilhas de patogenicidade do genoma bacteriano (KATAYAMA, ITO; HIRAMATSU, 2000).

Há mais de uma década, a literatura relata a ocorrência de diferentes tipos de SCC*mec* em isolados estafilocócicos de origem humana (ITO *et al.*, 2001; DAUM *et al.*, 2002), mas a existência deste sistema cromossômico em isolados provenientes de animais tem sido relatada em trabalhos recentes (JANSEN *et al.*, 2009).

O SCC*mec* é composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecR1*, e o complexo *ccr* (*Cassete Chromossome Recombinases*), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases. Esses complexos genéticos possuem terminais invertidos que podem ser reconhecidos pelas recombinases tanto do complexo *ccr* quanto pelo gene *mec*. O restante do DNA presente no SCC*mec* é denominado região “J” (J significa sucata – *junkyard* em inglês), que contém vários genes ou pseudogenes que aparentemente não são utilizados pela célula bacteriana (ITO *et al.*, 2004). Em todos os tipos de SCC*mec*, a sequência do gene *mecA* é altamente conservada em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (WELLER, 2000; MA *et al.*, 2002).

Com base na classe do complexo dos genes *mec* e *ccr* presentes e em suas combinações, os cassetes SCC*mec* são classificados em sete tipos, I, II, III, IV, V, VI e VII (ITO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO; DE LENCASTRE, 2006). Os elementos SCC*mec* tipos I, II, III e VI estão mais associados a infecções causadas por *Staphylococcus* spp. de origem nosocomiais, enquanto que os tipos IV, V e VII são encontrados com maior frequência em *Staphylococcus* spp. de infecções comunitária (HISATA *et al.*, 2005; KLUYTMANS *et al.*, 2006; KONDO *et al.*, 2007; BOYLE-VAVRA *et al.*, 2008; DEURENBERG *et al.*, 2009).

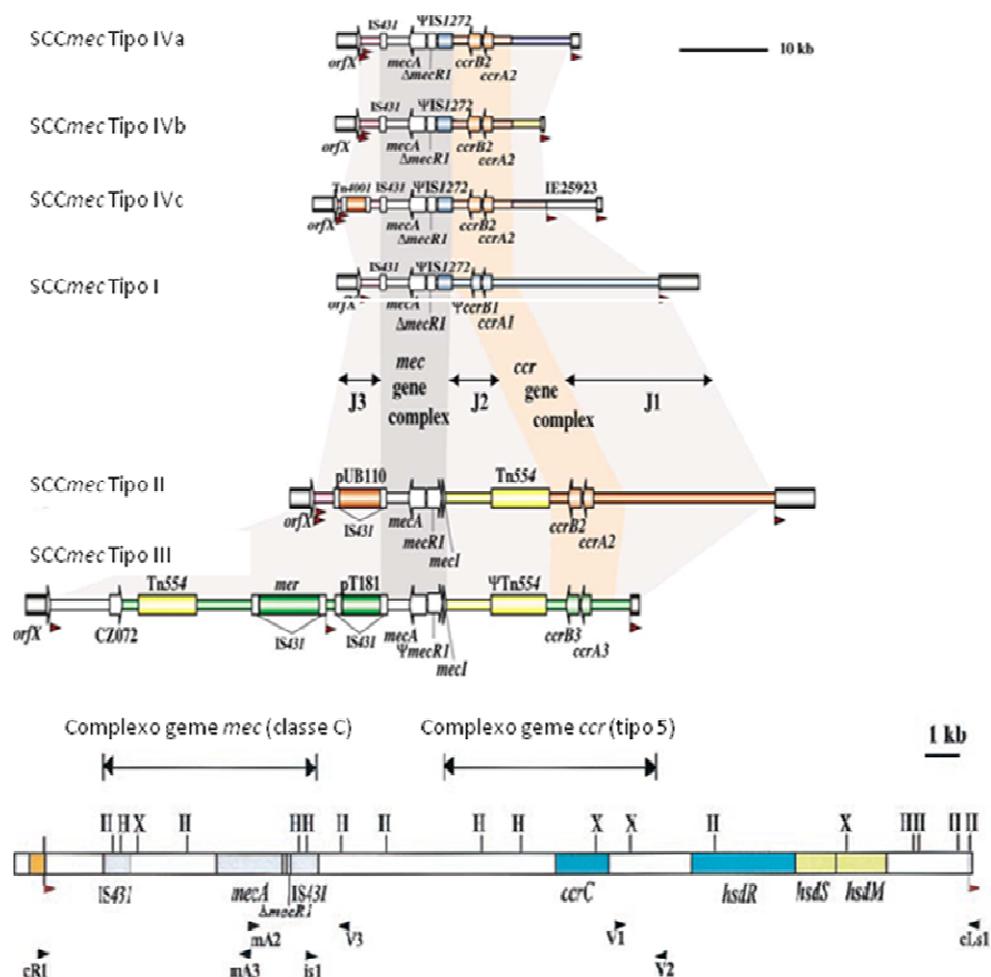


Figura 3. Estruturas dos cassetes estafilocócicos *mec* tipos I, II, III, IV (subtipos IVa, IVb e IVc) e V. (ITO et al., 2004), com adaptações.

Katayama e colaboradores (2001) relataram a existência de cinco classes diferentes de complexo *mec*. A classe A, que contém o complexo *mecRI* e *mecl* intacto. A classe B, que contém o gene *mecl* e o domínio citoplasmático do gene *mecRI* truncados por uma IS1272. A classe C que subdivide-se em, C1 que contém o domínio citoplasmático do gene *mecRI* e todo o gene *mecl* truncados pela IS431 e C2 que possui tanto o domínio citoplasmático quanto o transmembrana do gene *mecRI* e todo o gene *mecl* truncados pela IS43. Na classe D o gene *mecl* está deletado e o domínio transmembrana do *mecRI* está truncado pela IS431.

O cassete *mec* carrega outros elementos genéticos como *Tn554*, pUB110 e pT181, que codificam a resistência às outras classes de antimicrobianos causando multirresistência. A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes, tornando-se uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por este agente (ITO et al., 2001).

Vale ressaltar que os genes do complexo genético *blaZ* estão localizados num mesmo transposon, Tn552, que foi completamente sequenciado e que pode se encontrar inserido no cassete SCC*mec* (ROWLAND; DIKE, 1990).

Esta variedade de marcadores genéticos da resistência aos antibióticos β-lactâmicos influencia a expressão de fenótipos heterogêneos que dificultam a detecção da resistência antimicrobiana por técnicas laboratoriais tradicionais. Muitas pesquisas têm utilizado a

técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), para detecção de cepas de ORSA através do gene *mecA* (MURAKAMI et al., 1991; TOKUE et al., 1992).

2.4.1.2. Cefalosporinas

As cefalosporinas pertencem ao grupo dos antibióticos beta-lactâmicos, como as penicilinas. Em 1945 foram identificadas diversas substâncias com atividade antibacteriana produzidas pelo fungo *Cephalosporium acremonium*. Uma destas substâncias, a cefalosporina C, apresentava atividade sobre diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por ser resistente à ação da penicilinase, seu uso em infecções estafilocócicas foi sugerido, pois já naquela época a resistência deste microrganismo às penicilinas era um problema emergente (LEITER, 2000).

A ação destes antibióticos é a inibição da ligação final do peptidoglicano, impedindo a formação da parede celular bacteriana. Desta forma, a bactéria não é capaz de manter sua forma nem o equilíbrio osmótico com o meio externo. Como agem sobre a formação da parede bacteriana, as cefalosporinas são especialmente ativas em bactérias em fase de multiplicação (BOOTH; MCDONALD, 1992).

A estrutura das cefalosporinas é baseada no ácido aminocefalosporânico, enquanto que as penicilinas são baseadas no ácido penicilínico. Esta diferença estrutural, embora pequena, é suficiente para impedir a ação das penicilinas sobre as cefalosporinas. As diferenças em cadeias laterais “R” deram origem às diferentes cefalosporinas e causam variações no espectro de ação destes antibióticos (LEITER, 2000).

Segundo Spinosa et al. (2006) as cefalosporinas são classificadas por gerações de acordo com a atividade antimicrobiana. As cefalosporinas de primeira geração são caracterizadas por espectro de ação antimicrobiano mais estreito, atuando predominantemente sobre bactérias Gram-positivas; são ativas também contra estafilococos produtores de penicilinase. As cefalosporinas de segunda geração são menos ativas que as de primeira geração contra bactérias Gram-positivas, porém tem maior atividade contra bactérias entéricas Gram-negativas. As cefalosporinas de terceira geração possuem o maior espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, e possuem certa estabilidade na presença de beta-lactamases, porém são menos ativas em bactérias Gram-positivas. Já as cefalosporinas de 4ª geração reúnem as vantagens da 1ª e 3ª geração e apresentam boa atividade tanto sobre microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos (ADAMS, 2003).

2.4. Importância do Monitoramento da Resistência Antimicrobiana em Animais de Produção.

O isolamento e identificação laboratorial e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana são requisitos para um melhor controle através de terapêutica adequada. Entretanto, vários fatores impedem ou dificultam a implementação de uma rotina diagnóstica nas propriedades leiteiras, entre eles, distância dos centros de diagnóstico, custo dos exames laboratoriais, dificuldade na compreensão da importância deste monitoramento por parte do pessoal envolvido no processo de produção (PEREIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2005). Assim, rotineiramente, a escolha do medicamento anti-mastítico tem sido feita de forma empírica, baseada apenas no quadro clínico da enfermidade, ou ainda na chamada terapia profilática.

O uso profilático de antimicrobianos por via intramamária no final do período de lactação é considerado um componente importante dos programas de controle de mastite. A aplicação ocorre, geralmente, dois meses antes do parto, quando se interrompe o processo de

ordenha e se inicia a involução do úbere. Apesar do amplo uso da antibioticoterapia na secagem de vaca leiteira, não há evidências de resistência associada ao tratamento (ERSKINE et al., 2002).

A utilização de antibióticos na produção animal é considerado um risco crescente para a saúde humana, devido a uma possível contribuição na geração de cepas resistentes de microrganismos que podem ser transmitidas ao ser humano pela ingestão de produtos de origem animal. Inúmeros estudos vem sendo conduzidos pela Organização Mundial de Saúde, pela Comunidade Européia e pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Saúde no Brasil, no intuito de regulamentar a utilização dos antimicrobianos como aditivos alimentares na produção animal, bem como de seus resíduos nos produtos derivados. Esta é uma questão bastante controversa, uma vez que existem os defensores de que a restrição do uso de antimicrobianos pode resultar em um aumento do aparecimento de doenças infecciosas nos rebanhos, e como consequência, produtos de qualidade sanitária inferior. Por outro lado, a opinião do mercado europeu que tem gerado importantes embargos a produtos com resíduos de antimicrobianos é de que diversos fatores influenciam o aparecimento das doenças e seu impacto sobre a produção, e que em situação de manejo eficiente, a probabilidade de sucesso no tratamento das doenças pode ser aumentada (FAO/WHO, 2006, 2004; BRASIL, 2004; 2003 (a) e (b), 2002, 2000, 1998 (a) e (b); EUROPEAN COMMISSION, 1998). A presença de resíduos de antibióticos no leite, além da questão econômica, também implica em risco à saúde pública por poder ocasionar ao consumidor, problemas como a ocorrência de reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos mais sensíveis, (MARTINS; MARQUES; NETO, 2006; NUNES; D' ANGELINO, 2007).

A resistência bacteriana pode ser transferida por diversos mecanismos, podendo estabelecer-se de modo intra e interespecífico, entre microrganismos saprófitas e patogênicos, como também da microbiota animal para humana e vice-versa (HARDY al., 2002; AARESTRUP et al., 2001).

Diversos estudos que abordaram a suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência (BRITO et al., 2001; COELHO et al., 2009). Logo, o conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos efetivos para o controle da doença e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessário (SABOUR et al., 2004).

Dentro desse contexto, vem sendo desenvolvido através do Grupo de Pesquisa em Bacteriologia Veterinária da UFRRJ um projeto integrado de extensão e pesquisa com o objetivo de conhecer a realidade de algumas propriedades leiteiras das regiões Sul-Fluminense e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, através de visitas que permitiram observar o manejo e as condições sanitárias destas, bem como coletar amostras para isolamento bacteriano. Em especial, o objetivo do presente trabalho foi isolar espécies do gênero *Staphylococcus* através de amostras de leite mastítico e avaliar o perfil fenogenotípico de resistência desses isolados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Isolar espécies do gênero *Staphylococcus* através de amostras de leite mastítico coletados em propriedades leiteiras das regiões Sul-Fluminense e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, e avaliar o perfil fenogenotípico de resistência desses isolados.

3.2. Objetivos específicos:

- Isolar e identificar bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. presentes no leite de vacas positivas para mastite clínica ou subclínica;
- Caracterizar genotipicamente as espécies de *Staphylococcus* spp.
- Avaliar o fenótipo de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp;
- Detectar genes implicados na resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos através das técnicas de reação em cadeia de polimerase e eletroforese em gel.
- Buscar correlação entre as análises genotípicas e fenotípicas de resistência antimicrobiana;
- Determinar os antibiótipos prevalentes em cada unidade leiteira;
- Correlacionar alguns dados obtidos através do questionário aplicado para monitoramento com o resultado das análises bacteriológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das amostras de leite

Foram coletadas 272 amostras de leite de vacas pertencentes a 8 propriedades, sendo 4 localizadas em Rio Claro, 1 em Pirai, 2 em Paracambi e 1 em Seropédica, todas cidades pertencentes ou adjacentes à região Sul Fluminense do Rio de Janeiro.

Tabela 1. Relação das propriedades com suas respectivas cidades, números de amostra e vacas.

Identificação da propriedade	Cidade	Número de amostras (n ^o de vacas)*
A	Seropédica	101 (26)
B	Rio Claro	62 (17)
C	Pirai	40 (13)
D	Rio Claro	20 (5)
E	Paracambi	16 (4)
F	Paracambi	15 (4)
G	Rio Claro	10 (3)
H	Rio Claro	8 (4)
Total		272 (76)

*Em alguns casos, o número de amostras não corresponde a quatro vezes o número de vacas, porque muitos animais tinham tetos fibrosados.

Imediatamente antes da ordenha, foi realizado o “California Mastitis Test” (CMT) de todos os animais em lactação e 20% destes considerados positivos foram segregados. O CMT é usado mundialmente para o diagnóstico da mastite subclínica, tendo a vantagem de poder ser empregado no próprio rebanho, no momento em que os animais são ordenhados além de ser um método de fácil aplicação e baixo custo (BRITO et al., 2002). Consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, adicionando-se um detergente aniônico neutro, o qual atua rompendo a membrana dos leucócitos e liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade. De acordo com a intensidade da reação classifica-se em: negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (FONSECA; SANTOS, 2000; BRITO et al., 2002).

A coleta do leite foi feita por meio de ordenha manual e individual, antecedida por lavagem das mãos do ordenhador e do úbere do animal com água e sabão e álcool a 70%, com secagem dos mesmos com papel toalha. Os jatos de leite serão colhidos diretamente em frascos estéreis, colocados em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.2. Isolamento Bacteriano

As amostras de leite foram pré-enriquecidas com incubação de 6 horas a 37°C e posteriormente foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento primário em ágar sangue (AS), constituído por ágar columbia base (Merck), a sementeira foi feita com ponteiros estéreis. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente repicadas em ágar seletivo Manitol Vermelho de Fenol (MVF - Himedia) para obtenção de culturas puras de *Staphylococcus* spp., através da observação das características das colônias e fermentação, ou não, do manitol (KONEMAN et al., 2008).

4.2.1. Coloração de Gram, Prova do Hidróxido de Potássio (KOH) a 3% e Prova da Catalase

Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintórias.

A prova do hidróxido de potássio foi efetuada através da adição de uma gota de KOH (3%) à uma gota da suspensão bacteriana. A não formação de um gel viscoso indicou um resultado negativo confirmando a prova do Gram, uma vez que todas as bactérias Gram positivas são negativas na prova do KOH a 3%.

O teste da catalase foi realizado através de teste em lâmina, nos isolados que se apresentavam como cocos Gram positivos. Para tal, foi depositada uma gota da suspensão bacteriana homogênea, à qual adicionou-se uma gota da solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A liberação de O_2 gasoso e consequente liberação de bolhas indicava teste positivo. (KONEMAN et al., 2008).

4.2.2. Prova da coagulase

O teste para a detecção da atividade da enzima coagulase, foi realizado utilizando o crescimento bacteriano obtido em caldo BHI (Infuso de Cérebro e Coração-MERCK), incubado a 35°C, por 24 horas. Uma alíquota de 0,1 ml de cada amostra foi adicionada a 0,3 ml de plasma de coelho liofilizado (LABORCLIN) suspenso em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) e, incubados a 37°C por 4 a 24 horas a fim de obter a visualização do coágulo. As amostras coagulase-positivas tiveram sua identificação comprovada através da inoculação de 0,1 mL de suspensão bacteriana em 3 mL de cada caldo dos testes Voges-Proskauer (APGF-VETEC), fermentação da maltose e redução do nitrato a nitrito (KONEMAN et al., 2008).

4.2.3. Resistência à bacitracina

As amostras coagulase-negativas foram submetidas à prova da resistência a bacitracina para diferenciação entre *Micrococcus* spp., sensíveis, e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (SCN), resistentes; uma vez que estes apresentam as mesmas características em relação a morfologia, coloração de Gram e às provas da catalase, KOH (3%) e coagulase, o que torna necessário a utilização de provas adicionais para sua diferenciação. Neste trabalho foi utilizada a prova da bacitracina para a separação destes dois gêneros bacterianos. Uma suspensão bacteriana (0,1 mL) crescida por 24 horas em Caldo BHI (MERCK) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Müller Hinton) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos de bacitracina (0,04U – SENSIFAR-CEFAR®) foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito do fármaco, foram observados e medidos, em milímetros. Os estafilococos são resistentes à bacitracina (figura 1) e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococos são sensíveis e apresentam halo de 10 mm ou maiores (FORBES, 2002; KONEMAN et al., 2008).

4.2.4. Prova de Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução de nitrato

As amostras coagulase-positivas tiveram sua identificação comprovada através das provas de Voges-Proskauer (VP), fermentação da maltose e redução do nitrato (KONEMAN et al., 2008)

A prova de Voges-Proskauer foi realizada utilizando-se o caldo APGF (Água-Pepto-Glico-Fosfatada) que apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato. A utilização da glicose, apresentando como produto final a acetoína é indicada pela coloração rosa após a adição de 0,3 ml de α -naftol a 5% e 0,6 ml de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 horas a 37°C.

A fermentação da maltose foi testada utilizando o caldo contendo o indicativo de pH vermelho de fenol e o açúcar a 1%. A produção de ácido, indicada pela diminuição do pH e conseqüente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas na temperatura de 37°C.

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO₃). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada adicionando-se em uma lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 37°C e, uma gota de cada reativo (A e B) de Griess Ilosway. A coloração rosa indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva.

O quadro 1 apresenta o padrão de identificação das espécies estafilocócicas coagulase-positivas utilizado, segundo os testes acima citados.

Quadro 1. Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-positivas*.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Maltose	Caldo Nitrado	APGF**
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+/-	+	-
<i>S. hiycus</i>	-	+	-

* Segundo Koneman et al., (2008).

** Água-Pepto-Glico-Fosfatada

4.3. Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Staphylococcus spp. foram submetidos aos testes de suscetibilidade segundo os padrões do Clinical Laboratory Sandart Institute (CLSI, 2011).

Os isolados foram suspensos em caldo BHI, incubados durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e diluídos na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL. Tal concentração foi ajustada através do espectrofotômetro de absorvância, onde a densidade correta de turbidez variou de 0,08 a 0,1 utilizando comprimento de onda de 625nm.

A referida concentração foi confirmada através da quantificação do número de colônias crescidas em ágar Mueller Hinton (Himedia), após semeadura desse caldo e incubação por 24 horas a 37°C.

Para comparação e controle dos testes foi utilizada a cepa padrão ATCC 43300 *S. aureus* obtida junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

4.3.1. Difusão em disco simples

A suspensão bacteriana (0,1ml) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar Mueller Hinton (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (KOHNER et al., 1999).

4.3.1.1. Discos de antimicrobianos

No quadro abaixo estão listados os antibióticos testados nesse estudo e suas respectivas zonas de inibição de acordo com o CLSI, 2011. A escolha dos antibióticos foi feita a partir de informações dos fármacos mais utilizados nas propriedades para o tratamento da mastite.

Quadro 2. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.

Antimicrobianos	Zonas de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Tetraciclina (30µg)	≤14	15-16	≥19
Gentamicina (10µg)	≤12	13-14	≥15
Enrofloxacina (10µg)	≤14	15-17	≥18
Cefalotina (30µg)	≤14	15-17	≥18
Ampicilina (10µg)	≤28	-	≥29
Penicilina (10UI)	≤28	-	≥29
Sulfametoxazol-trimetropim (25µg)	≤10	11-15	≥16
Oxacilina (1µg)	≤10	11-12	≥13
Cefoxitina (30µg)	≤24	-	≥25

CLSI, 2011

4.3.2. Teste de suscetibilidade aos betalactâmicos

4.3.2.1. Difusão em disco modificada

Nesta técnica de difusão em disco, o meio utilizado - ágar Mueller Hinton (Himedia) - foi suplementado com 4% de NaCl. A suspensão bacteriana (0,5ml) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar Müller Hinton) com o auxílio da alça de Drigalski, sobre a qual se colocou o disco de oxacilina (1µg). Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos em milímetros. Os diâmetros acima de 13 mm indicavam a sensibilidade da amostra ao antibiótico (KOHNER et al., 1999).

4.3.2.2. Ágar “screen”

O desenvolvimento desta técnica se fez através da diluição da oxacilina (1,0mg/ml) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de meio de cultura (Müller Hinton), suplementado com 4% de NaCl. As placas de Petri foram divididas em oito partes iguais e sobre cada linha foi possível a inoculação de uma suspensão, ou seja, para cada placa foi possível a inoculação de 8 suspensões bacterianas distintas, semeadas com o auxílio da alça de platina. Após 24 horas de incubação a 37°C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (KOHNER et al., 1999).

4.3.2.3. Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima)

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/ml) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/ml; 0,5µg/ml; 1,0µg/ml; 2,0µg/ml; 4,0µg/ml, 8,0µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml, 256µg/ml e 512µg/ml em caldo Müller Hinton (MH).

Após inoculação 4 a 5ml de caldo MH, as bactérias foram incubadas a 35°C até alcançarem a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 em geral obtida após duas a seis horas de incubação. A densidade correta de turbidez foi confirmada com o uso do

espectrofotômetro com luz de absorvância, devendo esta variar de 0,08 a 0,1, utilizando um comprimento de onda de 625nm (CLSI, 2011).

Uma alíquota de 5µl da suspensão bacteriana foi adicionada a 95µl de caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico e incubadas a 35°C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos poços da microplaca utilizada. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração da droga presente no caldo MH. Logo, o valor da concentração do caldo posterior ao último que apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (KOHNER et al., 1999).

4.3.2.4. Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)

O método da microdiluição em ágar também permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/ml) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/ml; 0,5µg/ml; 1,0µg/ml; 2,0µg/ml; 4,0µg/ml, 8,0µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml, 256µg/ml e 512µg/ml em ágar Müller Hinton (MH).

Após os processos de inoculação, incubação e leitura no espectrofotômetro já descritos anteriormente, os isolados foram repicados no ágar MH contendo as distintas concentrações de oxacilina e as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. O resultado foi avaliado através do crescimento da colônia no ágar. Logo, o valor da concentração do ágar posterior ao que apresentou o último crescimento bacteriano, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (KOHNER et al., 1999).

4.4. Produção de betalactamases

Trata-se de um teste cromogênico que detecta a produção da beta-lactamase, através de uma cefalosporina cromogênica, ocorrendo uma mudança de cor quando houver ruptura do anel beta-lactâmico (REIS et al., 2001). Este método é recomendado pelo CLSI (2011) para confirmação de microrganismos portadores de enzimas beta-lactamase. A metodologia foi realizada pelo uso de discos impregnados com Nitrocefina (Sigma®), uma cefalosporina cromogênica. Cada disco foi umedecido com água destilada estéril e em seguida foi aplicada sobre a superfície de algumas colônias de cada isolado estudado, empregando ponteiros estéreis. A reação positiva foi evidenciada pelo desenvolvimento de uma coloração rosa, no local onde foi aplicado o microrganismo e a negativa, pela não alteração de cor. Para isolados betalactamase negativos, a reação foi reexaminada após uma hora, conforme recomendações do fabricante.

4.5. Testes de suscetibilidade à cefoxitina

4.5.1. Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima)

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de cefoxitina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de cefoxitina (1,0mg/ml) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/ml; 0,5µg/ml; 1,0µg/ml; 2,0µg/ml; 4,0µg/ml, 8,0µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml, 256µg/ml e 512µg/ml em caldo Müller Hinton (MH).

Após os processos de inoculação, incubação, leitura no espectrofotômetro (CLSI, 2011) e avaliação dos tubos após 24 horas, pode-se determinar o CIM, como já foi descrito anteriormente para oxacilina (KOHNER et al., 1999).

4.5.2. Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)

O método da microdiluição em ágar também permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/ml) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/ml; 0,5µg/ml; 1,0µg/ml; 2,0µg/ml; 4,0µg/ml, 8,0µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml, 256µg/ml e 512µg/ml em ágar Müeller Hinton (MH).

Todo o processo de realização, leitura e interpretação desta técnica foi idêntico ao já descrito para oxacilina (CLSI, 2011).

4.6. Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes de resistência

Todo o experimento de extração do DNA e amplificação dos genes de resistência foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular situado no Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

4.6.1. Extração do DNA bacteriano

A parede celular de bactérias Gram positivas é formada por uma espessa camada de peptidoglicano que dificulta a extração do gene bacteriano (PRESCOTT et al., 1996), fazendo-se necessária a utilização de enzimas específicas. Porém novos protocolos de extração vêm sendo propostos no intuito de simplificar, otimizar e diminuir os custos da técnica de PCR.

A extração do DNA bacteriano foi realizado segundo protocolo que está sendo otimizado pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde cada colônia crescida em ágar manitol vermelho de fenol foi repicada em 5 mL de caldo BHI (MERK). Após 18hs a 37°C, uma alíquota de 1,5 mL do caldo contendo o inóculo foi transferida para microtubos que foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 min, tal processo foi repetido três vezes, afim de se obter um pellet maior. Após duas lavagens com 500µl de tampão TE a 14.000 rpm por 1 min, ressuspendeu-se o pellet em 250µl de tampão de extração (NaCl 150mM; Tris-HCl 100mM e EDTA 20mM) e foi adicionada lisostafina (SIGMA) para concentração final de 20µg/ml (5µl de lisostafina – 1mg/ml). Após incubação à 37°C por 30 minutos, foi adicionado SDS 1% aos microtubos para concentração final de 3mg/ml, os quais foram levados ao banho-maria a 50°C por 1 hora e posteriormente incubados a -20°C por 10 min. Após a centrifugação a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionado a este o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturado por inversão por 5 min. Logo após a centrifugação a 14.000 rpm por 1 min, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionado NaCl para concentração final de 0,3M e misturado por inversão, acrescentado 2 volumes de etanol 100% e também misturado por inversão, seguido de incubação a -20°C por 2 horas ou overnight. Após isto, procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 30min e descarte do sobrenadante, o pellet foi lavado com 500µl de etanol 70% e colocado para secar a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 30 µl de água mili-Q.

O DNA de cada isolado extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose (UNISCIENCE) 0,8% para quantificação do material genético, a partir da comparação deste com o DNA lambda nas concentrações de 25 e 50ng/µl. Assim, o material genético de todos os isolados foi padronizado na concentração de 10ng/µl para realização das etapas de amplificação dos genes de caracterização e resistência.

4.6.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 1X (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl, e 0,1% Triton X-100, 2,0 mM de MgCl₂; pH 9,0), 0,5 mM de cada iniciador (BIONEER), 0,2 mM de dNTP (FERMENTAS), 2 U de Dream Taq™ Green DNA Polimerase (FERMENTAS) e água mili-Q para completar um volume total de reação de 20µl, contendo 2µl do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002).

Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo corante SYBR Green (INVITROGEN) diluído. A diluição foi feita na proporção de 1µl de solução estoque concentrada 10000X do corante para cada 10ml de gel de agarose, possibilitando a visualização dos amplicons no transiluminador ultra-violeta e documentação pela câmera fotográfica (SONY – Modelo DSC-HX1), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (FERMENTAS).

4.6.2.1. Caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp.

Todos os isolados foram caracterizados genotipicamente. Inicialmente foi realizada uma PCR multiplex para os genes característicos de *Staph* (*Staphylococcus* spp.) (ZHANG et al., 2004) e *S. aureus* (*DNAr*) (STRAUB et al., 1999), e adicionalmente foi realizada a detecção do gene *coa* (KARAHAN & CETINKAYA, 2006). Após essa etapa, foram realizadas amplificações dos genes espécie-específicos, *S. intermedius* (*nuc 3 e 4*) (SILVA et al., 2003) e SIG (*pta*) (BANNOEHR et al., 2007) para outras espécies de estafilococos coagulase positivos (ECP) (Quadro 3).

Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

Gene	Espécie	Primer (5' - 3')	Ciclo*
<i>Staph</i> (756 pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	1
<i>DNAr</i> (930 pb)	<i>S. aureus</i>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1
<i>coa</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	2
<i>nuc 3 e 4</i> (431 pb)	<i>S. intermedius</i>	GCC CCT GCA ATG AGA GG CGG ACC ACT TTC CGT C	3
<i>pta</i> (320pb)	Grupo SIG	AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG	4

*1. 94°C 5min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10min; 2. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 3. (95°C 50s., 42°C 2 min., 72°C 4 min) x 40 e 72°C 1 min; 4. 95°C 2min. (95°C 1min, 53°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min.

4.6.2.2. Genes relacionados à produção de β-lactamases de *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes *blaZ*, *blaI* e *blaRI* (ROSATO et al., 2003). Os genes do sistema *bla* regulam a produção de β-lactamases em *Staphylococcus* spp. (ROSATO et al., 2003). (Quadro 4).

Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes *bla* de *Staphylococcus* spp.

Gene	Primers	Ciclos *
<i>blaZ</i> (861 pb)	TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG CAT TAC ACT CTT GGC GGT TT	1
<i>blaI</i> (331 pb)	ATG TCT CGC AAT TCT TCA A CTA TGG CTG AAT GGG AT	1
<i>blaRI</i> (1566 pb)	GGT ATC TAA CTC TTC TTG C CAT CTG ATA AAT GTG TAG C	1

*1. 94°C 5min. (94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min, amplificação do tipo hot- start.

4.6.2.3. Genes de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes *mecA* (COELHO et al., 2007), *mecI* (LENCASTRE et al., 2002) e *mecRI* (ROSATO et al., 2003). Tal técnica foi realizada em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. no presente estudo (Quadro 5).

Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados para a amplificação dos genes do sistema *mec* de *Staphylococcus* spp.

Gene	Primers	Ciclos *
<i>mecA</i> (513 pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGGC AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1
<i>mecI</i> (209pb)	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	2
<i>mecRI</i> (234 pb)	CCA AAC CCG ACA ACT AC CGT GTC AGA TAC ATT TCG	3

*1. (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1 min) x 40 e 72°C 5min; 2. 94°C 4min. (94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 1min) x 30 e 72°C 4min ; 3. (95°C 1min, 55°C 1 min, 72°C 2 min) x 30.

4.6.2.4. Genes do cassette cromossomal estafilocócico (SCC*mec*) identificados em *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação do gene *mecI*, referente aos SSC*mec* tipos II e III; do gene *cif*, relacionado ao SSC*mec* tipo I e do gene *dcs*, correspondente aos SSC*mec* tipos I, II e IV (LENCASTRE et al., 2002) (Quadro 6).

Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de tipos de cassette de *Staphylococcus* spp.

Gene	Primers	Ciclos *	Tipos de SSC <i>mec</i>
<i>mecI</i> (209pb)	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	1	II e III
<i>Cif</i> (495 pb)	TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C	1	I
<i>dcs</i> (342 pb)	CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG	1	I, II e IV

*1. 94°C 4min. (94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 1min) x 30 e 72°C 4min.

4.7. Análise Estatística

Os perfis de resistência antimicrobiana obtidos nos diferentes testes foram expressos em porcentagens analisadas de forma descritiva. Os percentuais de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) dos testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina e cefoxitina foram calculados considerando os resultados obtidos nos testes de Difusão em Disco Simples (DDS) e Ágar Screen (AS) padronizados pelo CLSI veterinário (2008), seguindo as fórmulas abaixo:

% Sensibilidade = verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos negativos

% Especificidade= verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos positivos

% VPP= verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos positivos

% VPN= verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos negativos

A tabela abaixo expressa o critério interpretativo adotado:

Tabela 2. Critério representativo adotado para análise estatística dos testes fenotípicos de resistência à oxacilina.

Testes padrão DDS e AS	Método analisado	
	Resistente	Sensível
Resistente	Verdadeiro Positivo	Falso Negativo
Sensível	Falso Positivo	Verdadeiro Negativo

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das espécies de *Staphylococcus* spp.

Após a semeadura de 272 amostras de leite, foi obtido um total de 250 isolados de *Staphylococcus* spp., objeto deste estudo, além de outros microrganismos pertencentes a outros gêneros bacterianos e leveduras.

A identificação fenogenotípica das espécies revelou 58% (145/250) de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e 42% (105/250) de *Staphylococcus* spp coagulase positivos, através da amplificação dos genes *Staph* e *côa* (Figura 4). Dentre as espécies coagulase-positivas identificadas obteve-se 36,2% (38/105) de *S.aureus*, 11,4% de *S.intermedius* (12/105) e 3,8% (4/105) de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos do grupo SIG, de acordo com o perfil bioquímico e a amplificação dos genes específicos de caracterização (Figura 5 e Tabela 1). Os demais 51 (48,6%; 51/105) isolados foram fenotipicamente caracterizados como estafilococos coagulase-positivos, no entanto não amplificaram qualquer dos genes de caracterização específica utilizados: *DNAr* de *S.aureus*, *nuc3*, *nuc4* e *pta*. A próxima etapa será submetê-los à PCR para amplificação dos genes *nuc1* e *nuc2*, para uma possível identificação de *S. hyicus*. Desse modo, eles serão referenciados daqui por diante como ECP.

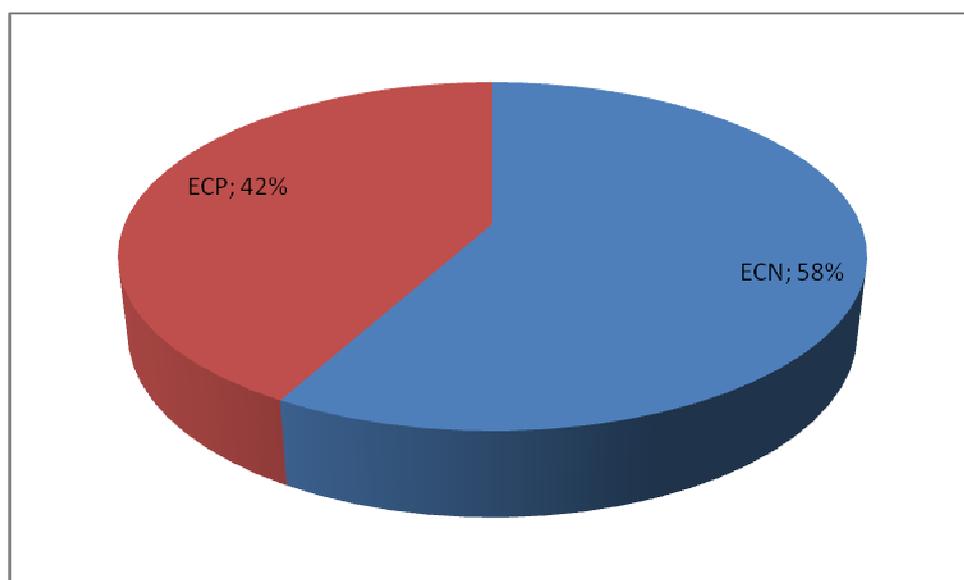


Figura 4. Gráfico apresentando a prevalência de *Staphylococcus* coagulase positivos e *Staphylococcus* coagulase negativos isolados das amostras de leite mastítico bovino.

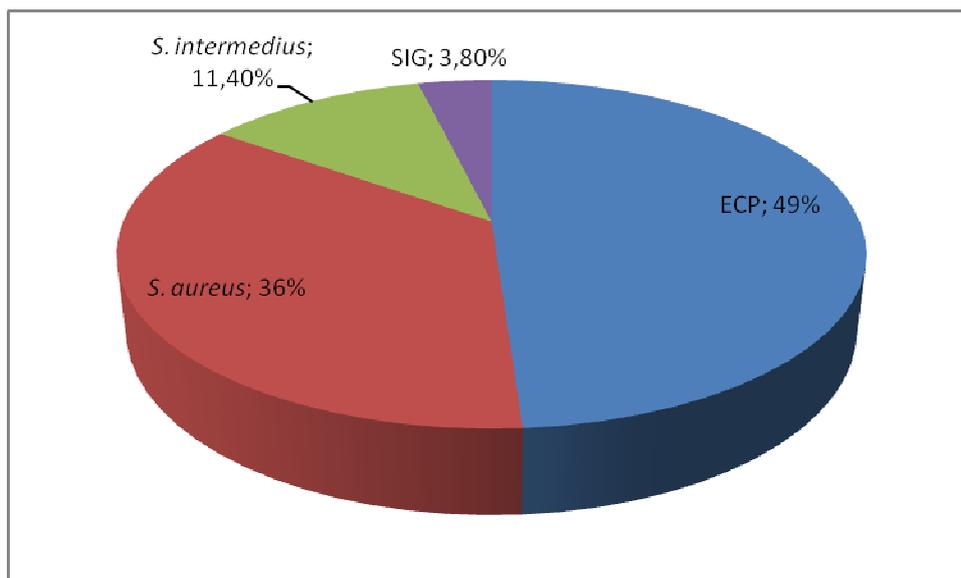


Figura 5. Gráfico apresentando a distribuição percentual das espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo isolados das amostras de leite mastítico bovino.

A eletroforese da reação de PCR multiplex do *DNA* de *Staphylococcus* spp. e *S.aureus* (Figura 6) produziu fragmentos únicos de 756 pb e 930 pb, respectivamente. O gene *nuc 3 e 4* de *S.intermedius* (Figura 7) amplificou mais de um fragmento, porém apresentou a banda esperada de 431pb corroborando com Silva et al.(2003). O gene *pta* de ECP (Figura 8) amplificou um fragmento único de 320 pb, de acordo com Bannoehr et al. (2007).

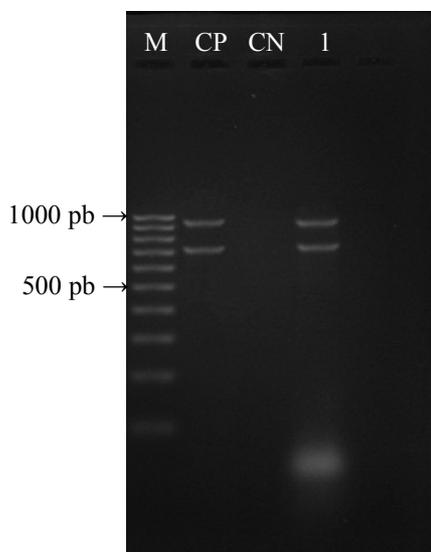


Figura 6. Gel de produto de PCR do multiplex dos genes *Staph* de *Staphylococcus* spp. (756 pb) e *S.aureus* (930 pb). M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, CN: controle negativo e 1: Isolado positivo.

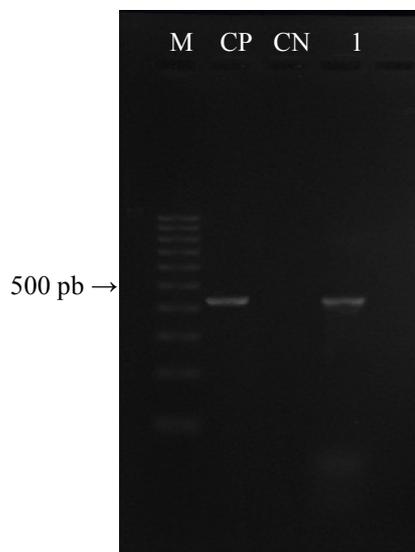


Figura 7. Gel de produto de PCR do gene *nuc 3 e 4* de *S.intermedius* (431 pb). M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, CN: controle negativo e 1: Isolado positivo.

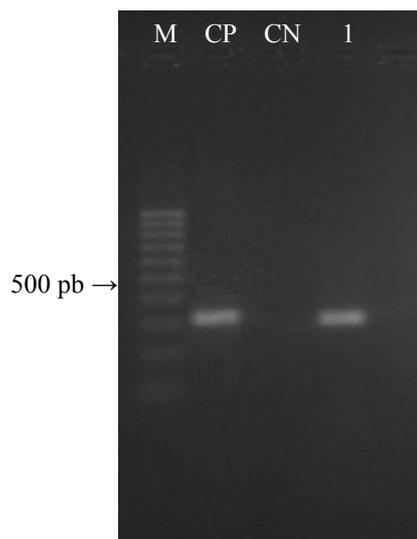


Figura 8. Gel de produto de PCR do gene *pta* de ECP (320 pb). M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, CN: controle negativo e 1: Isolado positivo.

Tabela 3. Percentagem da distribuição das espécies de *Staphylococcus* isoladas nas quatro regiões estudadas.

Região	Espécies*				
	ECN (n=145)	ECP (n=51)	<i>S. aureus</i> (n=38)	<i>S. intermedius</i> (n=12)	SIG (n=4)
Rio Claro	53,8%	64,7%	36,8%	50,0%	100
Piraí	15,9%	19,6%	7,9%	0	0
Paracambi	13,1%	5,9%	42,1%	41,7%	0
Seropédica	17,2%	9,8%	13,2%	8,3%	0

*ECN - *Staphylococcus* spp. coagulase negativos; ECP - *Staphylococcus* spp. coagulase positivos; *S. aureus*; *S. intermedius* e SIG.

O considerável progresso na classificação sistemática dos estafilococos e no desenvolvimento de métodos para a identificação do gênero, espécies e subespécies, tem permitido o reconhecimento da variedade de ECN presentes em diversos tipos de amostras, bem como sua implicação como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos (CUNHA et al., 2002).

Durante muito tempo os estafilococos coagulase-negativos (ECN) foram, considerados microrganismos saprófitas e raramente patogênicos, sendo encontrados na pele sã do teto da vaca e nas mãos do ordenhador. No entanto, atualmente, são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos, sendo comumente isolados de amostras clínicas animais (BANNERMAN, 2003). São, portanto reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas, que aproveitam inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções, colonizando o canal do teto e penetrando até aos tecidos secretores, no caso da mastite (CUNHA et al., 2002).

A importância dos ECN implicados na mastite bovina tem aumentado nos últimos anos, representando perdas econômicas. A frequência de isolamento dos *Staphylococcus* coagulase-negativos a partir de mastites clínicas e subclínicas em vacas e novilhas de todo o mundo tem aumentado consideravelmente, tornando-os agentes emergentes na mastite bovina

(GENTILINI et al., 2002; PITKÄLÄ et al., 2004; FREITAS et al., 2005; SOARES et al., 2009).

Esses relatos suportam o elevado percentual de ECN encontrado neste estudo nas regiões de Rio Claro, Piraí, Paracambi e Seropédica (tabela 2), confirmando a ampla disseminação destes agentes em ambientes de produção leiteira. Este achado embasou a elaboração de outro projeto destinado à identificação genotípica dos ECN, afim de que se possa mapear as espécies relacionadas e os possíveis clones circulantes em cada região estudada.

Tem sido relatado que, de modo geral, ECN tende a estar implicado em casos de mastite subclínica, causando uma infecção leve, que pode evoluir para cura espontânea ou se agravar, causando alterações na CCS e apresentando os sinais clínicos clássicos de mastite clínica (AMARAL et al., 2003). No presente trabalho, foi possível observar que a maior frequência de isolamentos dos ECNs se deu a partir das amostras de leite de vacas que apresentavam CMT + ou ++, mesmo que fosse em apenas um dos tetos, tendo menor frequência em amostras de animais que apresentavam CMT +++.

Embora a capacidade dos ECN de causar infecções seja bem documentada, esses microrganismos ainda têm sido em alguns casos negligenciados quanto à sua importância clínica (CUNHA et al., 2002), desconsiderando inclusive seu elevado risco potencial de bacteremia em animais imunocomprometidos (HUDOME; FISHER, 2001; CUNHA et al., 2002).

Staphylococcus spp coagulase-positivos, em especial *S. aureus*, tem sido considerados como os principais agentes etiológicos de mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros (BRITO et al., 2002). De acordo com Freitas et al., (2005), além de *S. aureus*, outros coagulase-positivos também podem ser implicados nesta etiologia. No presente trabalho, apesar da prevalência de *S. aureus* dentre os coagulase-positivos identificados, houve um significativo percentual de ECPs cuja identificação em nível de espécie não pode ser concluída através da metodologia padronizada. Tal fato requer uma abordagem metodológica diferenciada que possibilite a identificação destes agentes e a melhor compreensão de seu envolvimento com os casos de mastite estudados. Além disso, *S. intermedius* e *Staphylococcus* do grupo SIG também foram isolados, porém em menor proporção.

Em estudo desenvolvido por Moroni et al., (2006), verificou-se que o *Staphylococcus intermedius* foi isolado em 12,20%, das 82 amostras avaliadas. A importância de *Staphylococcus intermedius* ainda é pouco discutida na etiologia das mastites, sendo esta espécie mais associada a cães. Recentemente, um grupo de pesquisa conseguiu realizar o sequenciamento de locus da espécie *Staphylococcus intermedius*, podendo assim demonstrar que esta era considerada a responsável por muitas enfermidades em animais de forma equivocada (BANNOEHR et al., 2009). A análise genotípica revelou as espécies *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini*, as quais eram classificadas fenotipicamente como *S. intermedius*, assim surgiu o grupo *S. intermedius* (SIG) (BANNOEHR et al., 2007; DEVRIESE et al., 2008). Assim também foi descoberto que *S. pseudintermedius*, e não *S. intermedius*, é o patógeno de muitas doenças animais e que *S. delphini* foi isolado a partir de várias espécies animais, podendo ser mais importante clinicamente do que se pensava (BANNOEHR et al., 2007; DEVRIESE et al., 2008). O recém-identificado *S. pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005) é ocasionalmente isolado de infecções humanas graves, e a emergência e propagação de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina são os principais problemas de saúde veterinária e pública (GUARDABASSI et al., 2004; VAN HOOVELS et al., 2006; BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007; DESCLOUX et al., 2008; DEVRIESE et al., 2008). Sasaki et al. reportou ser possível diferenciar bioquimicamente *S. intermedius* das outras espécies SIG, mas não identificou marcadores fenotípicos para discriminar *S. pseudintermedius*, de

importância clínica, de *S. delphini* (SASAKI et al., 2007), logo concluiu que o sequenciamento de DNA é atualmente necessário para identificar *S. pseudintermedius* (BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007). Foi realizada uma reação de PCR para amplificação do gene *pta* (320 pb), o qual está presente em várias espécies de *Staphylococcus*. Este fragmento foi posteriormente submetido à ação da enzima de restrição MboI, produzindo fragmentos de 213 e 107 pb para a *S. pseudintermedius*, que possui apenas um sítio de ação para a enzima de restrição. As espécies *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* não tem sítio de ação para MboI e portanto, não produziram fragmentos. *Staphylococcus aureus* produziu fragmentos de 156 e 164 pb. Assim, a diferenciação das espécies de *Staphylococcus* foi possível (BANNOEHR et al., 2009). No presente trabalho foi realizada somente a reação de PCR para amplificação do gene *pta* para identificação de *Staphylococcus* spp. do grupo SIG, sem a submissão do fragmento à ação da enzima MboI, esta análise mais detalhada será realizada em estudos futuros.

5.2. Perfil de suscetibilidade dos *Staphylococcus* spp.

A figura 9 ilustra um antibiograma, onde se pode observar o halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor de um dos discos de antibiótico, na região superior esquerda da figura. Nos demais, a bactéria testada apresentou resistência aos antibióticos.



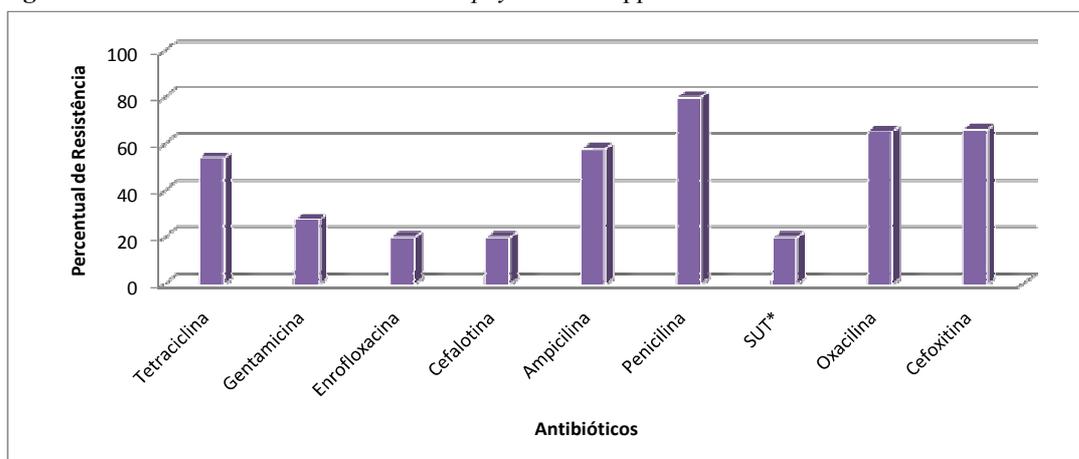
Figura 9. Método de difusão em disco. A linha demonstra o halo de sensibilidade ao disco em milímetros, os demais isolados são resistentes.

Os resultados dos percentuais de resistência de *Staphylococcus* spp. obtidos através do ensaio de difusão em disco estão dispostos na Tabela 4 e Figura 10.

Tabela 4. Percentuais de resistência encontrados para os antibióticos testados.

Antibióticos	Percentual (%)	
	Sensibilidade	Resistência
Tetraciclina	46	54
Gentamicina	72,4	27,6
Enrofloxacina	80	20
Cefalotina	80	20
Ampicilina	42	58
Penicilina	20	80
Sulfametoxazol+trimetropim	80	20
Oxacilina	34,4	65,6
Cefoxitina	33,6	66,4

Figura 10. Percentual de resistência dos *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.



* Sulfametoxazol+trimetropim

O elevado percentual de resistência à penicilina (80%) e à ampicilina (58%) encontrado deve-se ao fato de serem antibióticos muito difundidos no tratamento de enfermidades animais. Santos et al. (2006) detectaram 90% de resistência à penicilina e ampicilina em 30 isolados de *Staphylococcus* provenientes de leite bovino. Da mesma forma Corrêa (2003) analisou 95 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite mastítico bovino no Brasil e detectou 78,94% e 77,98% de resistência à ampicilina e penicilina, respectivamente. Essa resistência encontrada para esses dois antibióticos justifica-se em razão do uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) na medicina veterinária, pois são frequentemente utilizados para controle de mastite (ANDRADE et al., 2000; ROBINSON; ENRIGHT, 2003; COELHO et al., 2007). A utilização indiscriminada destes princípios ativos nas propriedades visitadas foi evidenciada através da investigação epidemiológica realizada durante as visitas, onde foi possível constatar que a penicilina é um dos antibióticos mais escolhidos para o tratamento empírico dos casos de mastite.

Foi detectado 65,6% de resistência à oxacilina nos isolados estudados. Fontana et al. (2010) detectaram 96,5% de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite subclínica na região de Jataí, sudoeste de Goiás. De outro modo, Narder Filho et al. (2007) encontraram 15,3% de resistência à oxacilina em isolados de *S. aureus* isolados de mastite bovina no Estado de São Paulo. Coelho et al. (2007) observaram 33,8% de resistência a esse fármaco em isolados de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.

No presente trabalho foi detectado 66,4% de resistência a cefoxitina. Cauwelier et al. (2004) encontraram 60% (n=155) e Palazzo; Darini (2006) detectaram 49,66% (n=151) de resistência a cefoxitina em isolados de *Staphylococcus* spp. isolados a partir de leite mastítico. Soares et al. (2008) observaram 37,5% de resistência a esse fármaco em ECNs ao estudarem amostras de leite bovino mastítico. Algumas cefalosporinas, como a cefalexina, eram usadas nas propriedades investigadas no presente estudo, demonstrando que existe uma pressão de seleção positiva para o desencadeamento da resistência observada a esta classe de antimicrobianos. Trata-se de uma cefalosporina de segunda geração que apresenta alta afinidade com a PBP2, PBP4, apresentando grande especificidade na indução da expressão do gene *mecA* (CAUWELIER et al., 2004).

Foi detectado um significativo percentual 54% de resistência à tetraciclina nos isolados de *Staphylococcus* estudados. Resultados contrastantes foram demonstrados por Donatele et al. (2002), que ao avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos de 180 amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite subclínica em rebanhos do estado do Rio de Janeiro, verificaram 24,4% de resistência à tetraciclina e Santos et al. (2006) que

detectaram apenas 6,6% (n=30) de resistência a esse agente no mesmo tipo de amostra. Em estudo realizado no Pará, Oliveira et al. (2011, a) encontraram 26,1% de resistência à tetraciclina em ECNs e 6,7% para *S. aureus*.

Em relação aos aminoglicosídeos, foi detectado 27,6% de resistência a gentamicina nos isolados testados. COSTA et al. (2000) e FREITAS et al. (2005) detectaram 46% e 51% de resistência a este fármaco, respectivamente, ao pesquisarem o perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus* spp. em isolados de mastite bovina. Entretanto, relatos de Nader Filho et al. (2000) e Neves et al. (2007) relataram percentuais bem mais baixos, como 5,4% (n=72) e 4% (n=50), respectivamente, de resistência a gentamicina em isolados de estafilococos provenientes da glândula mamária de vacas lactantes sadias. Langoni et al. (2000) consideram que a gentamicina continua sendo um antibiótico eficaz no tratamento das mastites bovinas de origem estafilocócica. No presente estudo, observou-se que este antimicrobiano é amplamente utilizado em 37,5% (3/8) das propriedades leiteiras visitadas.

Neste estudo foi detectado 20% de resistência à enrofloxacin, uma quinolona de uso veterinário, que não é muito difundida em ambientes de produção leiteira, sendo restrita ao tratamento de mastites clínicas. Langoni et al. (2000) também encontraram resultado semelhante ao detectarem 28% (n=55) de resistência à enrofloxacin em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de quadros de mastite. Da mesma forma, Marinho et al. (2002) ao avaliar *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. isolados de leite mastítico detectaram níveis de resistência de 28,37% e 26,04%, respectivamente, à ação da enrofloxacin na região de Botucatu, São Paulo. Já em Minas Gerais, Cardoso et al. (2000) isolaram 127 *S. aureus* provenientes de 23 municípios e detectaram apenas 1,6% de resistência à enrofloxacin. Este elevado percentual de sensibilidade provavelmente deve-se ao fato deste medicamento ser de uso restrito ao tratamento animal.

Em relação à associação de sulfametoxazol-trimetoprim foi detectado 20% de resistência. Côrrea (2003) encontrou 24,21% (n=95) de resistência na região de Jaboticabal, no Estado de São Paulo. Cardoso et al. (2000), no Estado de Minas Gerais, encontraram 13,4% de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim. Já o relato mais recente de Machado et al. (2008) reporta 47,8% (n=57) de resistência ao agente. Em controvérsia, Zafalon et al. (2007) observaram 2,7% de resistência e Oliveira et al. (2011, a) detectaram 0% de resistência a esse fármaco. Todos avaliaram isolados de *Staphylococcus* spp. de leite mastítico.

Foi detectado 20% de resistência a cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração indicada no tratamento da mastite subclínica e de vacas secas (LEITER, 2000). Oliveira et al. (2011, a) encontraram 13% de resistência a cefalotina em *Staphylococcus* spp. isolados mastite bovina no Estado do Pará. De outro modo, Oliveira et al. (2011, b), observaram 7% de resistência a esse fármaco em *Staphylococcus* spp. isolados de vacas com mastite subclínica no agreste do Estado de Pernambuco.

Foi observada uma grande variação quanto ao perfil da resistência antimicrobiana das amostras de *Staphylococcus* spp. envolvidas na etiologia da mastite bovina em rebanhos brasileiros. De acordo com Sol et al. (2000) e Zafalon et al. (2007), a possibilidade de cura depende da estirpe bacteriana ou do animal. Algumas amostras de *S. aureus* parecem ser mais sensíveis ao tratamento do que outras e, também, algumas vacas se recuperam melhor, tratadas ou não. Assim, vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia antimicrobiana, seja em razão do estágio da ocorrência da infecção, seja da presença de bactérias em abscessos, além do estado imunitário do animal (ZAFALON et al., 2007).

5.2.1 Perfil de Antibiotipos dos *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* spp foram classificados em antibiotipos segundo os seus perfis de resistência aos antibióticos mais utilizados nas propriedades leiteiras visitadas. Como exposto

na tabela do Anexo I observa-se 68 perfis, o que demonstra a intensa heterogeneidade desses 250 isolados.

Os antibiogramas prevalentes para os 145 isolados de ECN foram de sensibilidade a todos os antibióticos (perfil 1; 9,0%), resistência à ampicilina e penicilina (perfil 3; 8,3%) e resistência à tetraciclina e penicilina (perfil 42; 7,6%). Para os 51 isolados de ECP não identificados em nível de espécie, destacam-se os antibiogramas de resistência a tetraciclina (perfil 10; 9,8%), seguido da resistência à cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 14) e da resistência a tetraciclina, cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 35), ambos com 7,8%. Quanto aos 38 isolados de *S. aureus* predominaram os antibiogramas de resistência à tetraciclina (perfil 10; 18,4%), resistência à penicilina (perfil 5; 13,1%), e resistência à tetraciclina, gentamicina, cefalotina, ampicilina, penicilina e sulfametoxazol+trimetopim (perfil 12; 10,5%). Para os 12 isolados de *S. intermedius* predominaram os antibiogramas de resistência a todos os antibióticos testados (perfil 2; 25%), e os antibiogramas de resistência à tetraciclina, ampicilina e penicilina (perfil 4), e de resistência à tetraciclina, cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 15), ambos com 16,6% de frequência. E por fim, os 4 isolados do grupo SIG apresentaram antibiogramas distintos pertencentes aos perfis 2, 3, 10 e 37, de resistência a todos os antibióticos, à ampicilina e penicilina, à tetraciclina e à gentamicina, cefalotina e penicilina, respectivamente.

A variedade de antibiogramas observada pode ser explicada por diversos fatores, como a própria diversidade genética do gênero *Staphylococcus* spp. pela sua intensa recombinação gênica inter e intraespecífica; pelas diferenças estruturais e de manejo entre as unidades leiteiras visitadas o que acarreta diferentes pressões de seleção por parte do meio ambiente, uma vez que a antibioticoterapia adotada e os princípios ativos mais utilizados variavam entre as oito propriedades avaliadas; e ainda pelas características raciais e genéticas dos rebanhos leiteiros estudados.

A figura abaixo apresenta os percentuais dos perfis predominantes nas espécies de *Staphylococcus*.

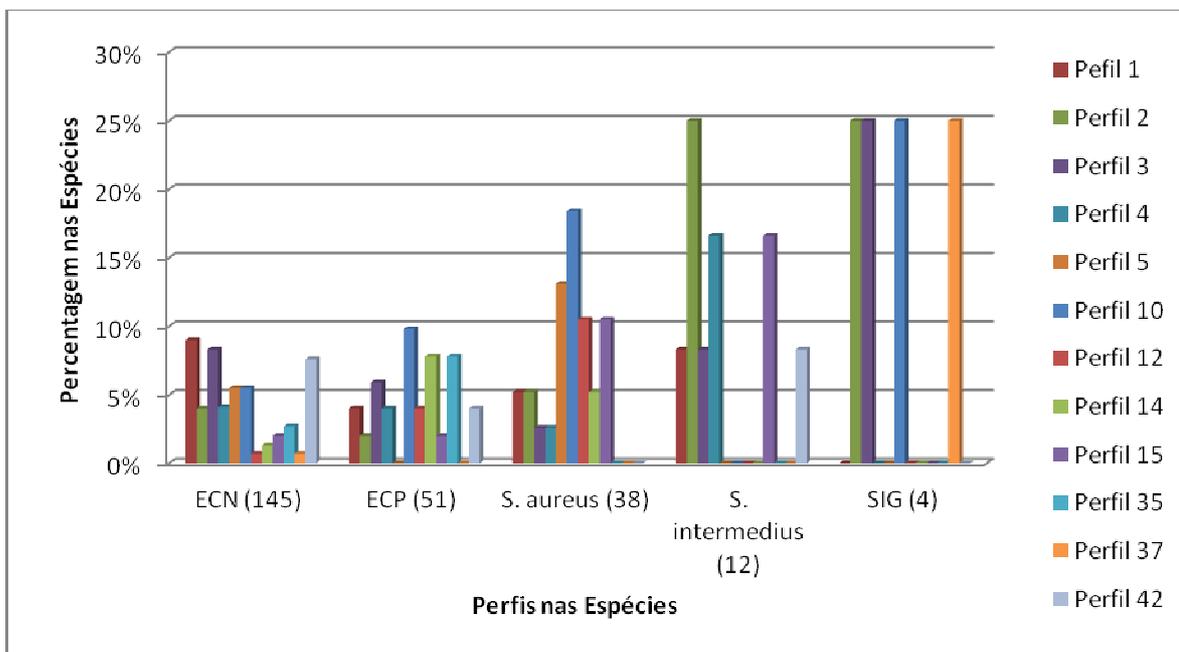


Figura 11. Percentual dos perfis que se destacaram em cada espécie de *Staphylococcus*.

A tabela abaixo destaca os perfis mais encontrados para cada espécie de *Staphylococcus* identificada de acordo com as quatro regiões estudadas.

Tabela 5. Distribuição dos antibiótipos das diferentes espécies avaliadas de acordo com as regiões envolvidas neste estudo.

Espécies (n)	Regiões							
	Rio Claro		Piraí		Paracambi		Seropédica	
	N=4		N=1		N=2		N=1	
	Perfil	%(n=78)	Perfil	%(n=23)	Perfil	%(n=19)	Perfil	%(n=25)
ECN (145)	42	11,5	3	13	1	16	10	16
	3	10,2	1	8,7	15	16	34	16
	1	8,9	2	8,7	54	16	20	8
	32	6,4	5	8,7	-	-	-	-
	Perfil	%(n=33)	Perfil	%(n=10)	Perfil	%(n=3)	Perfil	%(n=5)
ECP (51)	3	9,1	**		2	33,3	10	40
	10	9,1	-	-	15	33,3	9	20
	14	9,1	-	-	35	33,3	38	20
	35	9,1	-	-			68	20
	Perfil	%(n=14)	Perfil	%(n=3)	Perfil	%(n=16)	Perfil	%(n=5)
<i>S. aureus</i> (38)	5	28,6	1	33,3	15	25	10	40
	10	14,3	7	33,3	10	18,8	5	20
	12	14,3	8	33,3	2	12,5	9	20
	14	14,3	-	-	12	12,5	11	20
	Perfil	%(n=6)	Perfil	%(n=00)	Perfil	%(n=5)	Perfil	%(n=1)
<i>S. intermedius</i> (12)	4	33,3	*	-	2	40	2	100
	-	-	-	-	15	40	-	-
	Perfil	4%	Perfil	%(n=00)	Perfil	%(n=00)	Perfil	%(n=00)
SIG (4)	2	25	*		*		*	
	3	25	-	-	-	-	-	-
	10	25	-	-	-	-	-	-
	37	25	-	-	-	-	-	-

N = número de propriedades estudada na região

n=Frequência do antibiótipo

*O microrganismo não foi encontrado na região

**Foram encontrados 10 perfis diferentes, tendo frequência 1 cada um deles.

Observando a região de Rio Claro, que abriga quatro das oito propriedades estudadas, é possível notar que os antibiótipos de resistência à ampicilina e penicilina (perfil 3) e de resistência à tetraciclina (perfil 10) são os mais distribuídos entre os grupos de *Staphylococcus* spp. estudados. Quantitativamente, o perfil de resistência a penicilina e tetraciclina (perfil 42) foi prevalente entre os perfis estudados. De modo específico, ao avaliar os antibiótipos de *S. aureus* observou-se prevalência do perfil de resistência apenas a penicilina (perfil 5), seguido dos perfis de resistência à tetraciclina (perfil 10), perfil de resistência a cefalotina, ampicilina

e penicilina (14) e dos perfil de multiresistência a tetraciclina, gentamicina, cefalotina, ampicilina, penicilina e sulfametoxazol + trimetoprim (12).

Na propriedade localizada no município de Pirai, houve predominância do antibiograma de sensibilidade a todos os antibióticos (perfil 1), tendo sido observado um antibiograma para cada isolado de *S. aureus*. Na região de Paracambi o perfil de multiresistência à tetraciclina, gentamicina, enrofloxacina, cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 15) distribuiu-se em todos os grupos estudados. E na região de Seropédica, o antibiograma de resistência à tetraciclina (perfil 10) aparece em três grupos.

5.2.2. Resistência aos betalactâmicos oxacilina e cefoxitina

Os *Staphylococcus* spp foram avaliados quanto à resistência aos antibióticos betalactâmicos, a partir dos testes fenotípicos de ágar “screen”, difusão em disco modificada, difusão em disco simples com oxacilina, difusão em disco simples com cefoxitina, concentração inibitória mínima em caldo e em ágar de oxacilina e concentração inibitória mínima em caldo e em ágar de cefoxitina.

5.2.2.1. Testes fenotípicos de resistência à oxacilina e cefoxitina

As figuras abaixo ilustram os testes ágar “screen” e difusão em disco modificada. Na figura 12 observa-se a resistência e a sensibilidade dos isolados no teste ágar “screen”, onde qualquer crescimento, embora pequeno, é considerado como resistência ao teste. E a figura 13 representa o teste de difusão em disco modificada, onde é possível observar o perfil de sensibilidade no primeiro isolado e o perfil de resistência nos demais isolados da placa.

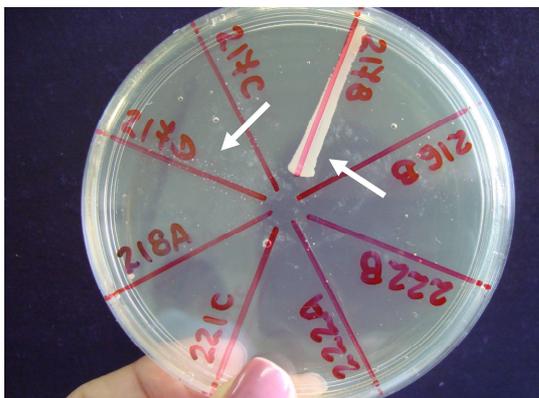


Figura 12. Teste de Ágar “screen”. As setas indicam as colônias crescidas em meio contendo oxacilina (6µg/ml).



Figura 13. Teste de Difusão em disco modificada.

As figuras 14 e 15 ilustram as técnicas de microdiluição em caldo à esquerda e em ágar à direita.



Figura 14. Teste de microdiluição em caldo.

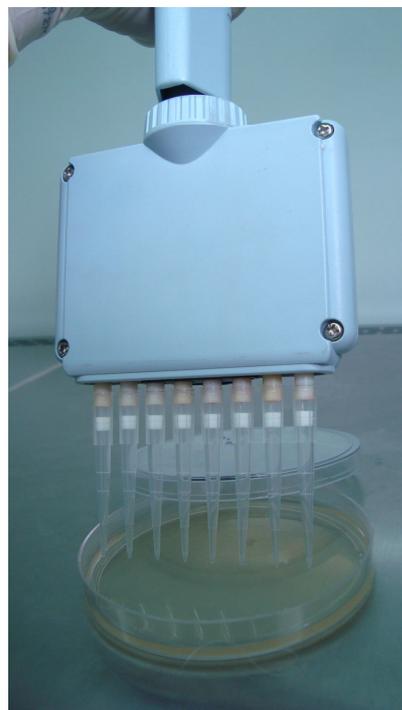


Figura 15. Teste de microdiluição em ágar.

De acordo com os resultados dos oito testes fenotípicos realizados foi observada uma significativa variação nos perfis de resistência obtidos (Anexo II), evidenciando a heterogeneidade da resistência dos *Staphylococcus* spp. à oxacilina e cefoxitina. Tal heteroresistência se caracteriza pela presença tanto de organismos suscetíveis que exibem crescimento atípico de *Staphylococcus* não-heteroresistentes, quanto organismos resistentes que crescem mais lentos, ou em condições distintas de temperatura e NaCl (AARESTRUP et al., 2001).

Em consequência a esses fatores, trabalhos de pesquisas reportam a dificuldade na avaliação do perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus* spp. à oxacilina (COELHO, et al., 2009; SOARES et al., 2010). No presente trabalho foi avaliado o perfil fenotípico da resistência a oxacilina e cefoxitina utilizando uma ampla gama de testes no objetivo de formar uma visão crítica da validade de cada um desses métodos. A cepa ATCC 43300, usada como controle positivo, apresentou resistência em todos os testes fenotípicos realizados.

Para avaliar a sensibilidade/especificidade destes testes tomamos como *padrão ouro*, os testes de difusão em disco simples (DDS) e ágar screen (AS) preconizados pelo CLSI veterinário (2008). Cabe ressaltar que o CLSI para análise de material humano também preconiza a microdiluição em caldo (2011).

Ao analisar os 54 perfis obtidos foi observado que em 64,81% (35/54) houve similaridade entre os resultados obtidos por DDS e AS correspondendo a 70% do total de isolados (175/250). Tais perfis foram considerados para os cálculos dos valores preditivos positivo e negativo, e valores de especificidade e sensibilidade dos demais testes conforme tabela abaixo .

Tabela 6. Percentagem de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para os testes fenotípicos realizados.

Testes*	Valores (%)			
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
DM	53	85	48	87
DSC	87	85	77	92
CCO	96	22	76	70
CAO	91	50	75	78
CCC	98	32	90	73
CAC	95	45	82	77

*Teste de resistência à oxacilina = DM – Difusão em Disco Modificada; DSC - Difusão em Disco Simples com Cefoxitina; CCO - Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Oxacilina; CAO - Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Oxacilina; CCC - Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Cefoxitina; CAC - Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Cefoxitina. VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo.

Ao analisar os resultados obtidos é possível observar que o teste de Difusão em Disco Simples com Cefoxitina (DSC) é o de melhor desempenho quando comparado aos testes padrão. Suas características de sensibilidade, especificidade e valores de predição aliadas ao seu baixo custo e fácil execução permitem que este venha a ser uma alternativa valorosa na predição fenotípica da resistência aos beta-lactâmicos. Tal fato já vem sendo observado em laboratórios de rotina de diagnóstico clínico humano como uma possível alternativa a execução da técnica de Ágar Screen, muito mais laboriosa. No último Congresso de Análises Clínicas realizado em Curitiba, PR, em junho de 2011, vários grupos de diagnóstico em Bacteriologia Clínica discutiram a utilização desta técnica como predição de resistência a beta-lactâmicos. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a validade desse teste como ferramenta útil também para o diagnóstico bacteriológico clínico em Medicina Veterinária.

A literatura reporta que a multiplicidade de fatores associados à oxacilina requer uma investigação que inclua a detecção de marcadores genéticos para interpretação correta do fenótipo de heteroresistência expresso por determinados isolados de *Staphylococcus* spp. O tópico abaixo reporta os resultados da detecção dos genes do sistema *mec*.

5.2.2.2. Detecção do sistema *mec* em *Staphylococcus* spp.

A técnica de PCR foi aplicada para a detecção de genes reguladores do sistema *mec* (*mecI- mecR1*), com o objetivo de verificar o perfil fenotípico de heteroresistência à oxacilina (Anexo III).

As figuras ilustram os produtos da reação multiplex de PCR para os genes *DNAr Staphy* e *mecA*, após (Figura 16) e PCR simples para o gene *mecRI* (Figura 17).

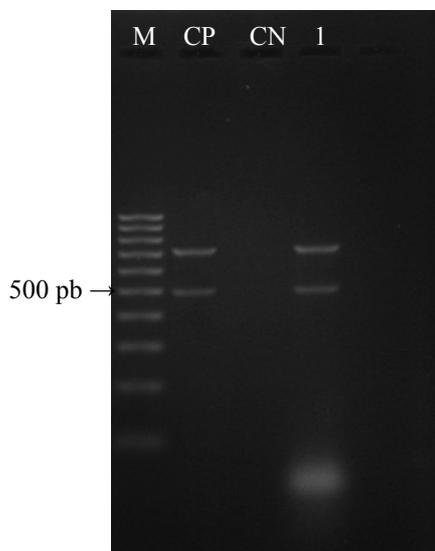


Figura 16. Gel de produto de PCR do multiplex genes *DNAr Staphy* (756 pb) e *mecA* (513 pb). M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo CN: controle negativo e 1: isolado positivo.

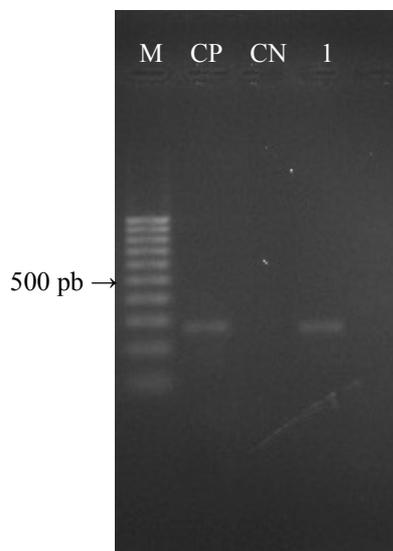


Figura 17. Gel de produto de PCR do gene *mecRI* (234pb). M: marcador de peso molecular (100bp), CN: controle positivo, CN: controle negativo e 1: isolado.

Todos os isolados estudados foram negativos para o gene *mecA*, mesmo aqueles que apresentaram resistência fenotípica nos testes preconizados. O controle positivo cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus aureus mecA* positivo, obtida junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ, amplificou para os dois genes da reação de multiplex em todos os ensaios realizados, bem como para todos os genes do complexo *mec*, descartando qualquer possibilidade de erro na execução da técnica. Os genes *mecI* e *mecRI* foram detectados igualmente em 11,6% (29/250) dos *Staphylococcus* spp..

Ao utilizarmos a ferramenta do programa BLAST para avaliação da especificidade de anelamento da sequência *primer* utilizada na reação de amplificação foi constatado ser esta de alta especificidade e conservação descartando a possibilidade de erro no anelamento ou inespecificidade. Ainda assim, não está descartada a busca por outros primers da região conservada do *mecA*. Até o momento, em nossos estudos, não tem sido observada correlação entre os perfis fenotípicos de resistência e a detecção gênica, desse modo, pretendemos em etapa futura, investigar os processos de regulação e transcrição gênica do *mecA*, bem como do produto dessa expressão, no caso a proteína de baixa afinidade PBP2a, além da busca por genes homólogos como será discutido adiante.

A figura abaixo ilustra os quatro tipos de cassete detectados neste estudo.

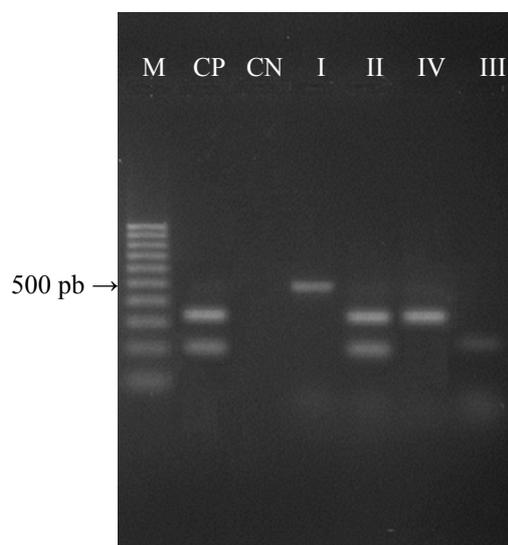


Figura 18. Gel de produto de PCR do multiplex dos genes de tipos de cassete de *Staphylococcus* spp. SCCmec tipos I, II, IV e III. M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo e CN: controle negativo.

Apesar da não detecção de isolados *mecA* positivos, foram detectados os quatro tipos de cassete nos isolados estudados (Tabela 7), o que causa uma série de questionamentos, uma vez que todo MRSA deveria apresentar o gene *mecA* em seu cassete (ITO et al., 2004). Entretanto, no período de janeiro de 2006 a junho de 2011, a partir da análise de 12.691 isolados de origem humana coletados na Alemanha, foi encontrado um novo tipo de cassete em 11 isolados, denominado cassete tipo XI. A cepa foi nomeada MRSA CC130 e contém um homólogo do gene *mecA*, denominado *mecA*_{LGA251} (CUNY et al., 2011).

Este homólogo do gene *mecA* já havia sido descrito em casos de mastite bovina em MRSA ST130 e mais recentemente em seres humanos ambos no Reino Unido (SHORE et al., 2011; GARCIA et al., 2011). Isolados oriundos de seres humanos com fenótipo de MRSA, negativos para *mecA* e positivos para *mecA*_{LGA251} foram encontrados na Inglaterra e na Dinamarca. Curiosamente, este homólogo do gene *mecA* não é detectado por PCR com primers para detecção de *mecA* (CUNY et al., 2011).

Até o momento MRSA CC130 ainda não foi isolado de bovinos, mas parece ter uma origem animal provável, pois já foi isolado a partir de um swab nasal de um veterinário em Baviera (CUNY et al., 2011). Além disso, conforme foi relatado na Dinamarca e no Reino Unido, MRSA ST130 é absolutamente capaz de colonizar e causar infecções em bovinos e em seres humanos (SHORE et al., 2011; GARCIA et al., 2011). Vale ressaltar que isolados resistentes à oxacilina e cefoxitina que se apresentem negativos para *mecA*, devem ser submetidos ao PCR para *mecA*_{LGA251}. Estudos futuros devem mostrar se há diferenças na capacidade de disseminação entre seres humanos de *S. aureus* e MRSA ST130 (CUNY et al., 2011).

Os resultados apresentados representam um grande desafio para nosso grupo de pesquisa.

A tabela abaixo apresenta as porcentagens dos tipos de cassette encontrados em cada grupo de *Staphylococcus* avaliados por região geográfica. Os valores destacados representam os tipos de cassette predominantes nas regiões estudadas (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem dos tipos de cassette detectados nas espécies de *Staphylococcus* e nas regiões estudadas.

Espécie	Tipo de cassette	Regiões			
		Rio Claro	Piraí	Paracambi	Seropédica
		% (n=78)	% (n=23)	% (n=19)	% (n=25)
ECN (145)	SCCmec I	10,3	0	10,5	8
	SCCmec II	2,6	4,3	10,5	4
	SCCmec III	0	26,1	0	8
	SCCmec IV	0	0	5,3	4
		% (n=33)	% (n=3)	% (n=5)	% (n=10)
ECP (51)	SCCmec I	0	0	20	20
	SCCmec II	6	0	0	0
	SCCmec III	1,3	0	0	10
	SCCmec IV	0	0	0	30
		% (n=14)	% (n=16)	% (n=5)	% (n=3)
<i>S. aureus</i> (38)	SCCmec I	28,6	0	0	0
	SCCmec II	14,3	6,2	0	0
	SCCmec III	7,1	0	0	0
	SCCmec IV	0	0	0	33,3
		% (n=6)	% (n=5)	% (n=1)	% (n=0)
<i>S. intermedius</i> (12)	SCCmec I	0	40	0	0
	SCCmec II	0	20	0	0
	SCCmec III	0	0	0	0
	SCCmec IV	0	0	0	0
		% (n=4)	% (n=0)	% (n=0)	% (n=0)
SIG (4)	SCCmec I	0	0	0	0
	SCCmec II	0	0	0	0
	SCCmec III	75	0	0	0
	SCCmec IV	0	0	0	0

O cassette tipo I foi o de mais ampla distribuição entre as regiões estudadas, justificado a alta resistência aos beta-lactâmicos encontrada neste trabalho, uma vez que este tipo de cassette, assim como o cassette tipo IV contém o gene *mecA* como o único determinante de resistência, causando resistência apenas a esta classe de antimicrobianos (ZETOLA et al., 2005; BOYLE-VAVRA et al., 2007).

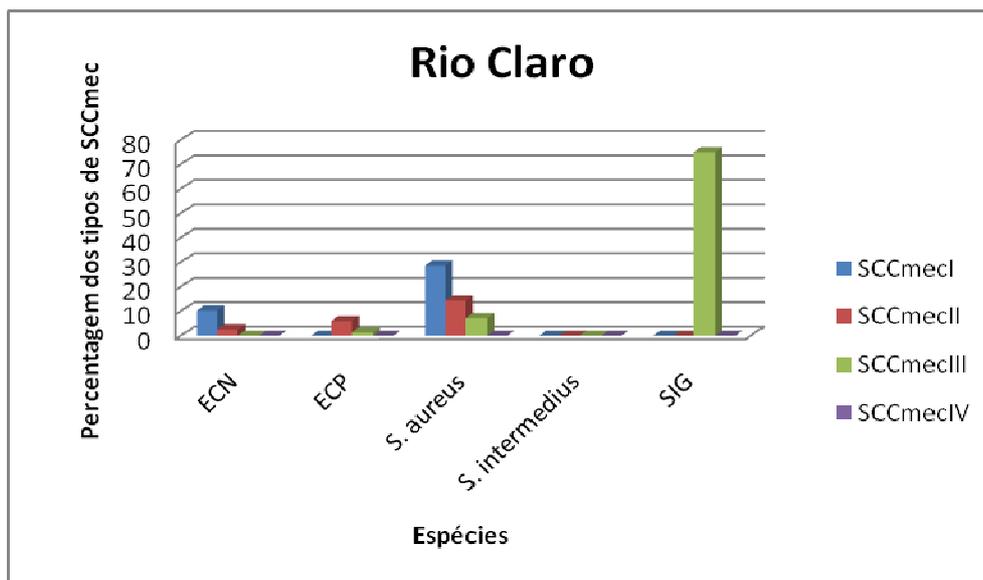


Figura 19. Percentagem dos tipos de cassette encontrados nas espécies de *Staphylococcus* na região de Rio Claro.

Na região de Rio Claro foi observada predominância do cassette tipo I, os isolados do grupo SIG apresentaram apenas cassette tipo III (Figura 19).

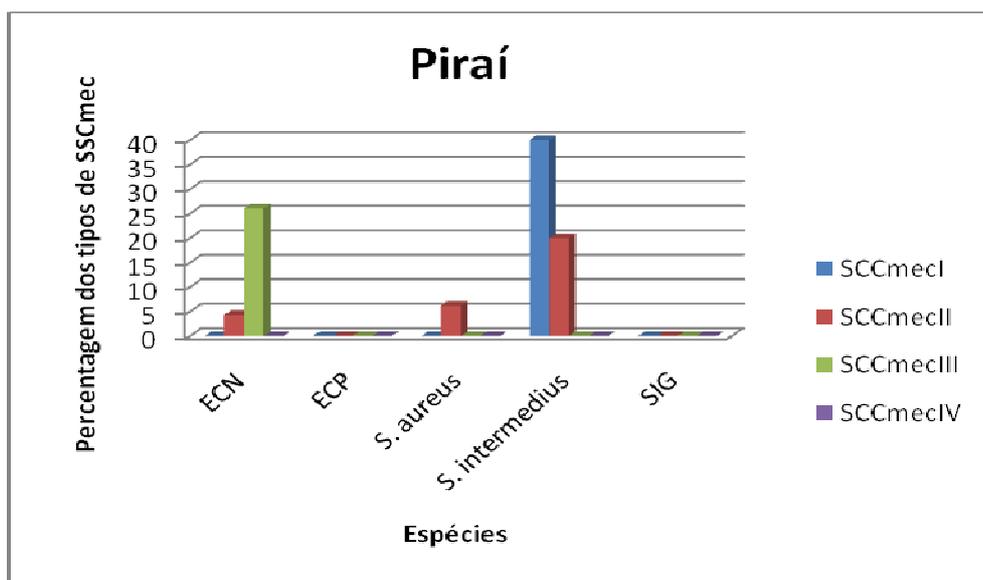


Figura 20. Percentagem dos tipos de cassette encontrados nas espécies de *Staphylococcus* na região de Piraí.

Na região de Piraí foram detectados os cassetes I, II e III. Onde o I manifesta-se com 40% em *S. intermedius* e o II com 20% nesta mesma espécie. Já o cassette tipo III apresenta-se com 26,08% em ECN (Figura 20). Os tipos de cassette II e III contêm múltiplos determinantes para resistência, como plasmídeos integrados e transposons, e são responsáveis pela multi-resistência normalmente encontrada em cepas de origem hospitalar. Devido ao seu maior tamanho, a transfência horizontal dos SCCmec tipos II e III é mais difícil quando comparados com o tipo IV, e a disseminação destes elementos ocorre principalmente como resultado da pressão seletiva da exposição a antibióticos (ZETOLA et al., 2005; BOYLE-VAVRA et al., 2007).

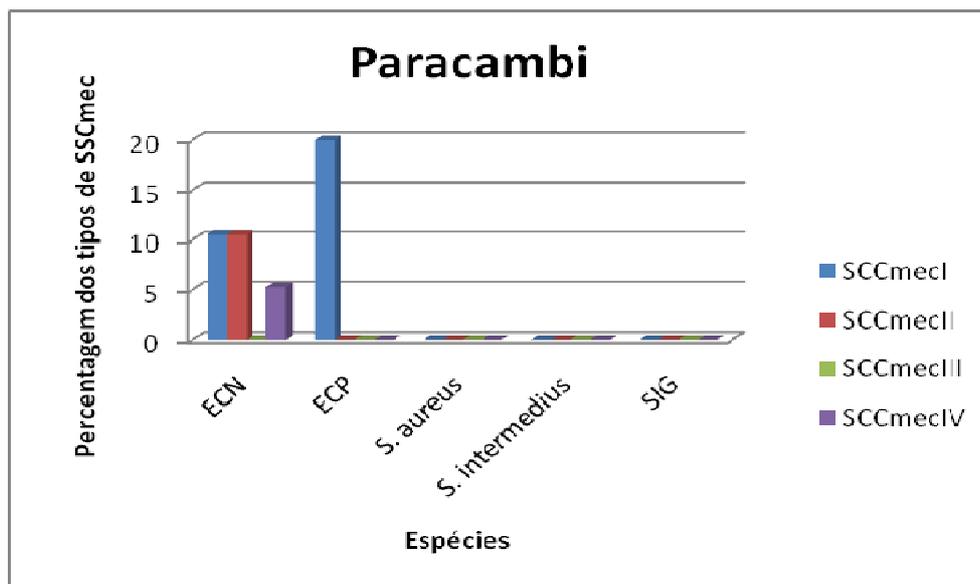


Figura 21. Percentagem dos tipos de cassete encontrados nas espécies de *Staphylococcus* na região de Paracambi.

Em Paracambi, aparecem apenas os tipos de cassete I, II e IV, sendo o tipo I com 20% para ECP e 10,52% para ECN; o tipo II com 10,52% e o tipo IV com apenas 5,4%, ambos para ECN (Figura 21).

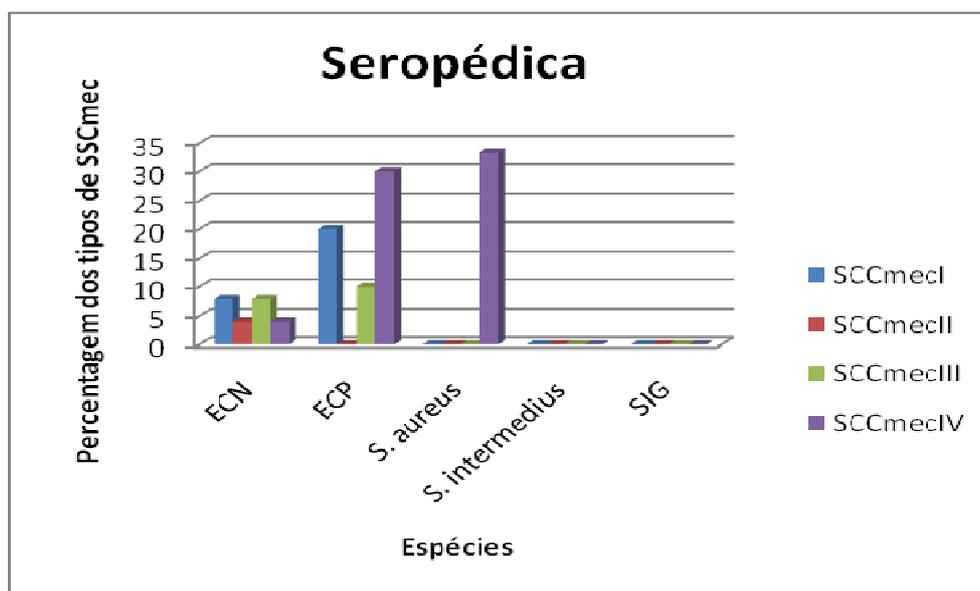


Figura 22. Percentagem dos tipos de cassete encontrados nas espécies de *Staphylococcus* na região de Seropédica.

No município de Seropédica predominaram os tipos de cassete I e IV, em que o tipo I apresentou 20% para ECP e o tipo IV apresentou 33,3% para *S. aureus* e 30% para ECP (Figura 22). Devido ao seu menor tamanho e ausência de outros genes de resistência, as cepas cassete SCCmec tipo IV são provavelmente mais móveis, conferindo vantagem fora da pressão relacionada a antibióticos em ambiente hospitalar, possibilitando sua rápida disseminação na comunidade (COHEN, 2007).

Vale ressaltar que a toxina leucocidina PVL aparece mais frequentemente em SCCmec tipo IV, a qual ataca a membrana das células de defesa do hospedeiro, devido à atividade

sinérgica de duas proteínas, LuKS e LuKF, resultando em necrose tecidual e destruição de leucócitos, através da formação de poros na membrana celular. Cepas de MRSA de origem comunitária tem sido associadas à pneumonia necrosante e infecções cutâneas necrotizantes, devida a presença dessa toxina (BOYLE-VAVRA et al., 2007). No entanto, a regra para toxina PVL na patogênese do *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina não está completamente elucidada, mas parece ser o fator de risco para infecções graves de pele e partes moles (HAGEMAN et al., 2006).

5.2.2.3. Detecção Genotípica e Fenotípica da Produção de betalactamases

O presente estudo buscou correlacionar a presença de genes reguladores da produção de enzimas β -lactamases (genes *blaZ*) com o fenótipo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos de *Staphylococcus* spp. isolados, com o intuito de verificar a ocorrência desse possível mecanismo de resistência antimicrobiana.

A figura 23 ilustra o teste de produção de betalactamase realizado com o disco de nitrocefim.

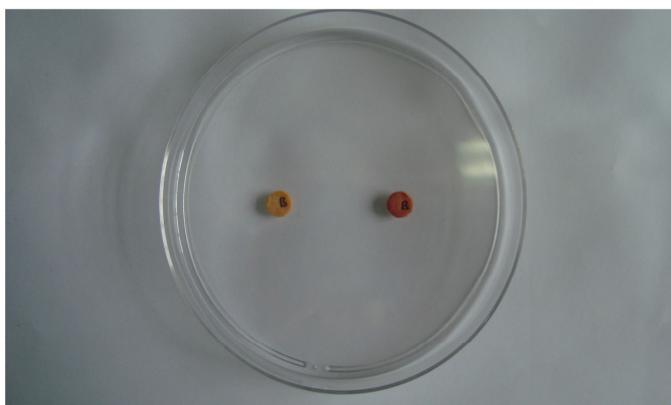


Figura 23. Teste de produção de betalactamase, No disco à direita, observa-se prova positiva, onde a ruptura do anel beta lactâmico foi evidenciada pela produção da cor vermelha. A cor amarela no disco indica resultado negativo.

As figuras abaixo ilustram os genes do sistema *blaZ* amplificados em reações de PCR.

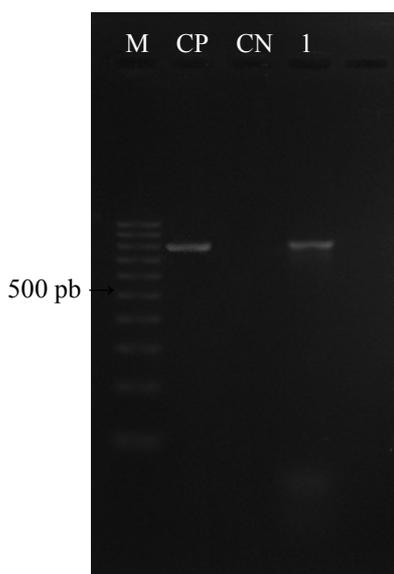


Figura 24. Gel de produto de PCR do gene *blaZ* (861 pb) de *Staphylococcus* spp. M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, CN: controle negativo e 1: isolado positivo.

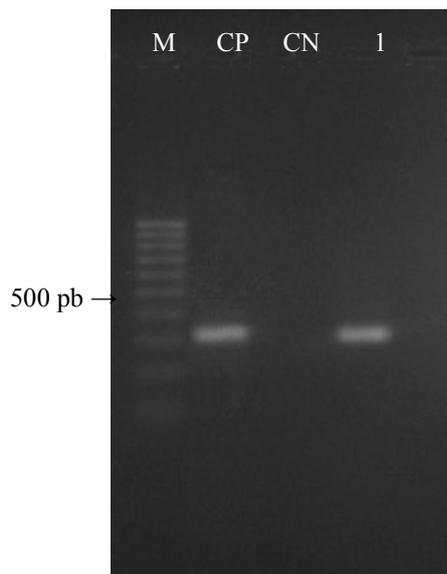


Figura 25. Gel de produto de PCR do gene *blaI* (331 pb) de *Staphylococcus* spp. M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, CN: controle negativo e 1: isolado positivo.

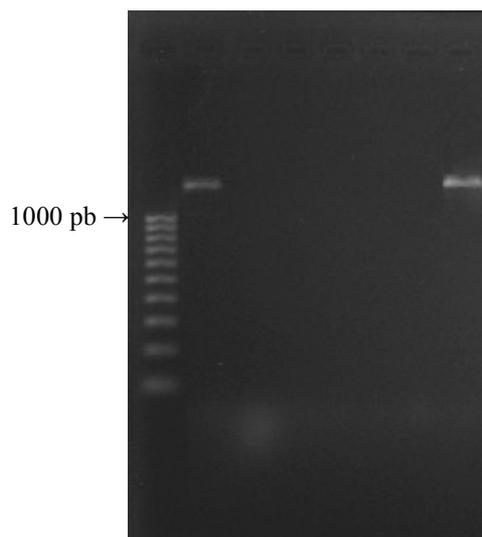


Figura 26. Gel de produto de PCR do gene *blaRI* (1566 pb). de *Staphylococcus* spp. M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, N: isolados negativos, CN: controle negativo e 1: isolado positivo.

A tabela do Anexo IV apresenta os 91 perfis encontrados a partir da sistematização dos dados fenotípicos de resistência pelos testes AS, DSO, DSC alinhados a presença dos genes *mecA* e do complexo *bla*.

Foi considerado um possível envolvimento de β -lactamases como possível mecanismo de resistência à oxacilina nestes isolados por serem *mecA*-negativos e apresentaram-se fenotipicamente resistentes à oxacilina. Os genes *blaI* e *blaRI* atuam como componente reguladores da síntese da β -lactamase. O gene *blaI* está localizado em uma região entre os genes reguladores *blaRI* e *blaZ*. A ligação do antibiótico β -lactâmico ao componente de membrana BlaRI promove um sinal que é transmitido através da membrana para o citoplasma da célula. Este sinal é responsável pela remoção do componente repressor (*blaI*) localizado na região entre os genes *blaRI* e *blaZ*, permitindo assim a transcrição do gene *blaZ* e conseqüente produção da enzima β -lactamase determinando o fenótipo de resistência (LEWIS; DIKE, 2005). O gene *blaZ* foi detectado em 5,2% (13/250) dos isolados, sendo que nestes, todo o sistema *blaZ-blaI- blaRI* foi detectado em 23,1% (3/13) dos isolados. Dos *Staphylococcus* spp. positivos para o gene *blaZ*, apenas dois foram positivos para a prova do disco de nitrocefina. Apenas um entre os 13 isolados foi *blaZ-blaI* positivo, *mecA* negativo e fenotipicamente resistente à oxacilina. Este resultado aponta para o provável envolvimento de outros mecanismos de resistência, tais como, outras classes de PBPs (por exemplo, PBP3 e PBP4), e para o estudo do gene homólogo *mecA*_{LGA251}.

6. CONCLUSÕES

- O grupo *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (58%, 145/250) foi prevalente dentre os estafilococos identificados;
- Dentre as espécies coagulase-positivas identificadas, *S.aureus* foi a espécie prevalente (36,2%, 38/105);
- Os isolados apresentaram elevada resistência à penicilina e à ampicilina, tendo a gentamicina, enrofloxacina, a associação sulfametoxazol-trimetoprim e cefalotina mostrado maior eficácia frente a estes;
- Foi observada uma grande variação quanto ao perfil da resistência antimicrobiana das amostras de *Staphylococcus* spp.;
- Os antibiogramas prevalentes para ECN foram de sensibilidade a todos os antibióticos (perfil 1; 9,0%), resistência à ampicilina e penicilina (perfil 3; 8,3%) e resistência à tetraciclina e penicilina (perfil 42; 7,6%);
- Os antibiogramas prevalentes para ECP foram de resistência a tetraciclina (perfil 10; 9,8%), resistência à cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 14) e resistência a tetraciclina, cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 35), ambos com 7,8%.
- Os antibiogramas prevalentes para *S. aureus* foram de resistência à tetraciclina (perfil 10; 18,4%), resistência à penicilina (perfil 5; 13,1%), e resistência à tetraciclina, gentamicina, cefalotina, ampicilina, penicilina e sulfametoxazol+trimetoprim (perfil 12; 10,5%).
- Os antibiogramas prevalentes para *S. intermedius* foram de resistência a todos os antibióticos testados (perfil 2; 25%), resistência à tetraciclina, ampicilina e penicilina (perfil 4), e resistência à tetraciclina, cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 15), ambos com 16,6% de frequência.
- O grupo SIG apresentou antibiogramas distintos pertencentes aos perfis 2, 3, 10 e 37, de resistência a todos os antibióticos, à ampicilina e penicilina, à tetraciclina e à gentamicina, cefalotina e penicilina, respectivamente.
- No município de Rio Claro, os antibiogramas de resistência à ampicilina e penicilina (perfil 3) e de resistência à tetraciclina (perfil 10) são os mais distribuídos entre os grupos de *Staphylococcus* spp. estudados. Quantitativamente, o perfil de resistência a penicilina e tetraciclina (perfil 42) foi prevalente entre os perfis estudados ;
- No município de Pirai, houve predominância do antibiograma de sensibilidade a todos os antibióticos (perfil 1).
- No município de Paracambi o perfil de multiresistência à tetraciclina, gentamicina, enrofloxacina, cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 15) distribuiu-se em todos os grupos estudados;
- No município de Seropédica, o antibiograma de resistência à tetraciclina (perfil 10) aparece em ECN, ECP e *S. aureus*;
- Foram obtidos 54 perfis de resistência para os oito testes fenotípicos realizados, evidenciando a heterogeneidade da resistência dos *Staphylococcus* spp. à oxacilina e cefoxitina;
- O teste de Difusão em Disco Simples com Cefoxitina é o de melhor desempenho quando comparado aos testes padrão, na predição da resistência aos betalactâmicos;
- Todos os isolados estudados foram negativos para o gene *mecA*, mesmo aqueles que apresentaram resistência fenotípica nos testes preconizados;
- Os genes *mecI* e *mecRI* foram detectados igualmente em 11,6% (29/250) dos *Staphylococcus* spp.;

- Até o momento, em nossos estudos, não tem sido observada correlação entre os perfis fenotípicos de resistência e a detecção gênica do gene *MecA*;
- Em estudos futuros serão investigados os processos de regulação e transcrição gênica do gene *mecA*, bem como o produto dessa expressão, no caso a proteína de baixa afinidade PBP2a, além da busca por genes homólogos;
- Apesar da não detecção de isolados *mecA* positivos, foram detectados os quatro tipos de cassete nos isolados estudados;
 - O cassete tipo I foi o de mais ampla distribuição entre as regiões estudadas;
 - No município de Rio Claro foi observada predominância do cassete tipo I, os isolados do grupo SIG apresentaram apenas cassete tipo III;
 - No município de Pirai foram detectados os cassetes I (40% em *S. intermedius*), II (20% em *S. intermedius*) e III (26,08% em ECN);
 - No município de Paracambi, aparecem apenas os tipos de cassete I (20% para ECP e 10,52% para ECN) e II (20% para ECP);
 - No município de Seropédica predominaram os tipos de cassete I (20% para ECP) e IV (33,3% para *S. aureus* e 30% para ECP);
 - O gene *blaZ* foi detectado em 5,2% (13/250) dos isolados;
 - O sistema *blaZ-blaI-blaRI* foi detectado em 23,1% (3/13) dos isolados;
 - Apenas um entre os 13 isolados foi *blaZ-blaI* positivo, *mecA* negativo e fenotipicamente resistente à oxacilina;
 - Dos isolados positivos para o gene *blaZ* (13/250), apenas dois foram positivos para a prova do disco de nitrocefim;
 - Mais estudos serão realizados para refinar a correlação genótipo x fenótipo, principalmente em relação à resistência aos beta-lactâmicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canidea gives possible evidence for hostspecificity and co-evolution of bacteria and hosts. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1343–1347, 2001.
- ADAMS, H. R. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 1033p.
- AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F.L.A. & BARROS, L. S. S. Incidence of *Staphylococcus* sp. in the water used by dairy farms in the State of São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 14884-900, oct. 2003.
- ANDRADE, M. A.; DIAS FILHO, F. C.; MESQUISTA, A. J. & ROCHA, P. T. Sensibilidade “in vitro” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, v.1 n.1 p.53-57, 2000.
- BANNERMAN, T.M. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v. 1, p. 384-404, 2003.
- BANNOEHR, J.; BEN ZAKOUR, N. L.; WALLER, A. S.; GUARDABASSI, L.; THODAY, K. L.; VAN DEN BROEK, A. H. AND FITZGERALD, J. R. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. **Journal of Bacteriology**. n. 189, p. 8685–8692, 2007.
- BANNOEHR, J.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A. & FITZGERALD, J. R. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 469-471, 2009.
- BARBERIO, A.; GIETL, H. & DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Napgama**, v. 5, n. 1, p. 10, 2002.
- BAREILLE N., BEAUDEAU F., BILLION S., ROBERT A. & FAVERDIN P. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. **Livestock Production Science**, n. 83, p. 53-62, 2003.
- BEAUDEAU F., FOURICHON C., SEEGER H. & BAREILLE N. Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 53, p. 43-54, 2002.
- BES, V.; GUERIN-FAUBLEE, H.; MEUGNIER, J.; ETIENNE & FRENEY, J. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. **Veterinary Microbiology**, v.71, p. 287–294, 2000.
- BLACK, J. G. Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 370-419, 2002.

BLONDEAU, J. M.; HANSEN, G.; BORSOS, S.; IRVINE, L. & BLANCO, L. In vitro susceptibility of 4903 bacterial isolates of gemifloxacin - an advanced fluoroquinolone. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 9, p. 44-49, 2003.

BOOTH, N., McDONALD, L.E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 997 p.

BOYLE-VAVRA, S. & DAUM, R. S. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. **Labolatory Invetigation Journal** , n. 87, p. 3-9, 2007.

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

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 490. Institui Grupo de Trabalho para concluir os estudos de avaliação de risco à saúde humana decorrente do uso da Avoparcina na área veterinária, integrado por especialistas representantes dos órgãos e entidades relacionados. **Diário Oficial da União**, 30 jun. 1998 (a).

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 819. Dá conhecimento público às conclusões do Grupo de Trabalho sobre a Avoparcina. **Diário Oficial da União**, 19 out 1998 (b).

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 5. Cria Grupo de Trabalho sobre Medicamentos Veterinários em Alimentos. **Diário Oficial da União**, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 38. Proíbe a fabricação, a importação e a comercialização de cloranfenicol, de nitrofuranos e de produtos que contenham estes princípios ativos, para uso em preparações de insumos utilizados na pecuária nacional. **Diário Oficial da União**, 9 maio 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 27. Adota o Regulamento Técnico Mercosul sobre critérios para definição de prioridades aos Programas de Controle de Resíduos de Drogas Veterinárias em Produtos de Origem Animal destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, 30 jun 2003 (a).

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 253. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. **Diário Oficial da União**, 18 set. 2003 (b).

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 13. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização. **Diário Oficial da União**, 01 dez 2004.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T. & VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 51, n. 2, p.129-135, 2000.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S. & CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiros de Medicina Veterinário e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p.10-17, 2001.

BRITO, M. A.; BRITO, V. P.; RIBEIRO, M. T. & VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção de intramamária em rebanhos leiteiros: Exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 129–135, 2002.

BURTON, J. L. & ERSKINE, R. J. The Veterinary Clinics - Food Animal Practice, v. 19, p. 1-45, 2003.

BUSATO, A.; TRACHSEL, P.; SCHALLIBAUM, M. & BLUM, J. W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 44, p. 205-220, 2000.

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

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. & SENA, M. J. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 29, p. 347-349, 2000.

CAUWELIER, B.; GORDTS, B. & DESCHEEMAECCKER, P. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal Microbiology Infections Disease**, v. 23, p. 389-392, 2004.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Revista Clinical Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CHAMBERS, H. F. Penicillin – Binding Protein – Mediated Resistance in Pneumococci and Staphylococci. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 2, p. 353-359, 1999.

CHOPRA, I. & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CLARKE, S. R. & DYKE, K. G. H. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus* β -lactamase operon are inducible. **Microbiology**, v. 147, p. 803-810, 2001.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards-Third Edition*, M31-A3. CLSI, Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 20th Informational Supplement, M100-S20. CLSI, Wayne, PA **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2011.

COHEN, P. R. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management and prevention. **International Journal of Dermatology**, v. 46, p. 1-11, 2007.

COELHO, S. M. O.; MENEZES, R. A.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P. & SOUZA, M. M. S. Mapeamento do Perfil de Resistência e Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Revista Ciência Rural**, v. 37, p. 195-200, 2007.

COELHO, S. M. O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C.; DEMO, M.; BOGNI, C. & SOUZA, M. M. S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 369-374, 2009.

CORREIA, I. Resistência a drogas antimicrobianas de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* de leite mastítico bovino. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2003. 58p.

COSTA, E. O.; RAIÁ, M. R.; WATANABE, E. T.; GARINO, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios. *Napgama*, v.3 n.4 p.14-17, 2000.

CULEBRAS, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; BETRIU, C.; REDONDO, M. & PICAZO, J.J. Macrolide and tetracycline resistance and molecular relationships of clinical strains of *Streptococcus agalactiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.5, p.1574–1576, 2002.

CUNHA, M. L. R. S.; LOPES, R. S.; RUGOLO, C. A. M. & CHALITA, L. V. A. S. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 48, p. 463–478, 2002.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMINGER, B. & WITTE, W. Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

DANCER, S. J. The problem with cephalosporins. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 48, p. 463–478, 2001.

DAUM, R. S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; HUSSAIN, F.; MONGKOLRATTANOTHAI, K., JAMKLANG, M. & BOYLE-VAVRA, S. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. **Journal of Infectious Disease**, v. 186, p.1344-1347, 2002.

DEURENBERG, R. H. & STABBERINGH, E. E. The molecular evolution of hospital-and community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Molecular Medicine**, v. 9, p. 100-115, 2009.

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M. & BAELE, M. *Staphylococcus intermedius* sp. nov., a coagulase positive species from animals. **International Journal of Systematic and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

DEVRIESE, L. A.; HERMANS, K.; BAELE, M. AND HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 206–207, 2008.

DESCLOUX, S., ROSSANO, A. AND PERRETEN, V. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1818–1823, 2008.

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; SCHUKKEN, Y. H.; SARGEANT, J. M.; TIMMS, L. L.; DUFFIELD, T. F.; KEEFE, G. P.; KELTON, D. F.; LISSEMORE, K. D. & CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, p. 75-89, 2004.

Donatele, D. M. & Motta, O. V. Folly MM. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Núcleo de Apoio à Pesquisa da Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v. 5, p. 3-6, 2002.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, <http://www.cnpgl.embrapa.br/>. Acessado em: 4 de Janeiro de 2012.

ERSKINE, R. 2000. Antimicrobial drug use in bovine mastitis. Pages 712–734 in Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. J. F. Prescott, J. D. Baggot, and R. D. Walker, ed. Iowa State University Press, Ames.

ERSKINE, R. J.; WALKER, R. D.; BOLIN, C. A.; BARTLETT, P. C. & WHITE, D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a sevenyear period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1111-1118, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 2.788/1998. Amending Council Directive No 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs as regards the withdrawal of authorisation for certain growth promoters. Off. **Journal European Communities**, 23 dec. 1998;.

FAO. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Report of the 60th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 2003 Feb 6-12; Geneva; Switzerland. FAO Food and Nutrition Paper 41/15. Rome, 2004.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 66th meeting (Residues of veterinary drugs). 2006 Feb 22-28; Rome; Italy. Summary and Conclusions. Rome, March 2006.

FRAZIER, W. C. & WESHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B. & MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/ARQUIVOS/V72_2/freitas.PDF>. Acesso em: 12 dez. 2011

FONSECA, L. F. L. & SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo : Lemos Editorial, 2000, 175p.

FONTANA, V. L. D. S.; GIAMIMI, M. J. S. M.; LEITE, C.Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M. & STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às grogas antimicrobianas e detecção do agente da beta-lactamase e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 4, p. 552-559, 2010.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F. & WEISSFELD, A.S. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and Similar Organisms. In: **Bayley & Scott's Diagnostic Microbiology**, 11 ed. Mosby: USA, 2002.

FUDA, C.; FISHER, J. & MOBASHEREY, S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 62, p. 2617-1633, 2005.

GARCIA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M. T.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; GIRVAN, E K.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HILL, R. L.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J. & HOLMES, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595-603, 2011.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A.; REBUELTO, M.; FERMEPIN, M.R. & DE TORREST, R. A. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **American Dairy Science**, v.85, p.1913-1917, 2002.

GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G. & CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livestock Production Science**, v. 88, p. 251-261, 2004.

GOH, S. H.; POTTER, S.; WOOD, J. O.; HEMMINGSEN, S. M.; R EYNOLDS R. P. & CHOW, A. W. HSP60 gene Sequences as Universal Targets for Microbial Species

Identification: Studies with Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 818-823, 1996.

GOLEMI-KOTRA, D.; CHA, J. Y.; MEROUEH, S. O.; VAKULENKO, S. B. & MOBASHERY, S. Resistance to β -lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 18419-18425, 2003.

GODDEN, S. M.; JANSEN, J. T.; LESLIE, K. E. et al. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 38-42, 2002.

GRAHAM, J. C. Comparison of PCR detection of *mecA* with methicillin and oxacillin disc susceptibility testing in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 111-113, 2000.

GREGORY, P. D.; LEWIS, R. A.; CURNOCK, S. P. & DYKE, K. G. H. Studies of the repressor (BlaI) of β -lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 1025-1037, 1997.

GUARDABASSI, L., S. SCHWARZ, AND D. H. LLOYD. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 54, p. 321-332, 2004.

HACKBARTH, C. J. & CHAMBERS, H. F. *blaI* and *blaR1* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1144-1149, 1993.

HAGEMAN, J. C.; UYEKI, T. M.; FRANCIS, J. S.; JERNIGAN, D. B.; WHEELER, J. G.; BRIDGES, C. B.; BARENKAMP, S. J.; SIEVERT, D. M.; SRINIVASAN, A.; DOHERTY, M. C.; MCDUGAL, L. K.; KILLGORE, G. E.; LOPATIN, U. A.; COFFMAN, R.; MCDONALD, J. K.; MCALLISTER, S. K.; FOSHEIM, G. E.; PATEL, J. B. & MCDONALD, L. C. Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 894-899, 2006.

HARDY, B. The issue of antibiotic use in the livestock industry: what have we learned? **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 129-147, 2002.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T. & TENOVER, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 40, p. 135-136, 2001.

HISATA, K.; KUWAHARA-ARAI, K.; YAMANOTO, M.; ITO, T.; NAKATOMI, Y.; CUI, L.; BABA, T.; TERASAWA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; YAMASHIRO, Y. & HIRAMATSU, K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3364-3372, 2005.

HUDOME, S. M. & FISHER, M. C. Nosocomial infections in the neonatal intensive care. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 303-7, 2001.

HUXLEY, J. N.; GREENT, M. J.; GREEN, L. E. & BRADLEY, A. J. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 551–561, 2002.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASDA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; & HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1323-1336, 2001.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X. X.; YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. Insights on antibiotics resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 1, p. 41-52, fev. 2003.

ITO, T.; MA, X. X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2637-2651, 2004.

JANSEN, M. D.; BOX, A. T. A. & FLUIT, A. C. *SCCmec* Typing in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of Animal Origin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 136, 2009.

JEVONS, M. P. “Celbenin”- resistant staphylococci. **British Medical Journal**, v. 124, p. 124-125, jan. 1961.

KARAHAN, M. AND CETINKAYA, B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. **Veterinary Journal**, v. 174, p. 428–431, 2006.

KARAHAN, M. & CETINKA, Y. A. B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 2, p. 428-431, 2007.

KATAYAMA, Y.; ITO, T. & HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

KLUYTMANS-VANDEN BERGH, M. F. Q. & KLUYTMANS, J. A. J. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 12, n. 1, p. 9-15, 2006.

KOHNER, J. P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D. & COCKERILL, F. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p.2952-2961, 1999.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X. X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B. N.; ETIENNE, J. & HIRAMATSU, K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome

mec type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr* and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 264-74, 2007.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C. & WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**, 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 1488p, 2008.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA T.; YUZAWA, H. I.; KOBAYASHI, L.; CUI, A.; OGUCHI, K.; AOKI, Y. & NAGAI, J. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New England Journal Medicine**, v. 319, p.157-61, 2001.

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

LEITER, T.(2000) Cephalosporins. <http://www.fhsu.edu/nursing/otitis/cephalosporins.html>
Acessado em dezembro de 2011

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

LEWIS, R. A.; CURNOCK, S. C. & DYKE, K. G. H. Proteolytic cleavage of the repressor (BlaI) of β -lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 178, p. 271-275, 1999.

LEWIS, R. A. & DIKE, K. G. H. *mecI* repress synthesis from the β -lactmase operon of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 5, p.139-144, 2005.

LI, X. Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S. & ADEWOYE, L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin . **Veterinary Microbiology**, v. 121, p.197-214, 2007.

LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E. & SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters of Applied Microbiology**, v. 31, p. 42-45, 2000.

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

LI, X. Z. AND NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v. 64, p. 159-204, 2004.

LIM, J. A.; KWON, A. R.; KIM, S. K.; CHOMG, Y.; LEE, K. & CHOI, E.C. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in Korean hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p.489-495, 2002.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. & WHITMAN, W. B.. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf, p. 1-32, 2009.

MA, X. X.; ITO, T.; TIASANSITORN, C.; JAMKLANG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. & HIRAMATSU, K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1147-52, 2002.

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G. & MARINS, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 278-282, 2008.

MARINHO, M.; BALDINE, S.; SILVA, A. V.; LISTONI, F. J. P. & LANGONI, H. Ação *in vitro* da enrofloxacin em microorganismos isolados de leite mastítico da região de Botucatu-SP. / *The in vitro action of enrofloxacin on the microorganisms isolated from mastitic bovine milk*. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 18, n. 2, p. 120-124, 2002.

MARTINS, R. P.; MARQUES, M. R. H. & NETO, A. C. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 13, p. 104-110, 2006.

MCKINNEY, T. K.; SHARMA, V. K.; CRAIG, W. A. & ARCHER, G. L. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. **Journal Bacteriology**, v. 183, n. 23, p. 6862-8, 2001.

MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E. S.; KIM, M. N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y. S. & KOO, H. S. Phenotypic and Genetic Antibiogram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1176-1185, 2007.

MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; VILLA, R.; BOETTCHER, P. & CARLI, S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2973-2976, 2006.

MORSE, S.I. Estafilococos. In: Braude AI, Davis CE, Fierer J, editors. **Microbiologia Clínica**. Buenos Aires: Panamericana, p. 313-20, 1984.

MURAKAMI, K. W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H. & WATANBE, S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p.2240-2244, 1991.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JUNIOR, O. D. & AMARAL, L. A. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 581-588, 2000.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D. & OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p.1-4, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **TaxBrowser**, Washington, 12 dez. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>. Acesso em: 10 dez. 2011.

NEVES, M. C.; ROSSI, O. D. J.; ALVES, E. C. C. & LEMOS, M. V. F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivo do Instituto de Biologia de São Paulo**, v. 74, n. 3, p. 207-213, 2007.

NUNES, M. T. & D'ANGELINO, J. L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, p. 57-61, 2007.

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRIÇO, C.; & DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p.3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T. & BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011. (a)

OLIVEIRA, J. M. B.; VANDERLEI, D. R.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A.; JÚNIOR, J. W. P. **Análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana de *staphylococcus* spp. isolados de vacas com mastite subclínica do agreste do Estado de Pernambuco.** *Vet. e Zootec.* **18(4 Supl. 3)**: IX Congresso Brasileiro Buiatria. 04 a 07 de Outubro de 2011. Goiânia - Goiás, Brasil, 2011. (b)

PALAZZO, I.C. & DARINI, A.L. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. **Microbiology Letters**, v. 257, p. 299–305, 2006.

PALMA M.; HAGGAR A. & FLOCK J. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 2840–2845, 1999.

PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; COELHO, S.M.O.; PRIBUL, B.R. & SOUZA, M.M.S. Suscetibilidade à azitromicina de isolados bacterianos de processos infecciosos em cães e gatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p.153-159, 2009.

PEDERSEN, L. H.; AALBAEK, B.; RONTVED, C. M.; INGVARTSEN, K. L.; SORENSEN, N. S.; HEEGAARD, P. M. & JENSEN, H. E. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 156- 164. 2003.

PEREIRA, I. A. **Processos infecciosos de animais de companhia: uma abordagem sobre fatores de virulência em *Staphylococcus* spp. e resistência à azitromicina e oxacilina como modelo de estudo.** 166 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

PERSSON WALLER, K.; COLDITZ, I.G.; LUN, S. & OSTENSSON, K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 75, p. 247-155, 2003.

PETINAKI, E.; ARVANITI, A.; DIMITRACOPOULOS, G. & SPILIOPOULOU, I.; Detection of *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes among clinical isolates of methicilin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p.297-304, 2001.

PINHEIRO DE SÁ, M. E.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; CASSIANO, V. & LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 320-326, 2004.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V. & HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001: prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2433-2441, 2004.

PYORALA, S. & TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 3-8, 2009.

RADOSTITS, O. M.; Blood, D. C. & Gay, C. C. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1737 p, 2002.

REINOSO, E. B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLER, C.; BOGNI, C. & ZSCHÖCK M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, v. 163, p. 314-22, 2006.

REIS, A.; CORDEIRO, J. C. R.; MACHADO, A. M. O. & SADDER, H. S. In vitro antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 243-51, Brasília, 2001.

REIS, S. R.; SILVA, N. & BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF, J. R. W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R. & BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 3, p. 287-90, 2003.

ROBINSON, D. A. & ENRIGHT, M. C. Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3926-3934, 2003.

ROSATO, A. E.; KREISWIRTH, B. N.; GRAIG, W. A.; EISNER, W. & CLIMO, M. W.; AECHER, G. L. *mecA-BlaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p.1463-1466, 2003.

ROWLAND, S. J. & DYKE, K. J. Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. **Molecular Biology**, v. 4, p. 965-975, 1990.

RUPP, R.; BEAUDEAU, F. & BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 99-111. 2000.

SABOUR, P. M.; GILL, J. J.; LEPP, D.; PACAN, J. C.; AHMED, R.; DINGWELL, R. AND LESLIE, K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3449-3455, 2004.

SAKAI, H. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.1 2, p. 5739-5744, 2004.

SANTOS, F. G. B.; MOTA, R. A.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; SOUZA, H. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; JOHNER, J. M. Q.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. & LEALALBINO, T. C. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Nappama**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R.L.; BALLOU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E. & KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45. 2004.

SANTOS, C. D. M.; LEAL, G. S. & ROSSI, D. A. Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia – MG. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 83-88, 2006.

SASAKI, T., K. KIKUCHI, Y. TANAKA, N. TAKAHASHI, S. KAMATA, AND K. HIRAMATSU. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **c**, v. 45, p. 2770–2778, 2007.

SHAW, K. J.; RATHER, P. N.; HARE, R. S. & MILLER, G. H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. **Review Microbiology**, v. 57, p. 138-163, 1993.

SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRLICH, R. & COLEMAN, D. C. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI encoding highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ* and *ccr* genes in human clinical clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 55, p. 3765–73, 2011.

SILVA, W. P.; SILVA, A. J.; MACEDO, M. R. P.; ARAÚJO, M. R.; MATA, M. M. & GANDRA, E. A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr

amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p.125-127, 2003.

SILVA, M. A. *Utilização de PCR Multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina*. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. M. O.; CUNHA, C. M. M.; OLIVEIRA, D. F. B.; MIRANDA, A. F. & SOUZA, M. M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1346-1350, 2008.

SOARES, L. C. **Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina**. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

SOL, J.; SAMPIMON, O. C.; SNOEP, J. J. AND SCHUKKEN, Y. H. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, Netherlands, v. 83, n. 2, p. 278-284, 2000.

SOMMERHAUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A. & FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 91-102, 2003.

SORDELLI, D. O.; BUZZOLA, F. R.; GOMEZ, M. I.; STEELE-MOORE, L.; BERG, D.; GENTILINI, E.; CATALANO, M.; REITZ, A. J.; TOLLERSRUD, T.; DENAMIEL, G.; JERIC, P. & LEE, J. C. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 846-850, 2000.

SOUZA, M. M. S., COELHO, S. M. O., PEREIRA, I. A., SOARES, L. C., PRIBUL, B. R., COELHO, I. S. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* species of animal origin. **Antibiotic Resistance**, 2012, *in press*.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4°. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 469-471p.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* mechanisms and modulation. **Scientific Program**, v. 85, n. 1, p. 57-72, 2002.

STAPLETON, P. D.; SHAH, S.; EHLERT, K.; HARA, Y. & TAYLOR, P. W. The beta-lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 153, p. 2093-2103, 2007.

STRAUB, J. A.; HERTEL, C. & HAMMES, W. P. A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 62, p.1150-1156, 1999.

SVILAND, S. & WAAGE, S. Clinical bovine mastitis in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, p. 65-78, 2002.

SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C.; WILLIAMS, P. P. & KILLGORE, G.; Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3818-3823, 2005.

THAKENOUCHE, T.; ISHII, C.; SUGAWARA, M.; TOKUE, Y. & OHYA, S. Incidence of various *gyr A* mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 39, p. 1414-1418, 1995.

TOKUE, Y.; SHOJI, S.; SATOH, K. & MOTOMYIA, M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 6-9, 1992.

TOPLEY, W. W. C. & WILSON, G. S. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: **Principles of Bacteriology, Virology and Immunity**. 6th ed. London: E. Arnold; 1976. p.764-801.

TYLER, J.W.; WILSON, R.C. & DOWLING, P. Treatment of subclinical mastitis. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 8:17-28, 1992.

VAN HOOVELS, L.; VANKEERBERGHEN, A.; BOEL, A.; VAN VAERENBERGH, K.; & DE BEENHOUWER, H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4609–4612, 2006.

YOU, I.; KARIYAMA, R.; ZERVOS, M. J.; KUMON, H. & CHOW, J. W. *In vitro* activity of arbekacin alone and in combination with vancomycin against gentamicin – and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, n. 1, p. 37-41, 2000.

WASHERA, P. & JOFFE, H. The “hospital superbug”: Social representations of MRSA. **Social Science & Medicine**, v. 63, n. 8 , p. 2141-2152, out. 2006.

WATTS, J. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. v.16 p.41-46, 1988.

WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J.; TRAUB-DARATZ, J.L.; WILLEY, B.M., MCGREER, A.J. & LOW, D.E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. **Jouranal of The American Vetenary Medicine Association**, v. 226, p. 580–583, 2005.

WELLER, T. M. A. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 15-22, 2000.

WHIST, A. C.; OSTERAS, O. & SOLVEROD, L. Clinical mastitis in norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4649–59, 2006.

WILKE, M. S.; LOVERING, A. L. & STRYNADKA, N. C. J. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 525–533, 2005.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V. AND RESENDE, F. D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 577-585, 2007.

ZHANEL, G. G.; KARLOWSKY, J. A.; SAUNDERS, M. H.; DAVIDSON, R. J. HANCOCK, R. E. W.; MCLEAN, I. & NICOLLE, L. E. Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 39, p. 489-495, 1995.

ZHANG, L.; GRAY, L.; NOVICK, R.P. & JI, G. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 277, p. 34736-34742, 2002.

ZENG, X.; KONG, F.; WANG, H.; DARBAR, A. & GILBERT, G.L. Simultaneous detection of nine antibiotic resistance-related genes in *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 204–209, 2006.

ZETOLA, N.; FRANCIS, J. S.; NUERMBERGER, E. L. & BISHAI, W. R. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a emerging threat. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 275-286, 2005.

ÍNDICE DE ANEXOS		Pág
Anexo I	<i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina classificados em antibiogramas através da técnica de difusão em disco.	64
Anexo II	Perfis de suscetibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp nos distintos testes fenotípicos.	66
Anexo III	Detecção dos genes <i>blaZ</i> e resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=250)	69
Anexo IV	Genes do sistema regulatório <i>mec</i> e fenótipo de resistência à oxacilina e cefoxitina em <i>Staphylococcus</i> spp. (n=250)	71

Anexo I

Staphylococcus spp. isolados de mastite bovina classificados em antibiótipos através da técnica de difusão em disco.

Antibiótipos	Resistência aos antimicrobianos**	Porcentagem nas espécies				
		ECN (145)	ECP (51)	S. aureus (38)	S. intermedius (12)	ECP (SIG) (4)
1	*	9,0%	4,0%	5,2%	8,3%	
2	TET, GEN, ENO, CFL, AMP, PEN, SUT	4,0%	2,0%	5,2%	25%	25,0%
3	AMP, PEN	8,3%	5,9%	2,6%	8,3%	25,0%
4	TET, AMP, PEN	4,1%	4,0%	2,6%	16,6%	
5	PEN	5,5%		13,1%		
6	AMP, SUT	1,3%		2,6%		
7	CFL, AMP	0,7%		2,6%		
8	AMP, PEN, SUT		5,9%	2,6%		
9	TET, GEN, ENO, CFL, PEN	0,7%	2,0%	2,6%		
10	TET	5,5%	9,8%	18,4%		25,0%
11	GEN		2,0%	2,6%		
12	TET, GEN, CFL, AMP, PEN, SUT	0,7%	4,0%	10,5%		
13	TET, GEN, AMP	0,7%		2,6%		
14	CFL, AMP, PEN	1,3%	7,8%	5,2%		
15	TET, GEN, ENO, CFL, AMP, PEN	2,0%	2,0%	10,5%	16,6%	
16	TET, CFL, AMP, PEN	0,7%		2,6%		
17	TET, GEN, CFL, AMP, PEN,	0,7%		2,6%	8,3%	
18	GEN, ENO, CFL, AMP, PEN, SUT			2,6%		
19	TET, GEN, ENO, AMP, PEN,			2,6%		
20	TET, AMP	3,4%				
21	TET, SUT	0,7%				
22	AMP	2,7%	5,9%			
23	TET, ENO, AMP, PEN, SUT	0,7%	4,0%			
24	PEN, SUT	2,0%				
25	TET, GEN, ENO, AMP, SUT	0,7%				
26	ENO, AMP, PEN	0,7%				
27	ENO, AMP	0,7%				
28	ENO, AMP, PEN, SUT	0,7%	2,0%			
29	TET, ENO, SUT	0,7%				
30	ENO, AMP, SUT	0,7%				
31	GEN, PEN	0,7%	2,0%			
32	TET, CFL, AMP, PEN, SUT	4,8%				
33	TET, AMP, SUT	0,7%				
34	CFL, PEN	2,7%				
35	TET, CFL, AMP, PEN	2,7%	7,8%			
36	ENO, PEN	0,7%				
37	GEN, CFL, PEN	0,7%				25,0%
38	TET, GEN, PEN	1,3%	2,0%			
39	TET, CFL, PEN, SUT	0,7%				
40	TET, CFL, PEN	1,3%				
41	GEN, ENO, CFL, PEN, SUT	0,7%				
42	TET, PEN	7,6%	4,0%		8,3%	
43	TET, PEN, SUT		2,0%			
44	TET, ENO, AMP, PEN	0,7%				
45	TET, ENO	0,7%				
46	CFL, AMP, PEN, SUT	1,3%				
47	TET, GEN, AMP, PEN	4,1%				
48	TET, AMP, PEN	2,7%				
49	GEN, ENO, CFL, AMP, PEN	1,3%				

Antibiotipos	Resistência aos antimicrobianos**	Porcentagem nas espécies				
		ECN (145)	ECP (51)	S. aureus (38)	S. intermedius (12)	ECP (SIG) (4)
50	SUT	1,3%				
51	TET, GEN, CFL, AMP, SUT	0,7%				
52	GEN, AMP, PEN	0,7%				
53	GEN, CFL, AMP, PEN	0,7%			8,3%	
54	GEN, CFL, AMP, PEN, SUT	2,0%				
55	TET, ENO, CFL, AMP, PEN	0,7%				
56	CFL, PEN, SUT	0,7%				
57	TET, GEN, ENO, AMP, PEN, SUT	0,7%				
58	TET, GEN, ENO, CFL, PEN, SUT	0,7%				
59	ENO, CFL, AMP, PEN	0,7%				
60	GEN, SUT		2,0%			
61	GEN, CFL, AMP, SUT		2,0%			
62	CFL		2,0%			
63	GEN, AMP, SUT		2,0%			
64	TET, ENO, PEN, SUT		2,0%			
65	TET, PEN, SUT		2,0%			
66	TET, GEN, AMP, PEN		2,0%			
67	ENO, CFL, PEN, SUT		2,0%			
68	GEN, CFL, PEN, SUT		2,0%			

**TET: Tetraciclina, GEN: Gentamicina, ENO: Enrofloxacina, CFL: Cefalotina, AMP: Ampicilina, PEN: Penicilina e SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim.

Anexo II

Perfis de suscetibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp nos distintos testes fenotípicos.

Antibiótipos	Resistência aos Testes	Porcentagem nas espécies				
		ECN (145)	ECP (51)	S. aureus (38)	S. intermedius (12)	ECP (SIG) (4)
1	*	2,10%	-	5,30%	-	-
2	AS, DSO, DSC, CCO, CAO, CCC, CAC	16,00%	25,50%	15,80%	8,30%	-
3	AS, DM, DSO, DSC, CCO, CAO, CCC, CAC	20,70%	15,70%	7,90%	25%	-
4	DSC, CCO, CAO, CCC, CAC	2,10%		2,60%	-	-
5	AS, DM, DSO, CCO, CAO, CCC, CAC	1,40%	2,00%	2,60%	8,30%	-
6	CCO, CCC, CAC	0,70%	7,80%	7,90%	8,30%	-
7	AS, CCO, CCC, CAC	1,40%	2,00%	-	-	-
8	DSO, DSC, CCO, CAO, CCC, CAC	23,40%	-	-	-	-
9	AS, DSO, CCO, CCC, CAC	1,40%	-	-	-	-
10	CCO, CAO	2,80%	-	-	-	-
11	AS, DSO, CCC, CAC	0,70%	-	-	-	-
12	AS, DM, DSO, CCO, CAO, CCC	0,70%	2,00%	-	-	-
13	AS, DSO, DSC, CCO, CAO, CAC	0,70%	-	-	-	-
14	AS, DSO, DSC, CCO, CAO, CCC	1,40%	-	-	-	-
15	AS, DM, DSO, CCC, CAC	0,70%	-	-	8,30%	-
16	AS, DSO, CCO, CAO, CCC, CAC	1,40%	2,00%	-	-	-
17	CCO, CAO, CCC, CAC	4,80%	2,00%	5,30%	-	25,00%
18	AS, DSO, DSC, CCO, CCC, CAC	0,70%	2,00%	-	-	-
19	DM, DSO, DSC, CCO, CAO, CCC, CAC	13,10%	9,80%	10,50%	8,30%	-
20	AS, DM, CCC	0,70%	-	-	-	-
21	DM, DSO, DSC, CCO, CCC, CAC	3,40%	2,00%	2,60%	-	-
22	AS, DM, CCO, CCC, CAC	0,70%	-	-	-	-
23	DM, CCO, CCC, CAC	0,70%	-	-	8,30%	-
24	DM, CCO, CAO, CCC, CAC	1,40%	-	2,60%	-	-
25	DM, DSO, DSC, CCO	1,40%	2,00%	-	-	-
26	CCO, CCC	0,70%	2,00%	-	-	-

Antibiotipos	Resistência aos Testes	Porcentagem nas espécies				
		ECN (145)	ECP (51)	S. aureus (38)	S. intermedius (12)	ECP (SIG) (4)
27	CCO, CAO, CCC	1,40%	-	-	-	-
28	AS, DM, DSO, DSC, CCO, CAO	0,70%	-	-	-	-
29	AS, DM, DSC, CCO, CAO, CCC, CAC	3,40%	2,00%	2,60%	-	-
30	CCC, CAC	0,70%		2,60%	-	-
31	CCC	0,70%	2,00%	-	-	-
32	AS, DM, CCO	0,70%		2,60%	-	-
33	AS, DM, DSC, CCO, CCC, CAC	0,70%	-	-	-	
34	AS, DM, DSC, CCO	0,70%	-	-	-	-
35	DM, DSC, CCO	0,70%	-	-	-	-
36	CAO	1,40%	-	-	-	25,00%
37	CCO	0,70%	4,00%	2,60%	-	-
38	CAO, CCC	0,70%	-	-	-	-
39	DSO, DSC, CCO, CAO, CCC	1,40%	-	2,60%	-	-
40	AS, DM, CCO, CAO, CCC, CAC	0,70%	2,00%	2,60%	-	-
41	DM, DSO, CCO, CAO, CCC, CAC	1,40%	-	-	-	-
42	CCO, CAO	0,70%	-	-	-	-
43	AS, CCC, CCA	-	2,00%	2,60%	-	-
44	DSC, CCO, CCC	-	2,00%	-	-	-
45	DM, DSC, CCO, CCC, CAC	-	2,00%	-	-	-
46	AS, DM, DSO, DSC, CAO, CCC, CAC	-	2,00%	-	-	-
47	DM, DSC, CCO, CAO, CCC, CAC	-	2,00%	-	-	-
48	AS, DM, DSO, DSC, CCO, CAO, CCC	-	2,00%	-	-	-
49	AS, DM, CCO, CAO, CCC	-	2,00%	-	-	-
50	DM, DSO, DSC, CCC, CAC	-	-	2,60%	8,30%	25,00%
51	AS, DM, DSO, DSC, CCO, CCC, CAC	-	-	2,60%	8,30%	25,00%
52	DM, DSO, DSC, CCO, CAO, CCC	-	-	2,60%	8,30%	-
53	DSC, CCO	-	-	2,60%	-	-

Antibiotipos	Resistência aos Testes	Porcentagem nas espécies				
		ECN (145)	ECP (51)	S. aureus (38)	S. intermedius (12)	ECP (SIG) (4)
54	AS, CCO, CAO, CCC, CAC	-	-	2,60%	-	-

AS- Ágar “screen”; DM – Difusão em Disco Modificada; DSO – Difusão em Disco Simples com Oxacilina; DSC - Difusão em Disco Simples com Cefoxitina; CCO - Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Oxacilina; CAO - Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Oxacilina; CCC - Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Cefoxitina; CAC - Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Cefoxitina.

Anexo III

Genes do sistema regulatório *mec* e fenótipo de resistência à oxacilina e cefoxitina em *Staphylococcus* spp. (n=250)

Perfil (n de isolados)	Resistência à OXA* e CFO**								Genes do sistema <i>mecA</i>		
	AS	DM	DSO	DSC	CCO	CAO	CCC	CAC	<i>mecA</i>	<i>mecI</i>	<i>mecRI</i>
1 (27)	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
2 (18)	R	R	R	R	R	R	R	R	-	+	+
3 (7)	S	S	S	S	R	S	R	R	-	-	-
4 (2)	S	S	S	S	R	S	R	R	-	+	+
5 (1)	R	S	R	S	R	R	R	R	-	+	+
6 (2)	R	S	R	S	R	R	R	R	-	-	-
7 (24)	R	S	R	R	R	R	R	R	-	+	+
8 (19)	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	-
9 (4)	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-
10 (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	-	+	+
11 (1)	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	-
12 (3)	S	S	S	R	R	R	R	R	-	+	+
13 (2)	R	R	S	S	R	S	S	S	-	-	-
14 (3)	R	R	R	S	R	R	R	R	-	-	-
15 (2)	R	R	R	S	R	R	R	R	-	+	+
16 (2)	R	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-
17 (1)	R	R	R	S	R	R	R	S	-	+	+
18 (1)	R	R	R	S	R	R	R	S	-	-	-
19 (1)	R	S	S	S	R	S	R	R	-	+	+
20 (2)	R	S	S	S	R	S	R	R	-	-	-
21 (1)	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	-
22 (2)	S	S	R	R	R	R	R	R	-	+	+
23 (2)	R	S	R	S	R	S	R	R	-	-	-
24 (3)	S	S	S	S	R	R	S	S	-	-	-
25 (2)	S	S	S	S	R	R	S	S	-	+	+
26 (1)	R	S	R	S	S	S	R	R	-	-	-
27 (1)	S	S	S	S	R	S	S	S	-	+	+
28 (3)	S	S	S	S	R	S	S	S	-	-	-
29 (1)	R	S	R	R	R	R	S	R	-	-	-
30 (2)	R	S	R	R	R	R	R	S	-	-	-
31 (1)	S	S	S	R	R	S	S	S	-	-	-
32 (1)	S	S	S	R	R	S	R	S	-	-	-
33 (1)	R	R	R	S	S	S	R	R	-	-	-
34 (1)	R	R	R	S	S	S	R	R	-	+	+
35 (7)	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-
36 (4)	S	S	S	S	R	R	R	R	-	+	+
37 (2)	R	S	R	R	R	S	R	R	-	-	-
38 (1)	R	R	S	S	R	R	R	R	-	+	+
39 (2)	R	R	S	S	R	R	R	R	-	-	-
40 (18)	S	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
41 (11)	S	R	R	R	R	R	R	R	-	+	+
42 (6)	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	-
43 (1)	R	R	S	R	R	R	R	R	-	+	+
44 (1)	R	R	S	S	S	S	R	S	-	+	+
45 (4)	S	R	R	R	R	S	R	R	-	-	-
46 (3)	S	R	R	R	R	S	R	R	-	+	+

Perfil (n de isolados)	Resistência à OXA* e CFO**								Genes do sistema <i>mecA</i>		
	AS	DM	DSO	DSC	CCO	CAO	CCC	CAC	<i>mecA</i>	<i>mecI</i>	<i>mecRI</i>
47 (1)	R	R	S	S	R	S	R	R	-	+	+
48 (2)	S	R	R	R	S	S	R	R	-	+	+
49 (1)	S	R	R	R	S	S	R	R	-	-	-
50 (2)	R	R	R	R	R	S	R	R	-	-	-
51 (1)	R	R	R	R	R	S	R	R	-	+	+
52 (2)	S	R	S	S	R	S	R	R	-	-	-
53 (1)	S	R	S	S	R	S	R	R	-	+	+
54 (2)	S	R	S	S	R	R	R	R	-	-	-
55 (1)	S	R	S	R	R	S	R	R	-	+	+
56 (1)	S	R	S	R	R	S	R	R	-	-	-
57 (1)	R	R	R	R	S	S	R	R	-	+	+
58 (3)	S	R	R	R	R	S	S	S	-	-	-
59 (2)	S	S	S	S	R	S	R	S	-	-	-
60 (2)	S	S	S	S	R	R	R	S	-	-	-
61 (1)	R	R	R	R	R	R	S	S	-	+	+
62 (2)	S	S	S	S	S	S	R	R	-	+	+
63 (2)	S	S	S	S	S	S	R	S	-	+	+
64 (1)	S	R	S	R	R	R	R	R	-	-	-
65 (1)	R	R	S	R	R	S	R	R	-	-	-
66 (1)	R	R	S	R	R	S	S	S	-	-	-
67 (1)	S	R	S	R	R	S	S	S	-	-	-
68 (3)	S	S	S	S	S	R	S	S	-	-	-
69 (1)	S	S	S	S	S	R	R	S	-	-	-
70 (2)	S	S	R	R	R	R	R	S	-	+	+
71 (1)	S	S	R	R	R	R	R	S	-	-	-
72 (2)	S	R	R	R	R	R	R	S	-	-	-
73 (1)	R	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-
74 (1)	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	-
75 (1)	R	R	S	S	R	R	R	S	-	-	-
76 (2)	S	R	R	S	R	R	R	R	-	-	-

AS- Ágar Screen; DM – Difusão em Disco Modificada; DSO – Difusão em Disco Simples com Oxacilina; DSC - Difusão em Disco Simples com Cefoxitina; CCO - Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Oxacilina; CAO - Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Oxacilina; CCC - Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Cefoxitina; CAC - Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Cefoxitina.

Anexo IV

Deteção dos genes *blaZ* e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. (n=250)

Perfil (n de isolados)	Resistência à OXA e CFO			<i>mecA</i>	Genes do sistema <i>blaZ</i>		
	AS	DSO	DSC	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaRI</i>
1 (4)	S	S	S	-	-	+	-
2 (1)	R	R	S	-	-	+	-
3 (19)	R	R	R	-	-	+	-
4 (23)	R	R	R	-	-	-	-
5 (1)	R	R	R	-	+	+	-
6 (2)	S	S	S	-	-	-	-
7 (2)	S	S	S	-	-	+	-
8 (1)	S	S	S	-	-	+	+
9 (2)	S	S	R	-	-	-	-
10 (1)	S	S	R	-	+	+	-
11 (1)	S	S	R	-	-	+	-
12 (1)	R	S	S	-	+	+	+
13 (1)	R	S	S	-	-	-	-
14 (18)	R	R	R	-	-	+	-
15 (25)	R	R	R	-	-	-	-
16 (1)	R	R	R	-	+	-	-
17 (1)	R	R	R	-	+	+	-
18 (2)	R	R	S	-	-	-	-
19 (3)	R	R	S	-	-	+	-
20 (1)	R	R	S	-	-	-	-
21 (2)	R	S	S	-	-	-	-
22 (4)	S	S	S	-	-	-	-
23 (1)	S	S	S	-	+	+	+
24 (3)	R	S	S	-	-	-	-
25 (2)	S	R	R	-	-	-	-
26 (2)	R	R	S	-	-	-	-
27 (2)	S	S	S	-	-	+	-
28 (3)	S	S	S	-	-	-	-
29 (1)	R	R	S	-	-	-	-
30 (1)	S	S	S	-	-	-	-
31 (1)	S	S	S	-	+	+	-
32 (2)	S	S	S	-	-	+	-
33 (3)	R	R	R	-	-	-	-
34 (1)	R	R	R	-	-	-	-
35 (2)	R	R	R	-	-	+	-
36 (1)	S	S	R	-	-	-	-
37 (1)	S	S	R	-	-	-	-
38 (2)	R	R	S	-	-	-	-
39 (2)	R	R	S	-	-	-	-
40 (6)	S	S	S	-	-	-	-
41 (5)	S	S	S	-	-	+	-
42 (3)	R	S	S	-	-	+	-
43 (12)	S	R	R	-	-	-	-
44 (16)	S	R	R	-	-	+	-
45 (1)	S	R	R	-	+	+	+
46 (1)	R	R	S	-	-	-	-

Perfil (n de isolados)	Resistência à OXA e CFO			<i>mecA</i>	Genes do sistema <i>blaZ</i>		
	AS	DSO	DSC	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaRI</i>
47 (3)	R	S	R	-	-	+	-
48 (3)	R	S	R	-	-	-	-
49 (1)	R	S	R	-	+	+	-
50 (1)	R	S	S	-	-	-	-
51 (5)	S	R	R	-	-	+	-
52 (2)	S	R	R	-	-	-	-
53 (1)	R	S	S	-	-	-	-
54 (1)	S	R	R	-	-	+	-
55 (1)	S	R	R	-	-	-	-
56 (1)	S	R	R	-	+	+	-
57 (2)	R	R	R	-	-	+	-
58 (1)	R	R	R	-	+	-	-
59 (2)	S	S	S	-	-	-	-
60 (1)	S	S	S	-	-	-	-
61 (2)	S	S	S	-	-	+	-
62 (1)	S	S	R	-	+	+	-
63 (1)	S	S	R	-	-	-	-
64 (1)	R	R	R	-	-	-	-
65 (2)	S	R	R	-	-	-	-
66 (1)	S	R	R	-	-	+	-
67 (2)	S	S	S	-	-	-	-
68 (1)	S	S	S	-	-	-	-
69 (1)	S	S	S	-	-	+	-
70 (1)	R	R	R	-	-	+	-
71 (1)	S	S	S	-	-	-	-
72 (1)	S	S	S	-	-	+	-
73 (1)	S	S	S	-	-	-	-
74 (1)	S	S	R	-	-	-	-
75 (1)	R	S	R	-	-	-	-
76 (1)	R	S	R	-	-	-	-
77 (1)	S	S	R	-	-	-	-
78 (1)	S	S	S	-	-	+	+
79 (1)	S	S	S	-	-	-	-
80 (1)	S	S	S	-	-	+	-
81 (1)	S	S	S	-	-	-	-
82 (1)	S	R	R	-	-	-	-
83 (2)	S	R	R	-	-	+	-
84 (2)	S	R	R	-	-	+	-
85 (1)	R	S	S	-	-	+	-
86 (1)	R	R	R	-	-	+	-
87 (1)	R	S	S	-	-	+	-
88 (1)	S	R	S	-	-	+	-
89 (1)	S	R	S	-	-	-	-
90 (1)	S	R	R	-	-	+	-
91 (1)	R	S	S	-	+	+	-

AS- Ágar Screen; DSO – Difusão em Disco Simples com Oxacilina; DSC - Difusão em Disco Simples com Cefoxitina.