

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

**DISSERTAÇÃO**

**ANÁLISE GENOTÍPICA E PROTEÔMICA NA IDENTIFICAÇÃO DE  
*Staphylococcus* spp. COAGULASE-POSITIVOS ISOLADOS DO LEITE E  
SUA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE E CARACTERIZAÇÃO DA  
RESISTÊNCIA A BETA-LACTÂMICOS**

**CÁSSIA COUTO DA MOTTA**

2014



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

**ANÁLISE GENOTÍPICA E PROTEÔMICA NA IDENTIFICAÇÃO DE  
*Staphylococcus* spp. COAGULASE-POSITIVOS ISOLADOS DA CADEIA  
PRODUTIVA DO LEITE E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A  
BETA-LACTÂMICOS**

**CÁSSIA COUTO DA MOTTA**

*Sob a orientação da Professora*  
**Miliane Moreira Soares de Souza**

*e Co-orientação da Professora*  
**Shana de Mattos de Oliveira Coelho**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2014

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

**CÁSSIA COUTO DA MOTTA**

Dissertação 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.

DISSERTAÇÃO APROVADA 26/02/2014



**“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”**

*Mahatma Ghandi*

Dedico este trabalho aos meus pais e avós, por todo carinho e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, minha família, meu namorado e amigos que me incentivam a ir adiante. Por continuar a me acompanhar nos momentos de dúvida, em que a fé parece se abalar. Pela saúde e força para ir atrás das vitórias e permitir que elas se concretizem.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela incrível oportunidade de ter estudado, e me graduado em Medicina Veterinária, neste lugar que por sete anos foi a minha segunda casa e que me permitiu amadurecer, crescer profissionalmente e fazer amizades que tornaram-se uma segunda família. Este lugar mágico, que fica gravado na alma e deixa marcas eternas em nós, ultrapassando o limite do ensino em sala de aula.

Aos meus pais, meus amores e maiores incentivadores, Humberto Machado da Motta e Tânia Lúcia Gonçalves Couto da Motta, por me mostrarem que a maior herança que se deixa aos filhos é a educação. Por nunca terem medido esforços para que eu pudesse ter acesso ao bom ensino, mesmo nos momentos mais difíceis, e principalmente, pelo amor incondicional. Vocês são tudo em minha vida. Esta conquista é de vocês!

Aos meus avós, Walter Ferreira Couto, Leda Gonçalves Couto, Lúcia Gonçalves (*in memoriam*), Yvonne Carneiro Gonçalves da Silva (*in memoriam*), Sérgio Gonçalves da Silva (*in memoriam*), José Machado da Motta (*in memoriam*). O meu muito obrigado pelo carinho sincero, por participarem da minha educação e formação como ser humano. Vocês estarão eternamente em meu coração.

Ao meu namorado, Herbet Pereira dos Santos. Obrigada por ser o melhor namorado, o melhor amigo, pelo amor, respeito, e, principalmente, paciência. Por todos os anos que estamos juntos, fortalecendo e incentivando um ao outro. Amo você.

Às minhas tias Cândia Regina Gonçalves Couto dos Santos e Juliana dos Santos Gonçalves Couto pelo exemplo de dedicação à educação e apoio.

A toda minha família e amigos, que tanto contribuíram para a minha evolução, sempre presentes e dispostos a ajudar, especialmente: Maria Lopes, Fernanda Kohn e Natália Lima Garcia Salgado. Obrigada pelo apoio.

À minha orientadora, Miliane Moreira Soares de Souza, pela confiança depositada. Muito obrigada por acreditar no meu trabalho e permitir que ele fosse conduzido sob sua orientação, desde os tempos de iniciação científica.

À co-orientadora, Shana de Mattos de Oliveira Coelho, pelos conselhos e incentivo. Muito obrigada.

À professora Irene da Silva Coelho, pela paciência e vontade desmedida em cooperar para o sucesso deste trabalho! Muito obrigada.

À amiga, colega e parceira de Mestrado Anna Carolina Coelho Marín Rojas, pela ajuda incondicional nestes dois anos que enfrentamos. Tenho a certeza que concluo esta etapa com mais uma amiga. Obrigada por tudo.

Ao estagiário e amigo, Felipe Carlos Dubenczuk, pela incansável dedicação aos estafilococos, fornecendo todo suporte necessário para que este trabalho fosse realizado. Obrigada!

Ao amigo, colega de turma e de profissão, Pedro Emílio Ferreira Rodrigues, pela colaboração como médico veterinário das propriedades leiteiras, o que possibilitou a realização das coletas de amostras, colaborando assim com este trabalho. Obrigada!

Aos amigos e colegas de laboratório, Bruno da Rocha Pribul, Marcelo Santos de Oliva, Bruno Oliveira de Carvalho, Pedro Trivisol de Castro Medeiros, Marisol Alvim Gomez, Naiara de Miranda Bento Rodrigues, Greiciane França Bronzato de Almeida, Gabrielli Stefaninni Santiago, Natália Barreto, Bianca da Silva Soares e Daniel Paiva Barros

de Abreu por tornarem a rotina de trabalho mais prazerosa e divertida. Obrigada pela amizade, incentivo e colaboração.

À grande companheira de Biologia Molecular, Dayanne Araújo de Melo, pela grande ajuda para que este trabalho fosse concluído. Muito obrigada!

Às Doutoradas Lidiane de Castro Soares e Ingrid Annes Pereira, que há cinco receberam-me com carinho no laboratório e incentivaram minha permanência.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial às professoras Marcia Giambiagi de-Marval, pela colaboração e, Beatriz Meurer Moreira, pela disponibilização para uso do equipamento MALDI-TOF MS. Muito obrigada.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ e funcionários, em especial ao professor e coordenador José Luis Fernando Luque Alejos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de estudos e patrocínios agraciados.

A todos que de certa forma contribuíram para a conclusão desta etapa, meus sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

Cássia Couto da Motta ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2007, diplomando-se em janeiro de 2012.

Durante a graduação, foi estagiária no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Estagiou no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do período de 2009 a 2012, realizando projetos na área de mastite bovina. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq de 2010 a 2012, com projeto intitulado “Caracterização genotípica da resistência e virulência em isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de mastite bovina como subsídio para implementação de Boas Práticas de Ordenha.”, sob a orientação da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza.

Em 2011, foi aprovada no processo seletivo do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, sob a orientação da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza. Em 2013, foi aprovada no processo seletivo do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, também sob a orientação da professora PhD. Miliane Moreira Soares de Souza.

## RESUMO

MOTTA, Cássia Couto. **Análise genotípica e proteômica na identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados do leite e sua cadeia produtiva e caracterização da resistência a beta-lactâmicos.** 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

*Staphylococcus aureus* é considerado o principal agente causador da mastite bovina, no entanto, outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos (ECP) também estão associadas a esta enfermidade, mas muitas vezes são erroneamente diagnosticadas como *S. aureus*, o que pode acarretar problemas na detecção fenotípica da resistência aos beta-lactâmicos. Muitos métodos genotípicos vêm sendo desenvolvidos para a identificação de *S. aureus* e demais ECPs. Por outro lado, a identificação proteômica com utilização da ferramenta MALDI-TOF MS para caracterização das espécies fornece resultados mais rápidos e seguros. ECPs podem apresentar um alto nível de resistência antimicrobiana, especialmente aos beta-lactâmicos, o que favorece a sua persistência no rebanho. O monitoramento desta resistência é essencial e a realização da leitura interpretativa dos antibiogramas pode ser uma aliada na detecção de resultados não usuais, no reconhecimento de quais drogas devem ser evitadas e que podem selecionar a resistência, além de permitir, através do uso de marcadores fenotípicos de resistência, a predição do mecanismo envolvido. Dois mecanismos distintos determinam a resistência a esta classe: a produção de beta-lactamases, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção de uma PBP modificada (PBP2a), codificada pelo gene *mecA*. Isolados que possuem o gene *blaZ* expresso são frequentemente resistentes à penicilina e ampicilina. A expressão do gene *mecA* confere resistência a todos os antimicrobianos desta classe. Entretanto, evidências recentes, revelam que a detecção do gene *mecA* não desempenha um papel significativo em relação a isolados de estafilococos de origem bovina. O presente estudo foi conduzido para caracterizar, por diferentes técnicas, os isolados de ECP oriundos da cadeia produtiva do leite, propondo uma chave de identificação genotípica para *S. aureus*. Além disto, buscou-se avaliar o perfil fenogenotípico da resistência aos beta-lactâmicos. A espécie de ECP prevalente neste estudo foi *S. aureus* (97,9%), seguida de *S. hyicus* (1,4%) e *S. intermedius* (0,7%). A identificação genotípica de *S. aureus* proposta apresentou 100% de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, quando comparada com a técnica proteômica MALDI-TOF MS. A identificação de *S. hyicus* e *S. intermedius* só foi possível graças à ferramenta MALDI-TOF MS. A resistência aos antimicrobianos oxacilina (1,4%), amoxicilina + ácido clavulânico (1,4%), eritromicina (2,8%) e cefalotina (10%) foi baixa. Não houve resistência ao antimicrobiano imipenem. Foi observada em 80,7% dos isolados a resistência à penicilina e, em 41,9% detectou-se o gene *blaZ*. O gene *mecA* foi detectado em 2,7% e o gene *mecRI* em 75% dos isolados avaliados, que foram sensíveis à oxacilina. Alguns dos isolados resistentes a beta-lactâmicos não apresentaram nenhum dos genes de resistência, indicando a necessidade de mais estudos para a melhor compreensão de como estes mecanismos funcionam para estes isolados.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus* coagulase-positivos, mastite bovina, MALDI-TOF MS, *blaZ* e *mecA*.

## ABSTRACT

MOTTA, Cássia Couto. **Genotypic and proteomic analysis in the identification of coagulase positive *Staphylococcus* spp. isolated from the milk production chain and characterization of resistance to beta-lactams.** 2014. 76 p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

*Staphylococcus aureus* is considered the principal etiological agent of bovine mastitis. However, other coagulase-positive *Staphylococcus* (CPS) associated to this disease are frequently misidentified as *S. aureus*. This misidentification can lead to several problems in the phenotypic detection of beta-lactamic resistance. Several genotypic methods have been developed for the identification of *S. aureus* and other CPSs. In the other hand, proteomic identification by the MALDI-TOF MS technique for species characterization provides faster and more accurate results. *S. aureus* and other CPSs can show high antimicrobial resistance, especially to beta-lactams, favoring their persistence in herd environment. The monitoring of antibiotic resistance is essential in mastitis control and the use of interpretative criteria in susceptibility assays readings can be used for the detection of unusual profiles, avoiding drugs that will exert positive selective pressure in resistant strains. It can also help in the prediction of the implicated resistance mechanism, detecting phenotypic resistance markers. Two different mechanisms determine resistance to beta-lactamic antimicrobials: beta-lactamases production, encoded by the *blaZ* gene, and PBP2a production, a modified PBP coded by the *mecA* gene. Isolates expressing *blaZ* are frequently resistant to penicillin and ampicillin. Alternatively, *mecA* expression confers resistance to all beta-lactams. Recent studies, however, report that *mecA* detection does not have such a significant role in staphylococci isolates from bovine origin. This study was conducted to characterize, through different techniques, CPS isolates from the milk chain production, and to propose a genotypic identification fluxogram for *S. aureus*. Pheno-genotypic resistance profiles to beta-lactams were also evaluated. In this study, the most prevalent CPS species was *S. aureus* (97,9%), followed by *S. hyicus* (1,4%) and *S. intermedius* (0,7%). The genotypic identification proposed for *S. aureus* showed sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 100% compared to the proteomic technique MADLI-TOF MS. *S. hyicus* and *S. intermedius* identification was only possible by MALDI-TOF MS. Resistance to the antimicrobials tested was relatively low, as follows: oxacillin (1,4%), amoxicillin + clavulanic acid (1,4%), erythromycin (2,8%) and cephalothin (10%). There was no resistance to imipenem. In the other hand, 80,7% of the isolates were resistant to penicillin, and 41,9% of them were positive for the *blaZ* gene. The *mecA* was found in 2,7% and *mecRI* in 75% of the isolates susceptible to oxacillin. Neither *blaZ* or *mecA* genes were detected in some isolates phenotypically resistant to penicillin, suggesting the necessity for further investigation and a better comprehension of the mechanisms of resistance against beta-lactams staphylococci from dairy cattle.

**Keywords:** coagulase-positive *Staphylococcus*, bovine mastitis, MALDI-TOF MS, *blaZ* and *mecA* genes.

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | <b>Pág</b> |
|---|------------|
| <b>Figura 1.</b> Chave de identificação proposta para diferenciação preliminar de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos e <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos, e identificação de <i>S. aureus</i> .  | 21         |
| <b>Figura 2.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA (756 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle <i>S. aureus</i> ATCC 29213; 1: Isolado positivo; B: Branco.  | 22         |
| <b>Figura 3.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene <i>coa</i> (variável). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle <i>S. aureus</i> ATCC 29213; 1: Isolado positivo; B: Branco.  | 22         |
| <b>Figura 4.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene <i>nuc</i> (279 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle <i>S. aureus</i> ATCC 29213; 1: Isolado positivo; B: Branco.  | 22         |
| <b>Figura 5.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene 23S rRNA (1250 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle; 1: Isolado positivo; 2: Isolado positivo (>1250 pb); B: Branco.   | 23         |
| <b>Figura 6.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação da M-PCR dos genes <i>nuc</i> de ECP. M: marcador de tamanho molecular (100 bp), CP1: controle <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (359 pb); CP2: controle <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> 3975 (526 pb); CP3: controle <i>S. intermedius</i> ATCC 29663 (430 pb); CP4: controle <i>S. hyicus</i> 5368 não amplificado; | 24         |
| <b>Figura 7.</b> Teste de zona <i>edge</i> positivo, com borda do halo de inibição demarcada (A). Teste de zona <i>edge</i> negativo, com borda não definida (B).   | 28         |
| <b>Figura 8.</b> Isolado resistente à penicilina (PEN) (A) e sensível à combinação amoxicilina + ácido clavulânico (AMC) (B), no teste de difusão em disco.   | 29         |
| <b>Figura 9.</b> Teste de difusão em disco. Isolado de <i>S. aureus</i> resistente à cefoxitina (CFO) (A). Isolado de <i>S. aureus</i> sensível à cefoxitina (CFO) (B).   | 30         |
| <b>Figura 10.</b> Teste de difusão em disco. Isolado de <i>S. intermedius</i> resistente à oxacilina (OXA) (A). Isolado de <i>S. hyicus</i> sensível à oxacilina (OXA) (B).   | 30         |
| <b>Figura 11.</b> Teste de difusão em disco. Isolado sensível à cefalotina (CFL) (A). Isolado de <i>S. intermedius</i> resistente à cefaltonia (CFL) (B). Isolado sensível ao imipenem (IPM) (C).   | 31         |
| <b>Figura 12.</b> Teste de disco aproximação para detecção da resistência induzível à clindamicina. Resistência induzível à clindamicina (“zona D”) (A).  | 32         |

Resistência constitutiva (B). Resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina (C).

- Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *blaZ* (861 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle; 1: Isolado positivo; B: Branco. 33
- Figura 14.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *mecA* pelos iniciadores: *mecA* “Universal” (574 pb) (A) e *mecA* (533 pb) (B); e dos produtos de amplificação do gene *mecRI* (234 pb) (C). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle *S. aureus* ATCC 43300; 1: Isolado *mecA* positivo (*mecA* “Universal”); 2: Isolado *mecA* positivo (*mecA* de Murakami e colaboradores, 1991); 3: Isolado *mecRI* positivo; B: Branco. 34

## ÍNDICE DE QUADROS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Quadro 1.</b> Iniciadores e condições de amplificação para identificação de espécies de <i>Staphylococcus aureus</i>                    | 14          |
| <b>Quadro 2.</b> Iniciadores empregados e condições detecção para identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos. | 15          |
| <b>Quadro 3.</b> Iniciadores e condições de amplificação para a detecção dos genes de resistência <i>mecA</i> e seus reguladores.          | 18          |
| <b>Quadro 4.</b> Iniciadores e condições de amplificação para a detecção do gene <i>blaZ</i> .   | 18          |
| <b>Quadro 5.</b> Critérios para interpretação dos valores de Kappa.  | 19          |
| <b>Quadro 6.</b> Critério representativo adotado para análise estatística dos métodos moleculares testados.                                | 19          |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Tabela 1.</b> Relação das propriedades, suas respectivas cidades, vacas em lactação, vacas com mastite e número de amostras.  | 11          |
| <b>Tabela 2.</b> Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição aos antimicrobianos testados.  | 17          |
| <b>Tabela 3.</b> Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição aos antimicrobianos cefalotina e imipenem.   | 17          |
| <b>Tabela 4.</b> Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição à eritromicina.  | 17          |
| <b>Tabela 5.</b> Perfis de amplificação dos genes <i>coa</i> , <i>nuc</i> e 23S rRNA para identificação de <i>S. aureus</i> obtidos.   | 23          |
| <b>Tabela 6.</b> Isolados de <i>S. aureus</i> pertencente aos perfis encontrados na identificação molecular e confirmados pela técnica MALDI-TOF MS.   | 25          |
| <b>Tabela 7.</b> Comparativo da identificação fenotípica, genotípica e proteômica dos 36 isolados de ECP analisados pela técnica MALDI-TOF MS e seus respectivos escores.  | 26          |
| <b>Tabela 8.</b> Coeficiente Kappa de concordância entre a identificação genotípica de <i>S. aureus</i> e a identificação proteômica por MALDI-TOF MS.   | 27          |
| <b>Tabela 9.</b> Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN encontrados para a chave de identificação proposta.   | 27          |
| <b>Tabela 10.</b> Perfis encontrados entre os isolados quanto à suscetibilidade à penicilina (PEN) e amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), ao resultado do teste de zona <i>edge</i> e presença do gene <i>blaZ</i> . | 33          |
| <b>Tabela 11.</b> Perfis de amplificação dos genes de resistência de acordo com os resultados encontrados na difusão em disco com oxacilina ou cefoxitina.   | 35          |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|                |   |
|----------------|---|
| <b>AMC</b>     | Amoxicilina +  cido clavul nico   |
| <b>AMH</b>     |  gar M ueller-Hinton  |
| <b>AMVF</b>    |  gar Manitol Vermelho de Fenol  |
| <b>BHI</b>     | Infuso C rebro Cora o   |
| <b>CA-MRSA</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes associado   comunidade<br>( <i>Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> ) |
| <b>CCS</b>     | Contagem de C lulas Som ticas   |
| <b>ccr</b>     | <i>Cassete Chromosome Recombinases</i>  |
| <b>CFL</b>     | Cefalotina  |
| <b>CFO</b>     | Cefoxitina  |
| <b>CLI</b>     | Clindamicina  |
| <b>CLSI</b>    | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>  |
| <b>CMT</b>     | <i>California Mastitis Test</i>   |
| <b>DNA</b>     |  cido Desoxiribonucl ico  |
| <b>dNTP</b>    | Desorribonucleot deo trifosfatado   |
| <b>ECN</b>     | Estafilococos Coagulase-Negativos   |
| <b>ECP</b>     | Estafilococos Coagulase-Positivos   |
| <b>ERI</b>     | Eritromicina  |
| <b>HA-MRSA</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes associado a hospitais<br>( <i>Healthcare-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )   |
| <b>h</b>       | Horas   |
| <b>IS431</b>   | Ilha de patogenicidade 431  |
| <b>IPM</b>     | Imipenem  |
| <b>LA-MRSA</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes associado   pecu ria<br>( <i>Livestock-associated Staphylococcus aureus</i> )                         |
| <b>m/s</b>     | Metros/segundo  |
| <b>mg</b>      | Miligrama   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>min.</b>          | Minuto  |
| <b>mL</b>            | Mililitros  |
| <b>mM</b>            | Milimolar   |
| <b>mm</b>            | Milímetros  |
| <b>MALDI-TOF MS</b>  | Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry</i> ) |
| <b>MRSA</b>          | <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina ( <i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> )  |
| <b>ng</b>            | Nanogramas  |
| <b>nm</b>            | Nanômetro   |
| <b>OXA</b>           | Oxacilina   |
| <b>pb</b>            | Pares de base   |
| <b>PBP</b>           | “ <i>Penicillin Binding Protein</i> ” - Proteína Ligadora de Penicilina   |
| <b>PCR</b>           | “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” - Reação em Cadeia de Polimerase   |
| <b>PEN</b>           | Penicilina  |
| <b>pH</b>            | Potencial hidrogeniônico  |
| <b>rpm</b>           | Rotação por minuto  |
| <b>SCC<i>mec</i></b> | Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>  |
| <b>seg.</b>          | Segundo   |
| <b>U</b>             | Unidade   |
| <b>UI</b>            | Unidades internacionais   |
| <b>V</b>             | Voltagem  |
| <b>µg</b>            | Micrograma  |
| <b>µL</b>            | Microlitro  |
| <b>°C</b>            | Graus Celsius   |



## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>  | <b>3</b>  |
| 2.1      | Gênero <i>Staphylococcus</i>  | 3         |
| 2.2      | <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos e a mastite bovina  | 4         |
| 2.3      | Identificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos  | 6         |
| 2.4      | Resistência aos beta-lactâmicos   | 7         |
| <b>3</b> | <b>3 OBJETIVOS</b>  | <b>10</b> |
| 3.1      | Objetivo Geral  | 10        |
| 3.2      | Objetivos Específicos   | 10        |
| <b>4</b> | <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>11</b> |
| 4.1      | Amostragem  | 11        |
| 4.2      | Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.  | 11        |
| 4.2.1    | Prova do hidróxido de potássio (KOH) 3% e prova da catalase   | 12        |
| 4.2.2    | Prova da coagulase  | 12        |
| 4.2.3    | Resistência à bacitracina   | 12        |
| 4.2.4    | Prova de Voges-Proskauer e fermentação de maltose e manose  | 12        |
| 4.3      | Caracterização genotípica de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos  | 13        |
| 4.3.1    | Extração do DNA total bacteriano  | 13        |
| 4.3.2    | Detecção dos genes por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para identificação de <i>S. aureus</i>                        | 13        |
| 4.3.3    | Sequenciamento do gene 23S rRNA   | 14        |
| 4.3.4    | M-PCR dos genes <i>nuc</i> para caracterização de outros <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos                        | 14        |
| 4.4      | Identificação por MALDI-TOF MS  | 15        |
| 4.5      | Caracterização fenotípica da suscetibilidade aos antimicrobianos  | 16        |
| 4.5.1    | Preparo do inóculo  | 16        |
| 4.5.1.1  | Método de suspensão direta das colônias   | 16        |
| 4.5.2    | Difusão em disco para avaliação de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos quanto à suscetibilidade aos beta-lactâmicos | 16        |
| 4.5.3    | Teste de disco aproximação para detecção da resistência induzível à clindamicina  | 17        |
| 4.6      | Detecção genotípica da resistência aos beta-lactâmicos  | 18        |
| 4.6.1    | Detecção dos genes de resistência à oxacilina   | 18        |
| 4.6.2    | Detecção do gene relacionado à produção de beta-lactamases  | 18        |
| 4.7      | Análise dos dados   | 18        |
| <b>5</b> | <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>20</b> |
| 5.1      | Caracterização fenogenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i>   | 20        |
| 5.2      | M-PCR dos genes <i>nuc</i> para caracterização de outros <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos                        | 24        |
| 5.3      | Identificação por MALDI-TOF MS  | 25        |
| 5.4      | Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos  | 28        |
| 5.4.1    | Detecção fenotípica da resistência aos beta-lactâmicos  | 28        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 5.4.2    | Detecção da resistência induzível à clindamicina      | 31        |
| 5.5      | Detecção dos genes de resistência aos beta-lactâmicos | 32        |
| 5.5.1    | Detecção do gene <i>blaZ</i>                          | 32        |
| 5.5.2    | Detecção do gene <i>mecA</i> e seus reguladores       | 33        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b>                                     | <b>36</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                     | <b>37</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* estão entre as maiores causadoras de infecções oportunistas tanto no homem como em animais. Colonizam as mucosas, especialmente de mamíferos e aves, onde eventualmente podem ocasionar um processo infeccioso em decorrência de alterações teciduais do hospedeiro. Dentro deste gênero, destacam-se as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, que é a espécie mais patogênica do gênero e que possui a capacidade de desenvolver resistência a diferentes antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária, sendo considerado um problema mundial de saúde.

Dentre as enfermidades que ocasionam está a mastite bovina, que é uma inflamação da glândula mamária de origem principalmente infecciosa e que provoca significativas perdas econômicas para os produtores de leite e derivados, que vão desde alterações na composição do leite até gastos com o tratamento e descarte dos animais. Entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos isoladas a partir de mastite bovina estão *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, contudo, durante a rotina diagnóstica, as demais espécies podem ser erroneamente diagnosticadas como *S. aureus*.

Diversos métodos de identificação de *Staphylococcus* spp. estão disponíveis atualmente. Testes bioquímicos convencionais, sistemas comerciais e kits automatizados são amplamente utilizados por laboratórios de diagnóstico microbiológico. No entanto, a ausência de marcadores fenotípicos específicos para a precisa diferenciação das espécies limita o poder de identificação destes testes. Além disto, as recentes mudanças na taxonomia de algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos, com descrições de novas espécies e reclassificações, tornou a diferenciação das espécies mais dificultosa, principalmente em Medicina Veterinária. Deste modo, técnicas genotípicas, com o uso de marcadores moleculares, têm sido cada vez mais utilizadas. Estas ferramentas, associadas ao diagnóstico fenotípico, têm possibilitado uma caracterização de espécie mais confiável e precisa.

Mais recentemente, a análise proteômica por espectrometria de massa MALDI-TOF vem ganhando espaço, impulsionada por vantagens como custo-benefício, resultados rápidos e precisos. Mas, apesar de promissora, esta técnica tem um alto custo de instalação, o que pode não ser ideal para laboratórios com uma rotina diagnóstica menos intensa. Nesses casos, a utilização de ferramentas moleculares pode ser a opção mais acessível. Neste sentido, é fundamental uma utilização crítica de técnicas genotípicas, com o emprego de diferentes marcadores moleculares para caracterização de espécies.

A mastite é a maior responsável pelo uso de antibacterianos em fazendas leiteiras, sendo os antimicrobianos beta-lactâmicos mais comumente administrados. Existe uma forte preocupação quanto ao surgimento de bactérias resistentes em ambientes de produção animal, uma vez que, devido ao uso constante de antimicrobianos, a pressão de seleção sobre estes microrganismos seria bastante elevada, justificando assim o monitoramento desta resistência.

Isolados de *Staphylococcus* spp. são frequentemente 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 pelo gene *blaZ*, e a produção de uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade (PBP2a), codificada pelo gene *mecA*.

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, denominado “cassete cromossômico estafilocócico de *mec*” (*SCCmec*), de diferentes tipos, que pode ser transferido e se integrar ao genoma bacteriano. O cassete *mec* carrega outros elementos genéticos que

codificam resistência às outras classes de antimicrobianos, como por exemplo, os genes *erm* que são os responsáveis pela resistência cruzada a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>). A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp., e dos elementos genéticos inseridos no SCC<sub>mec</sub>, resultou na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes, tornando-se uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por este agente.

Estudos apontam para um aumento da resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite bovina, enquanto outros indicam que a resistência encontrada ainda é pouco frequente. Para uma correta análise da suscetibilidade a antimicrobianos, principalmente beta-lactâmicos, é imprescindível uma boa identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos envolvidas nestes processos infecciosos, pois os critérios para avaliação da suscetibilidade podem variar consideravelmente entre as espécies.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos isoladas a partir da cadeia produtiva do leite de propriedades localizadas em diferentes cidades do estado do Rio de Janeiro, através de diferentes técnicas, propondo uma chave de identificação para *S. aureus*, além de avaliar o perfil fenogenotípico da resistência destes isolados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Staphylococcus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, pertencente à família Staphylococcaceae, são cocos Gram positivos arranjados principalmente de forma irregular, com aparência semelhante a “cachos de uva”. São ainda aeróbios facultativos, imóveis, não esporulados, produtores da enzima catalase e resistentes à bacitracina (0,04 UI).

O gênero *Staphylococcus* está presente na pele e microbiota nasal, causando infecções oportunistas em seres humanos e vários animais (SASAKI et al., 2010). Colonizam as mucosas, especialmente de mamíferos e aves, onde eventualmente podem ocasionar um processo infeccioso em decorrência de alterações teciduais do hospedeiro, como traumas (GRIFFETH et al., 2008). Infecções estafilocócicas estão entre as doenças oportunistas mais comuns, o que tem levado a práticas de controle dos patógenos deste gênero, tanto em hospitais veterinários quanto em humanos (WEESE, 2012).

De acordo com o *List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature* (2014), existem 49 espécies descritas pertencentes a este gênero e 26 subespécies, habitando diferentes ambientes e espécies animais. O gênero é subdividido em dois grandes grupos, com base na produção da enzima coagulase, cuja função é formar coágulos de fibrina no tecido do hospedeiro, dificultando seu reconhecimento e fagocitose por parte do sistema fagocitário mononuclear.

De modo geral, oito espécies de estafilococos coagulase-positivos (ECP) têm sido identificadas: *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, e *S. agnetis* (TAPONEN et al., 2012; SASAKI et al., 2010; DEVRIESE et al., 2005; FRENEY et al., 1999). As espécies de estafilococos tendem a apresentar especificidade quanto ao hospedeiro. Por exemplo, as espécies predominantes em ruminantes, suínos, cães e pombos são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. pseudintermedius*, e *S. intermedius*, respectivamente (SASAKI et al., 2010; FITZGERALD; PENADÉS, 2008; SASAKI et al., 2007). Entretanto, é possível isolar a mesma espécie bacteriana de quadros clínicos em diferentes hospedeiros animais. Nestes casos, a bactéria pode apresentar variações decorrentes desta adaptação (SPOOR et al., 2013; PANTOSTI, 2012).

*Staphylococcus aureus* é a espécie mais patogênica do gênero, estando associada a um amplo espectro de doenças, desde lesões cutâneas superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em animais (SAKAI et al., 2004). Em humanos, apresenta-se como a espécie mais associada a infecções bacterianas, sendo o agente etiológico de diversas patologias, que vão desde infecções dérmicas, como impetigo e foliculite, até doenças mais graves como meningite, pneumonia, síndrome do choque tóxico e sepse, além de ser um dos principais microrganismos responsáveis por infecções hospitalares (SCALETTI et al. 2011). Possui a capacidade de desenvolver resistência a diferentes antibióticos utilizados na rotina clínica (PANTOSTI et al. 2007), o que torna suas infecções, que podem ser graves, mais difíceis de controlar, podendo levar ao óbito, sendo considerada um problema mundial de saúde.

*Staphylococcus intermedius* foi caracterizado por Hajek em 1976 e, desde então, vem sendo diagnosticado como o agente etiológico de diversas infecções em cães, equinos, pombos, dentre outros animais. Encontra-se presente na mucosa, pele e pelagem (FITZGERALD, 2009). Por muitas décadas, foi considerada a espécie causadora de infecções de pele e tecidos moles em cães (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Entretanto, foi

demonstrado que isolados fenotipicamente identificados como *S. intermedius* são, de fato, diferenciados em três espécies distintas: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005) e *S. delphini*, que juntos pertencem ao grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG) (BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007). *S. delphini* foi primeiramente isolado a partir de lesões purulentas de pele de golfinhos em 1988 (VARALDO, et al. 1988) e tem sido raramente reportado desde então (BJORLAND et al., 2005). *S. intermedius*, isolado principalmente de pombos, representa um táxon distinto que não é representativo da maioria dos isolados anteriormente identificados como *S. intermedius* (BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007). Já a nova espécie descrita *S. pseudintermedius* é a causa comum de infecções cutâneas em cães (BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007), como piодermite e otite externa, além de outras patologias.

*Staphylococcus hyicus* é uma espécie coagulase-variável, que faz parte da microbiota comensal de vários animais e é frequentemente encontrado em suínos, associado a doenças epiteliais, sendo primariamente conhecido como agente causador da epidermite exsudativa, mas que também já foi isolado de bovinos com mastite subclínica, infecções em equinos e em humanos (CASANOVA et al., 2011; STEPHAN et al., 2008). Durante a rotina diagnóstica laboratorial, *S. hyicus* pode ser erroneamente identificado como *S. aureus* ou algum estafilococo coagulase-negativo. Por outro lado, assim como *S. aureus*, *S. hyicus* é muitas vezes coagulase-positivo (CASANOVA et al., 2011).

*Staphylococcus agnetis* também compreende isolados coagulase-positivos (20-25% dos isolados, após 24 horas) e negativos, detectados no leite de bovinos com mastite (TAPONEN et al., 2012), assim como *S. hyicus*. Já *S. schleiferi* subsp. *coagulans* vem ganhando importância clínica veterinária por ser o agente responsável por otites e piодermites, com maior relevância em cães (YAMASHITA et al., 2005). *S. lutrae* foi descrito em 1997 por Foster e colaboradores como uma espécie de ECP isolada de lontras.

Por fim, o outro grande grupo de bactérias pertencentes a este gênero compreende as muitas espécies de estafilococos coagulase-negativos (ECN), podendo ser divididas em dois grupos, dependendo da sensibilidade à novobiocina. *Staphylococcus* sensíveis à novobiocina incluem *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e os resistentes são as espécies *S. saprophyticus* e *S. xylosus* (LONGAUEROVA, 2006; VON EIFF et al., 2005; HEILMANN; PETERS, 2000). Durante muito tempo, as espécies de ECP eram implicadas como patogênicas, enquanto as espécies de ECN eram consideradas saprófitas e raramente patogênicas. Nos últimos anos, entretanto, a importância das espécies de ECN implicadas em infecções animais, como por exemplo, na mastite bovina, tem aumentado, pois compõem a microbiota natural da pele e mucosa destes animais, ordenhadores, além de estarem presentes no ambiente no qual o animal está inserido (SOARES et al., 2008).

## **2.2 *Staphylococcus* coagulase-positivos e a mastite bovina**

A mastite bovina é uma reação inflamatória primariamente causada por diferentes patógenos que adentram o canal do teto e alcançam a glândula mamária (CAPURRO, 2009). Pode ser também de origem tóxica, traumática, alérgica e metabólica, mas é mais frequentemente infecciosa (FONSECA; SANTOS, 2000), sendo reconhecida como uma das principais doenças que afetam a rentabilidade das explorações leiteiras, uma vez que é associada à redução na produção e mudanças na composição do leite (BRADLEY, 2002). Além disso, representa um risco para a saúde pública pela possibilidade de transmissão de microrganismos patogênicos, toxinas ou resíduos de antimicrobianos através do leite (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Segundo Pehlivanoglu e Yardimci (2012), cepas de

*Staphylococcus* spp. presentes no leite mastítico podem passar para humanos durante a ordenha e o processamento do leite, com potencial para causar infecções.

Entre os agentes de origem infecciosa, *Staphylococcus* spp. são as bactérias mais frequentemente isoladas (MOTA et al. 2012; TAPONEN; PYÖRÄLÄ 2009). Como já abordado, este gênero apresenta uma relação de comensalismo com o hospedeiro, estando presente na pele e algumas mucosas de forma equilibrada, sem causar danos. Entretanto, adquirem potencial patogênico se tiverem acesso aos tecidos pelo rompimento da barreira cutânea, através de microfissuras no teto da vaca causadas por processos traumáticos, sendo 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, podem levar à formação de microabcessos, que ao romperem-se num momento de maior fragilidade do sistema imunológico do animal, liberam o microrganismo, caracterizando as infecções de longa duração, com tendência a cronicidade e baixas taxas de cura que são próprias destes agentes (SABOUR et al., 2004).

A mastite bacteriana pode ser de duas origens: ambiental ou contagiosa. Na primeira, a infecção ocorre no período entre ordenhas e os principais agentes envolvidos são patógenos ambientais oportunistas que estão presentes no habitat dos animais, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas, com destaque para a espécie *Escherichia coli* (BEAUDEAU et al., 2002); Na segunda, a infecção ocorre durante a ordenha (SOMMERHÄUSER et al., 2003; SVILAND; WAAGE, 2002), sendo causada por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos. Os agentes mais envolvidos são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. (BRITO et al., 2000).

A mastite bovina também pode apresentar-se de duas formas: clínica, na qual 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); e subclínica, na qual 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, sódio e de proteínas séricas, além da diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (GIANOLA et al., 2004), levando ao menor rendimento na produção de seus derivados e diminuição do tempo de prateleira do produto (BRADLEY et al., 2002). Estudos revelaram que a redução na produção do leite é decorrente de alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade do alvéolo secretor durante a infecção (FONSECA; SANTOS, 2000; COSTA et al., 2000).

Entre as espécies de ECP isoladas a partir de mastite bovina estão *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, contudo, durante a rotina diagnóstica, as demais espécies de ECP tendem a ser erroneamente diagnosticadas como *S. aureus*, sendo *S. hyicus* e *S. intermedius* raramente identificados (CAPURRO, 2009). *Staphylococcus aureus* ainda é considerado um dos agentes etiológicos mais comumente associados a infecções clínicas e subclínicas em vacas em lactação, cujo principal reservatório deste agente parece ser o quarto mamário infectado e cuja transmissão geralmente ocorre durante a ordenha (SAEI, 2012), pela contaminação de máquinas, equipamentos ou mãos dos ordenhadores (SAKWINSKA et al. 2011).

Durante a última década, estudos moleculares têm descrito a estrutura e a diversidade da população de *S. aureus* causadores de mastite bovina (COSTA et al., 2012; HASMAN et al., 2010; IKAWATY et al. 2009; SMYTH et al., 2009; JØRGENSEN et al., 2005). Costa e colaboradores (2012) revelaram, no entanto, que apesar da grande diversidade de *S. aureus*

envolvidos na etiologia das mastites, existem clones predominantes que causam a maioria das infecções dos rebanhos leiteiros.

### 2.3. Identificação de *Staphylococcus* coagulase-positivos

Membros do gênero *Staphylococcus* são historicamente classificados e diferenciados com base na variedade de suas características fenotípicas, como morfologia de colônias e reações bioquímicas que realizam (CAPURRO, 2009). O número de relatos de infecções causadas por este agente é crescente, assim como a descoberta de novas espécies e subespécies deste gênero, tornando necessária a correta identificação dos isolados provenientes de amostras clínicas (BARROS et al., 2007; BECKER et al., 2004).

Diversos métodos de identificação de *Staphylococcus* spp. estão disponíveis atualmente, mas testes bioquímicos convencionais, como os preconizados por Koneman e colaboradores (2008), são considerados padrão para confirmação fenotípica das espécies. Sistemas comerciais e *kits* automatizados encontram-se no mercado (SANTOS et al., 2008), e são amplamente utilizados por inúmeros laboratórios. Todavia, a interpretação dos resultados pode ser subjetiva, levando a erros, além de possuírem baixa acurácia devido ao limitado número de testes bioquímicos que possuem, reduzindo assim a quantidade de espécies detectáveis (ZADOKS; WATTS, 2009).

A taxonomia do gênero *Staphylococcus* foi melhor esclarecida nos últimos anos, graças ao emprego de técnicas moleculares que permitiram relacionar ou comparar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos (LANGE et al., 2011). Novas espécies foram descritas (DEVRIESE et al., 2005; FOSTER et al., 1997) e reclassificações ocorreram (SASAKI et al., 2007). Tendo em vista a importância da correta identificação de amostras clínicas pelos laboratórios de diagnóstico clínico, marcadores moleculares têm sido cada vez mais utilizados a fim de se obter uma caracterização da espécie mais confiável e precisa, uma vez que tais técnicas são mais sensíveis e específicas (BLAIOTTA et al., 2010).

Entre esses métodos, a análise comparativa das sequências de determinados genes conservados tem sido empregada com a finalidade taxonômica e filogenética, como por exemplo, o sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S, que é altamente conservado entre as espécies (LANGE et al., 2011). As sequências são comparadas às depositadas em bancos de dados internacionais, como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

O sequenciamento do gene *rrs*, que codifica um componente da subunidade 30S de ribossomos procariotos, também tem possibilitado uma identificação acurada das espécies para diversos gêneros. Porém, técnicas como esta são relativamente onerosas e consomem bastante tempo (SALGADO, 2013). Deste modo, reações de polimerase em cadeia (PCR) da região intergênica 16-23S e iniciadores espécie-específicos surgem como alternativas (JOUSSON et al., 2007).

Técnicas que utilizam oligonucleotídeos (iniciadores), os quais amplificam sequências específicas para uma determinada espécie são amplamente utilizadas por muitos laboratórios. Diversos genes para identificação bacteriana estão disponíveis na literatura, dentre eles os genes *hsp60*, *tuf*, *femA*, *orfX*, *Sa442*, *rpoB*, *sodA*, *dnaJ* e *nuc* (BODE et al., 2012; AL-TALIB et al., 2009; REISCHL et al., 2009; GHEBREMEDHIN et al., 2008; SHAH et al., 2007; VOYTENKO et al., 2006), além dos genes como *nuc*, 23S rDNA e *coa*, de *S. aureus*, que podem ser usados para identificação da espécie (CIFTCI et al., 2009; STRAUB et al., 1999; HOOKEY et al., 1998).

A discriminação entre espécies de ECP baseada em diferenças fenotípicas é difícil, devido à ausência de marcadores bioquímicos únicos para a identificação de espécies

(BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; SASAKI et al., 2010). Neste sentido, Sasaki e colaboradores (2010) desenvolveram uma PCR *multiplex* (M-PCR) que pode ser utilizada por laboratórios para a identificação das espécies de ECP de relevância clínica na Medicina Veterinária. Este método mostrou-se sensível (99,8%) e específico (100%), e é baseado na amplificação dos genes *nuc*, codificador da termonuclease, nas diferentes espécies.

Outro método utilizado para identificação de espécies de ECP é a técnica de PCR associada ao polimorfismo dos tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP-PCR), que tem sido padronizada para os mais diversos genes nos últimos anos e possui alguns alvos moleculares, como por exemplo, o gene *pta* (BANNOEHR et al., 2009), *kat* (BLAIOTTA et al., 2010) e o gene *groEL* (BARROS et al., 2007).

Atualmente, outra técnica está sendo introduzida em laboratórios de diagnóstico humanos e animais, devido ao seu custo-benefício e abordagem rápida e precisa (BANNOEHR et al., 2012). A espectrometria de massa MALDI-TOF MS, ou Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz, vem ganhando destaque na literatura pelo uso na identificação de diferentes microrganismos ao nível de espécies. Vantagens como quantidade mínima de amostra necessária para identificação, baixo custo, níveis insignificantes de resíduos químicos e biológicos gerados e tempo para obtenção de resultados extraordinariamente curto (ALATOOM et al., 2011; CARBONNELLE et al., 2011; CHERKAOUI et al., 2010), atraem bastante atenção para esta ferramenta.

Os resultados produzidos por esta ferramenta são de elevada acurácia em relação à identificação de espécies dentro dos diversos gêneros bacterianos (ILINA et al., 2009; NAGY et al., 2009; BARBUDDHE et al., 2008; FRIEDRICHS et al., 2007; PIGNONE et al., 2006), possibilitando assim, uma correta identificação bacteriana, mesmo em culturas mistas (BIZZINI; GREUB, 2010). Os espectros, que são gerados após o processamento pelo equipamento e análise pelo programa, são então comparados aos de cepas de referência de seu banco de dados, permitindo a identificação do microrganismo. Na identificação das espécies do grupo SIG, foram encontrados elevados valores de especificidade (95%) e sensibilidade (100%) (DECRISTOPHORIS et al., 2011). Para *Staphylococcus aureus*, a identificação por MALDI-TOF MS de isolados clínicos também tem demonstrado ser acurada (BÖHME et al., 2012).

## 2.4 Resistência aos beta-lactâmicos

A relevância dos *Staphylococcus* como patógenos em diversos quadros infecciosos, também relaciona-se com sua considerável resistência aos antimicrobianos. Esta resistência tem sido desenvolvida, principalmente, devido ao uso inapropriado destes fármacos em humanos e animais, propiciando a seleção de isolados multirresistentes, e o conseqüente comprometimento da eficiência do tratamento das enfermidades causadas por esses microrganismos (BARBERIO et al., 2002).

A mastite é a maior responsável pelo uso de antibacterianos em fazendas leiteiras, sendo as cefalosporinas, penicilinas e suas combinações, aminoglicosídeos, lincosamidas e macrolídeos, os antimicrobianos mais comumente administrados, tanto durante o período de lactação quanto no período seco, para o tratamento e prevenção da mastite (SAINI et al., 2012a; SAEI et al., 2012). Entretanto, independentemente da droga utilizada, a baixa taxa de cura é comum em mastites causadas por *S. aureus*, e a resistência é considerada a principal razão para isso (SAINI et al., 2012b; BARKEMA et al., 2006). Há uma forte preocupação quanto ao surgimento de bactérias resistentes em ambientes de produção animal, uma vez que,

devido ao uso constante de antimicrobianos, a pressão de seleção sobre estes microrganismos é bastante elevada.

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

Resistência à oxacilina, que representa um marcador para avaliação da resistência cruzada com os demais antimicrobianos desta classe, foi primeiramente descrita em 1961, entre isolados de *S. aureus* de infecções nosocomiais (JEVONS et al., 1961). O primeiro *Staphylococcus aureus* meticilina (ou oxacilina) resistente (MRSA/ORSA) isolado de animais surgiu em 1972, detectado em leite de vacas com mastite (DEVRIESE et al., 1972). Isto pode ter ocorrido devido à transferência horizontal de MRSA, a partir das mãos dos ordenadores colonizados ou infectados, e seleção pelo uso de antimicrobianos para o tratamento da mastite (MORGAN, 2008). Desde então, diferentes espécies de animais domésticos têm sido implicadas como potenciais reservatórios de bactérias pertencentes a este gênero (LEONARD; MARKEY 2008; VENGUST et al., 2006; BAPTISTE et al., 2005).

Esta resistência deve-se principalmente a dois mecanismos distintos: a produção da enzima beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção da proteína ligante de penicilina adicional de baixa afinidade (PBP2a), a qual é codificada pelo gene *mecA* e regulada pelos genes *mecI* e *mecRI*. PBP2a determina resistência à oxacilina devido de sua afinidade reduzida a beta-lactâmicos, podendo realizar as reações de transpeptidação quando as PBPs normais estão bloqueadas pela droga. Isto que permite a síntese do peptidoglicano, para formação da parede celular bacteriana, continue normalmente (PEHLIVANOGLU et al., 2012). Este mecanismo confere resistência a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, que são comumente utilizados no tratamento da mastite.

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, denominado “cassete cromossômico estafilocócico *mec*” (SCC*mec*), de diferentes tipos, que pode ser transferido via plasmídeo, transposons ou elementos genéticos móveis, e se integrar a ilhas de patogenicidade no genoma bacteriano (KATAYAMA et al., 2001). O cassete *mec* carrega outros elementos genéticos como *Tn554*, pUB110 e pT181, que codificam resistência às outras classes de antimicrobianos. Por exemplo, os genes *erm*, que são os responsáveis pela resistência cruzada, expressa de maneira constitutiva ou induzida, a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>), estão localizados no *Tn554*, presente no SCC*mec* tipos II e III (ROBERTS, 2008; ITO et al., 2001). A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp., e dos elementos genéticos inseridos no SCC*mec*, resultou então 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). Isto poderia explicar porque muitos isolados MRSA são também resistentes a antimicrobianos não beta-lactâmicos que agem por mecanismos não relacionados à interferência na síntese da parede celular (COHN et al., 2010).

Sabe-se, no entanto, após pesquisa desenvolvida por Melo e colaboradores (2013), que em *Staphylococcus* de origem bovina, o gene *mecA* apresenta mutações e particularidades que limitam sua detecção e que muitos isolados não expressam fenotipicamente a resistência à oxacilina. Neste estudo, iniciadores construídos a partir de sequências do gene *mecA* obtidos de estafilococos isolados de origem animal possibilitaram a amplificação deste gene em *S. aureus* de origem bovina, o que não havia sido possível com os iniciadores construídos a

partir de sequências de MRSA de origem humana, propostos por Murakami e colaboradores (MELO et al 2013; MURAKAMI et al.1991). O estudo demonstrou que diferenças pontuais, mas significativas, na sequência de alinhamento impediam o anelamento dos iniciadores e, conseqüentemente, a amplificação do gene.

Cepas MRSA já foram identificadas em diferentes ambientes, recebendo nomenclaturas específicas. As cepas associadas a infecções hospitalares, que se tornaram frequentes a partir da década de 70 e endêmicas em diversos países, são denominadas HA-MRSA (DIEKEMA et al., 2002). No final da década de 90, uma nova geração de MRSA surgiu repentinamente na comunidade, sendo denominada MRSA adquirida na comunidade (CA-MRSA). Mais recentemente, foi identificada uma cepa de *S. aureus* resistente à oxacilina colonizando populações animais, possivelmente favorecida pela ampla utilização de antibióticos. Denominada “*livestock-associated MRSA*” (LA-MRSA), esta cepa surgiu primeiramente em suínos (KHANNA et al., 2008), mas também têm sido descrita em outros animais como cães, cavalos, aves, gado e também humanos (HASMAN et al., 2010; HUBER et al., 2010; LOEFFLER; LLOYD, 2010; CUNY et al., 2008).

Os perfis de resistência aos antimicrobianos são parte do conhecimento epidemiológico e constitui informação chave para a tomada de decisões quanto à estratégia terapêutica (SAKWINSKA et al., 2011). Apesar do pouco conhecimento sobre MRSA isolado de gado leiteiro, muitos estudos sugeriram que a prevalência de resistência em *S. aureus* oriundos de mastite bovina é geralmente baixa (BOTREL et al., 2010; BENGTSON et al., 2009; MONECKE, et al., 2007), no entanto, fenótipos multirresistentes e MRSA têm sido frequentemente descritos (FESSLER et al., 2010; VANDERHAEGHEN et al., 2010a).

Emergência de MRSA no gado leiteiro pode complicar o tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*, além do potencial risco da transmissão desses para o homem (BARDIAU et al., 2013). Além de *S. aureus*, outras espécies de ECP podem apresentar resistência à oxacilina. Muito recentemente, Pilla e colaboradores (2013), reportaram o primeiro caso conhecido na literatura de *S. pseudintermedius* resistente à oxacilina (MRSP) isolado de mastite bovina em um rebanho na Itália.

A identificação das espécies de ECP que infectam não só o gado leiteiro, como também outros animais, precisa ser executada com precisão em laboratórios de diagnóstico veterinário, uma vez que os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) da oxacilina, os discos de antimicrobianos usados como marcadores fenotípicos da resistência, o tempo de incubação dos isolados e os halos de inibição que determinam resistência a esta classe, diferem entre as espécies do gênero *Staphylococcus* (CLSI VET01-A4, 2013; SASAKI et al., 2010). Por exemplo, o antimicrobiano preconizado para a predição da resistência estafilocócica mediada pelo gene *mecA* na prova de disco difusão é a cefoxitina (30 µg), quando são avaliados *S. aureus* e ECN. Já para *S. pseudintermedius*, é recomendado o uso do disco de oxacilina (10 µg) (CLSI VET01-A4, 2013). Além disto, existe a preocupação a cerca do potencial de animais domésticos, equinos e animais de produção atuarem como reservatórios de MRSA para os seres humanos.

As recentes mudanças na taxonomia e emergência de resistência à oxacilina em isolados de outras espécies de ECP, como por exemplo *S. pseudintermedius*, vêm provocando mudanças significativas na identificação dos isolados e detecção da resistência. Neste sentido, a identificação precisa das espécies tornou-se fundamental para uma correta avaliação da resistência, uma vez que os métodos para esta detecção variam de acordo com a espécie de *Staphylococcus* avaliada, representando assim um desafio para a Medicina Veterinária.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral:

Caracterizar espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos previamente isoladas a partir de amostras de leite e sua cadeia produtiva, por meio de técnicas genotípicas e proteômica, bem como avaliar sua resistência fenotípica aos beta-lactâmicos e a presença dos genes envolvidos.

### 3.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar, fenogenotipicamente, *Staphylococcus* coagulase-positivos presentes em amostras provenientes de leite e sua cadeia produtiva, por meio de diferentes técnicas;
- Desenvolver, utilizando a técnica MALDI-TOF MS como método de referência, um protocolo para identificação de *S. aureus*;
- Avaliar a suscetibilidade das espécies encontradas a antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, através da leitura interpretativa dos antibiogramas;
- Identificar os genes que determinam a resistência aos beta-lactâmicos;
- Elaborar perfis de resistência aos beta-lactâmicos, para estabelecer correlações entre as análises genotípicas e fenotípicas desta resistência.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

Foram utilizados 291 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de 512 amostras de leite de vacas com mastite e 33 amostras de mãos e narinas dos ordenhadores e utensílios utilizados durante a ordenha. As amostras são provenientes de propriedades localizadas nos municípios de Barra do Piraí, Seropédica, Vassouras, Paraíba do Sul, Rio das Flores, Carmo e Passa Três (Rio de Janeiro) (Tabela 1). A coleta foi realizada no período de 2012 a 2013, pelo grupo de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em parceria com o Médico Veterinário Pedro Emílio Rodrigues Ferreira, responsável pela assessoria veterinária a estas propriedades.

**Tabela 1.** Relação das propriedades, suas respectivas cidades, vacas em lactação, vacas com mastite e número de amostras.

| Fazenda | Município      | Lactação | Mastite | Mastite (%) | Amostras |        | Total |
|---------|----------------|----------|---------|-------------|----------|--------|-------|
|         |                |          |         |             | Leite    | Cadeia |       |
| A       | Barra do Piraí | 241      | 50      | 21%         | 96       | 6      | 102   |
| B       | Seropédica     | 25       | 15      | 60%         | 24       | 3      | 27    |
| C       | Vassouras      | 37       | 3       | 8%          | 24       | 3      | 27    |
| D       | Paraíba do Sul | 42       | 31      | 74%         | 40       | 3      | 43    |
| E       | Rio das Flores | 62       | 35      | 56%         | 56       | 3      | 59    |
| F       | Carmo          | 160      | 78      | 49%         | 152      | 6      | 158   |
| G       | Vassouras      | 12       | 8       | 67%         | 24       | 3      | 27    |
| H       | Passa Três     | 70       | 38      | 54%         | 56       | 3      | 59    |
| I       | Barra do Piraí | 30       | 26      | 87%         | 40       | 3      | 43    |

As amostras foram coletadas considerando os resultados dos testes para identificação de mastite clínica (exame físico da glândula mamária e teste da caneca telada) e subclínica (CMT – “*California Mastitis Test*”). Estes testes foram realizados em todos os quartos mamários dos animais em lactação, imediatamente antes da ordenha. Um volume de aproximadamente 10 mL de leite foi coletado de 20% dos animais considerados positivos, por ordenha manual e individual, em frasco coletor estéril, utilizando-se álcool 70% para a antissepsia dos tetos e mãos. A coleta de amostras provenientes de mãos dos ordenhadores e utensílios utilizados durante a ordenha destas fazendas foi realizada através de *swabs* estéreis. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ, onde foram processadas e estocadas.

### 4.2. Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

As amostras foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento primário em ágar Columbia Base (Merck®) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. 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 de *Staphylococcus* spp., através da observação das características das colônias e fermentação, ou

não, do manitol (KONEMAN et al., 2008). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintoriais.

#### **4.2.1 Prova do hidróxido de potássio (KOH) 3% e prova da catalase**

A prova do hidróxido de potássio foi efetuada através da adição de um fragmento da colônia bacteriana a uma gota de KOH a 3%, sobre uma lâmina. A não formação de um gel viscoso indicou um resultado negativo. No teste da catalase, um fragmento de colônia bacteriana foi adicionado a algumas gotas de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A formação de bolhas indicou teste positivo e presença da enzima catalase (KONEMAN et al., 2008).

#### **4.2.2 Prova da coagulase**

O teste para detecção da coagulase foi realizado, utilizando o crescimento bacteriano obtido em caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI - Britania®), incubado a 37°C por 24 horas. Uma alíquota de 200 µL de cada amostra foi adicionada a 200 µL de plasma de coelho (Larboclin®), seguida de incubação a 37°C por 6 horas, para visualização do coágulo. Amostras coagulase-negativas foram avaliadas quanto ao seu perfil de resistência à bacitracina (KONEMAN et al., 2008).

#### **4.2.3 Resistência à bacitracina**

Os *Staphylococcus* coagulase-negativos apresentam características semelhantes ao gênero *Micrococcus* spp., com relação à morfologia, coloração de Gram e às provas da catalase, KOH (3%) e coagulase, e são necessárias provas adicionais para sua diferenciação. Para isso, foi utilizada a prova da bacitracina. Uma suspensão bacteriana (1 mL) incubada por 24 horas em caldo BHI (Britania®) foi distribuída por toda a superfície de uma placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton, com o auxílio de um *swab*. Um disco de bacitracina 0,04 UI (SENSIFAR - CEFAR®) foi depositado sobre a superfície do meio, contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 35 °C ± 2°C, a zona de inibição ao redor do disco foi observada e medida. Os estafilococos são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococos são sensíveis e apresentam halo de, no mínimo, 10 mm (KONEMAN et al., 2008). Ao resultado da prova da coagulase, os isolados positivos foram selecionados, encaminhados para identificação fenotípica das espécies (KONEMAN et al., 2008) e estocados em caldo BHI acrescido de 45 % de glicerol para análises complementares. Apesar de não ser o objeto de estudo do presente trabalho, os isolados negativos a esta prova também foram estocados caldo BHI em acrescido de 45 % de glicerol para análises complementares.

#### **4.2.4 Prova de Voges-Proskauer e fermentação de maltose e manose**

As amostras de *S. aureus* foram bioquimicamente identificados através das provas de Voges-Proskauer (VP), fermentação da maltose e manose (KONEMAN et al., 2008).

A prova de Voges-Proskauer foi realizada utilizando-se o caldo MR-VP. A utilização da glicose, apresentando como produto final a acetoína é indicada pela coloração rosa após a adição de 0,1 mL de α-naftol a 5% e 0,3 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 horas a 37°C.

A fermentação dos açúcares maltose e manose 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 consequente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas à temperatura de 37 °C. A espécie *S. aureus* foi identificada pela positividade aos três testes utilizados.

### **4.3 Caracterização genotípica de *Staphylococcus* coagulase-positivos**

Os isolados foram reativados em ágar BHI e posteriormente submetidos à extração de DNA total para as análises genotípicas, bem como os isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos. A avaliação genotípica dos isolados deu-se no Laboratório de Genética de Microrganismos, do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

#### **4.3.1 Extração do DNA total bacteriano**

Para a extração do DNA bacteriano, foi realizada metodologia padronizada e estabelecida pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ. Cada isolado foi cultivado em 5 mL de Caldo BHI à temperatura ambiente por 12-16 horas a 150 rpm. Em seguida 1,5mL da cultura foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, centrifugados por 5 minutos a 12.000 RPM e o sobrenadante descartado, esta etapa foi repetida três vezes. As células foram resuspendidas em 600 µL de solução de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em Vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 minutos, adição de igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 13.000 RPM por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e foram adicionados 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 horas para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 13.000 RPM por 30 min, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco à temperatura ambiente em uma capela de exaustão, os sedimentos foram então suspensos em 30 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM).

Para quantificação, o DNA extraído foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelado com SYBR Green (Invitrogen®) pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade de banda do marcador Lambda ( $\lambda$ ) (Promega®), nas concentrações de 25 e 50 ng e a qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

#### **4.3.2 Detecção dos genes pela PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para identificação de *S. aureus***

Para detecção dos genes utilizados na caracterização de *Staphylococcus aureus* foram realizadas reações de PCR, cujas concentrações foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> - Fermentas®), 0,3 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Thermo Scientific®), 1 U de *Taq* polimerase (Fermentas®), água ultrapura para completar um volume total de reação (20 µL) e 2 µL do DNA total extraído e quantificado conforme item 4.3.1. Isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivos

e negativos foram submetidos a esta detecção, que teve como controle a cepa padrão *S. aureus* ATCC 29213.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 60 min.) e revelados com corante SYBR *Green* (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Thermo Scientific®).

A caracterização genotípica foi realizada pela detecção dos genes utilizando iniciadores específicos para o gênero *Staphylococcus* (ZHANG et al., 2004) e para a espécie *Staphylococcus aureus* (HOOKEY et al., 1998; STRAUB et al., 1999; CIFTCI et al., 2009 (Quadro 1).

**Quadro 1.** Iniciadores e condições de amplificação para identificação de espécies de *Staphylococcus aureus*.

| Gene (fragm).         | Espécie                    | Sequência dos iniciadores (5'-3')                                | Ciclo* | Referência          |
|-----------------------|----------------------------|--|--------|---------------------|
| 16S rRNA (756 pb)     | <i>Staphylococcus</i> spp. | AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA<br>CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC | 1      | ZHANG et al., 2004  |
| 23S rRNA (1250 pb)    | <i>S. aureus</i>           | ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC<br>AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC         | 1      | STRAUB et al., 1999 |
| <i>coa</i> (Variável) | <i>S. aureus</i>           | ATA GAG ATG CTG GTA CAG G<br>GCT TCC GAT TGT TCG ATG C           | 2      | HOOKEY et al., 1998 |
| <i>nuc</i> (279 pb)   | <i>S. aureus</i>           | GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT<br>AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC   | 3      | CIFTCI et al., 2009 |

\*1. 94°C 5min (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10 min; 2. 94°C 4 min (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5 min; 3. 94°C 5 min (94°C 45 s, 68°C 45 s e 72°C 90 s) x 30 e 72°C 10 min.

#### 4.3.3 Sequenciamento do gene 23S rRNA

Os produtos de PCR das reações de 23S rDNA (*S. aureus*) de alguns de isolados foram purificados utilizando a Illustra ExoStar (GE Healthcare®), conforme recomendação do fabricante. A fita *forward* foi sequenciada pela empresa Helixxa, Campinas (São Paulo), para confirmação da espécie.

As sequências foram editadas utilizando o programa Bioedit (HALL, 1999) e comparadas com outras sequências depositadas neste banco de dados do NCBI (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997).

#### 4.3.4 M-PCR dos genes *nuc* para caracterização de outros *Staphylococcus coagulase positivos*

As espécies de ECP envolvidas em quadros infecciosos precisam ser corretamente identificadas pelos laboratórios de diagnóstico veterinário. Com a finalidade de caracterizar as demais espécies de ECP, a técnica de PCR *multiplex* (M-PCR) dos genes *nuc* desenvolvida por Sasaki e colaboradores (2010) foi escolhida pelo seu poder discriminatório e elevada sensibilidade (99,8%) e especificidade (100%) (Quadro 2). As concentrações utilizadas foram: tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> - Fermentas®), 0,3 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP (Thermo Scientific®), 1

U de *Taq* polimerase (Fermentas®), água ultrapura para completar um volume total de reação (20 µL) e 2 µL do DNA total extraído e quantificado conforme item 4.3.1.

**Quadro 2.** Iniciadores empregados e condições detecção para identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos.

| Gene (fragm.)           | Espécie   | Seqüência dos iniciadores (5'-3')                                       | Ciclo* |
|-------------------------|---|---|--------|
| <i>nuc</i><br>(359 pb)  | <i>S. aureus</i>                                | TCG CTT GCT ATG ATT GTG G<br>GCC AAT GTT CTA CCA TAG C                  | 1      |
| <i>nuc</i><br>(430 pb)  | <i>S. intermedius</i>                           | CAT GTC ATA TTA TTG CGA ATG A<br>AGG ACC ATC ACC ATT GAC ATA TTG AAA CC | 1      |
| <i>nuc</i><br>(526 pb)  | <i>S. schleiferi</i> subsp.<br><i>coagulans</i> | AAT GGC TAC AAT GAT AAT CAC TAA<br>CAT ATC TGT CTT TCG GCG CG           | 1      |
| <i>nuc</i><br>(661 pb)  | <i>S. delphini</i> grupo A                      | TGA AGG CAT ATT GTA GAA CAA<br>CGR TAC TTT TCG TTA GGT CG               | 1      |
| <i>nuc</i><br>(1135 pb) | <i>S. delphini</i> grupo B                      | GGA AGR TTC GTT TTT CCT AGA C<br>TAT GCG ATT CAA GAA CTG A              | 1      |
| <i>nuc</i><br>(793 pb)  | <i>S. hyicus</i>                                | CAT TAT ATG ATT TGA ACG TG<br>GAA TCA ATA TCG TAA AGT TGC               | 1      |
| <i>nuc</i><br>(926 pb)  | <i>S. pseudintermedius</i>                      | TRG GCA GTA GGA TTC GTT AA<br>CTT TTG TGC TYC MTT TTG G                 | 1      |

\*1. 95°C 2min (95°C 30seg, 56°C 35seg e 72°C 1min) x 30 e 72°C 2min.

Como controles, foram utilizadas as cepas padrão *S. aureus* ATCC 29213, *S. intermedius* ATCC 29663, *S. hyicus* 5368 e *S. schleiferi* 3975, sendo estas duas últimas bioquimicamente identificadas e gentilmente cedidas pela professora Marcia Giambiagi de-Marval, do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, UFRJ.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (80 V por 60 min.) e revelados com corante SYBR Green (Invitrogen®) diluído (1:100), possibilitando a visualização e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação, utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Thermo Scientific®).

#### 4.4 Identificação por MALDI-TOF MS

Após a identificação fenotípica, a análise proteômica por MALDI-TOF MS foi realizada com a finalidade de avaliar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, além da aplicabilidade dos métodos genotípicos utilizados no presente estudo. Esta técnica foi selecionada por ser uma ferramenta que proporciona resultados rápidos e precisos. Setenta e dois isolados foram avaliados pela técnica do Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF) no Laboratório Integrado de Microbiologia (LIM), Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para o preparo das amostras, isolados foram cultivadas em ágar BHI a 37 °C por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida, 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser

de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e, posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que quanto maior o valor, mais confiável é a identificação. Neste trabalho, consideraram-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores iguais ou superiores a dois.

#### **4.5. Caracterização fenotípica da suscetibilidade aos antimicrobianos**

##### **4.5.1 Preparo do inóculo**

###### **4.5.1.1 Método de Suspensão Direta das Colônias**

Os testes de detecção fenotípica da resistência foram executados conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2013) com padrões para bactérias isoladas de animais. Após 18 a 24 horas de incubação a 35°C em ágar nutritivo não seletivo, as colônias foram suspensas em caldo Müeller-Hinton até se obter uma turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração de, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  microrganismos/mL (CLSI VET01-A4, 2013).

Para comparação e controle dos testes foram utilizadas as cepas padrão *S. aureus* ATCC 43300 e *S. aureus* ATCC 29213.

###### **4.5.2 Difusão em disco para avaliação de *Staphylococcus* coagulase-positivos quanto à suscetibilidade aos beta-lactâmicos**

Os testes de difusão em disco para predição de resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA*, sensibilidade à penicilina e avaliação da *zone edge* para detecção da produção de beta-lactamases, além da avaliação do perfil de suscetibilidade à amoxicilina + ácido clavulânico foram realizados em uma mesma placa de Petri, através da semeadura dos isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície de placas contendo ágar Müeller-Hinton, seguido da deposição dos discos de cefoxitina (30 µg), oxacilina (10 µg), penicilina (10 UI) e amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg). Após incubação a 35°C ± 2°C por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados (Tabela 2) (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013). O objetivo desta avaliação foi detectar resistência e prever o possível mecanismo envolvido, a partir de uma leitura interpretativa dos resultados.

**Tabela 2:** Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição aos antimicrobianos testados.

| Espécie                    | Disco de antimicrobiano | Halos de Inibição (mm) |   |      |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|---|------|
|                            |                         | S                      | I | R    |
| <i>S. aureus</i>           | CFO (30 µg)             | ≥ 22                   | - | ≤ 21 |
| Outros ECPs                | OXA (10 µg)             | ≥ 18                   | - | ≤ 17 |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | PEN (10 UI)             | ≥ 29                   | - | ≤ 28 |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | AMC (30 µg)             | ≥ 20                   | - | ≤ 19 |

\*S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente. Fonte: CLSI VET01-A4, 2013 e CLSI VET01-S2, 2013.

Um número menor de isolados (n=10) foi avaliado em uma análise preliminar para triagem da possível resistência a carbapenemas e cefalosporinas de primeira geração. O teste foi realizado através da semeadura dos isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície de placas de ágar Müeller-Hinton, seguido da deposição dos discos de imipenem (10 µg) e cefalotina (30 µg). Após incubação a 35°C ± 2°C por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados (Tabela 3) (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

**Tabela 3:** Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição aos antimicrobianos cefalotina e imipenem.

| Espécie                    | Disco de antimicrobiano | Halos de Inibição (mm) |       |      |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|-------|------|
|                            |                         | S                      | I     | R    |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | CFL (30 µg)             | ≥ 18                   | 15-17 | ≤ 14 |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | IPM (10 µg)             | ≥ 23                   | 20-22 | ≤ 19 |

\*S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente. Fonte: CLSI VET01-A4, 2013 e CLSI VET01-S2, 2013.

#### 4.5.3 Teste de disco aproximação para detecção da resistência induzível à clindamicina

O teste foi realizado através da semeadura dos isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície de placas de ágar Müeller-Hinton, seguido da deposição dos discos de eritromicina (15µg) aplicado a 26 mm de distância ao de clindamicina (2µg). Após incubação a 35°C por 20 a 24 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados (Tabela 4) (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013). Os isolados que apresentaram uma constrição de diâmetro nos halos de inibição ao redor do disco de clindamicina (“zona D”), próximo ao disco de eritromicina, indicaram resistência induzida à clindamicina.

**Tabela 4.** Critério interpretativo adotado para avaliação dos halos de inibição à eritromicina.

| Espécie                    | Disco de antimicrobiano | Halo de Inibição (mm) |       |     |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-------|-----|
|                            |                         | S                     | I     | R   |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | Eritromicina (15 µg)    | ≥23                   | 14-22 | ≤13 |

\*S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente. Fonte: CLSI VET01-A4, 2013 e CLSI VET01-S2, 2013.

## 4.6 Detecção genotípica da resistência aos beta-lactâmicos

### 4.6.1 Detecção dos genes de resistência à oxacilina e reguladores

Foi realizada a técnica de PCR para detecção do gene *mecA* utilizando iniciadores desenhados por Murakami e colaboradores (1991) e também os desenhados por Melo e colaboradores (2013), *mec* “Universal” e *mec* SsciuriInt. Os genes regulatórios *mecI* (LENCASTRE et al., 2002) e *mecRI* (ROSATO et al., 2003) também foram pesquisados (Quadro 3).

**Quadro 3.** Iniciadores e condições de amplificação para a detecção dos genes de resistência *mecA* e seus reguladores.

| Gene         | Iniciadores (fragm.)            | Sequência dos iniciadores (5'-3')                              | Ciclo* | Referência                      |
|--------------|---------------------------------|--|--------|---------------------------------|
| <i>mecA</i>  | <i>mec</i> “Universal” (574 pb) | ACG TTA CAA GAT ATG AAG<br>ACA TTA ATA GCC ATC ATC             | 1      | MELO et al. ( <i>in press</i> ) |
| <i>mecA</i>  | <i>mec</i> SsciuriInt (809pb)   | CAG GCA TGC AGA AAA ATC AA<br>TTG AGT CGA ACC AGG TGA TG       | 2      | MELO et al., 2013               |
| <i>mecA</i>  | <i>mecA</i> (533 pb)            | AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C<br>AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C | 3      | MURAKAMI et al.1991             |
| <i>mecI</i>  | <i>mecI</i> (209 pb)            | ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC<br>GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC       | 4      | LENCASTRE et al., 2002          |
| <i>mecRI</i> | <i>mecRI</i> (234 pb)           | CCA AAC CCG ACA ACT AC<br>CGT GTC AGA TAC ATT TCG              | 4      | ROSATO et al., 2003             |

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

### 4.6.2 Detecção do gene relacionado à produção de beta-lactamases

Foi realizada a técnica de PCR para detecção do gene *blaZ*, que codifica a produção de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp. (ROSATO et al., 2003) (Quadro 4).

**Quadro 4.** Iniciadores e condições de amplificação para a detecção do gene *blaZ*.

| Gene (tam. do fragmento) | Sequência dos iniciadores (5'-3')                        | Ciclo* |
|--------------------------|--|--------|
| <i>blaZ</i><br>(861 pb)  | TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG<br>CAT TAC ACT CTT GGC GGT TT | 1      |

\*1. 94°C 5min. (94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min.

## 4.7 Análise dos dados

A concordância entre cada gene e a identificação proteômica foi calculada pelo coeficiente Kappa de *Cohen* (programa MedCalc, v. 12.7.8). A análise de concordância Kappa foi interpretada segundo critérios descritos no Quadro 5.

**Quadro 5.** Critérios para interpretação dos valores de Kappa.

| <b>Valores de Kappa</b> | <b>Interpretação</b>   |
|-------------------------|------------------------|
| <0                      | Sem concordância       |
| 0-0.20                  | Concordância baixa     |
| 0.21-0.40               | Concordância razoável  |
| 0.41-0.60               | Concordância moderada  |
| 0.61-0.80               | Boa Concordância       |
| 0.81-1.00               | Excelente Concordância |

Fonte: LANDIS e KOCH (1977).

Foram construídas, ao longo do estudo, tabelas de perfis correlacionando os resultados genotípicos e proteômicos da detecção de *Staphylococcus aureus*, demais espécies de ECP, além dos resultados fenotípicos da detecção de resistência aos beta-lactâmicos e genes evolvíveis estudados. Os perfis de resistência aos antimicrobianos e os resultados da caracterização fengenetípica, obtidos nos diferentes testes, foram expressos em porcentagens analisadas de forma descritiva. Os percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos métodos genotípico para caracterização das espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos considerando a análise proteômica MALDI-TOF MS como método de referência. Também foram calculados os percentuais sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) do teste de zona *edge* foram calculados considerando a detecção do gene *blaZ* como padrão-ouro, 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 positivos

O quadro abaixo expressa o critério interpretativo adotado:

**Quadro 6.** Critério representativo adotado para análise do método genotípico testado.

| <b>Método analisado</b> | <b>Teste padrão-ouro</b> |                     |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|
|                         | <b>Positivo</b>          | <b>Negativo</b>     |
| <b>Positivo</b>         | Verdadeiro Positivo      | Falso Positivo      |
| <b>Negativo</b>         | Falso Negativo           | Verdadeiro Negativo |

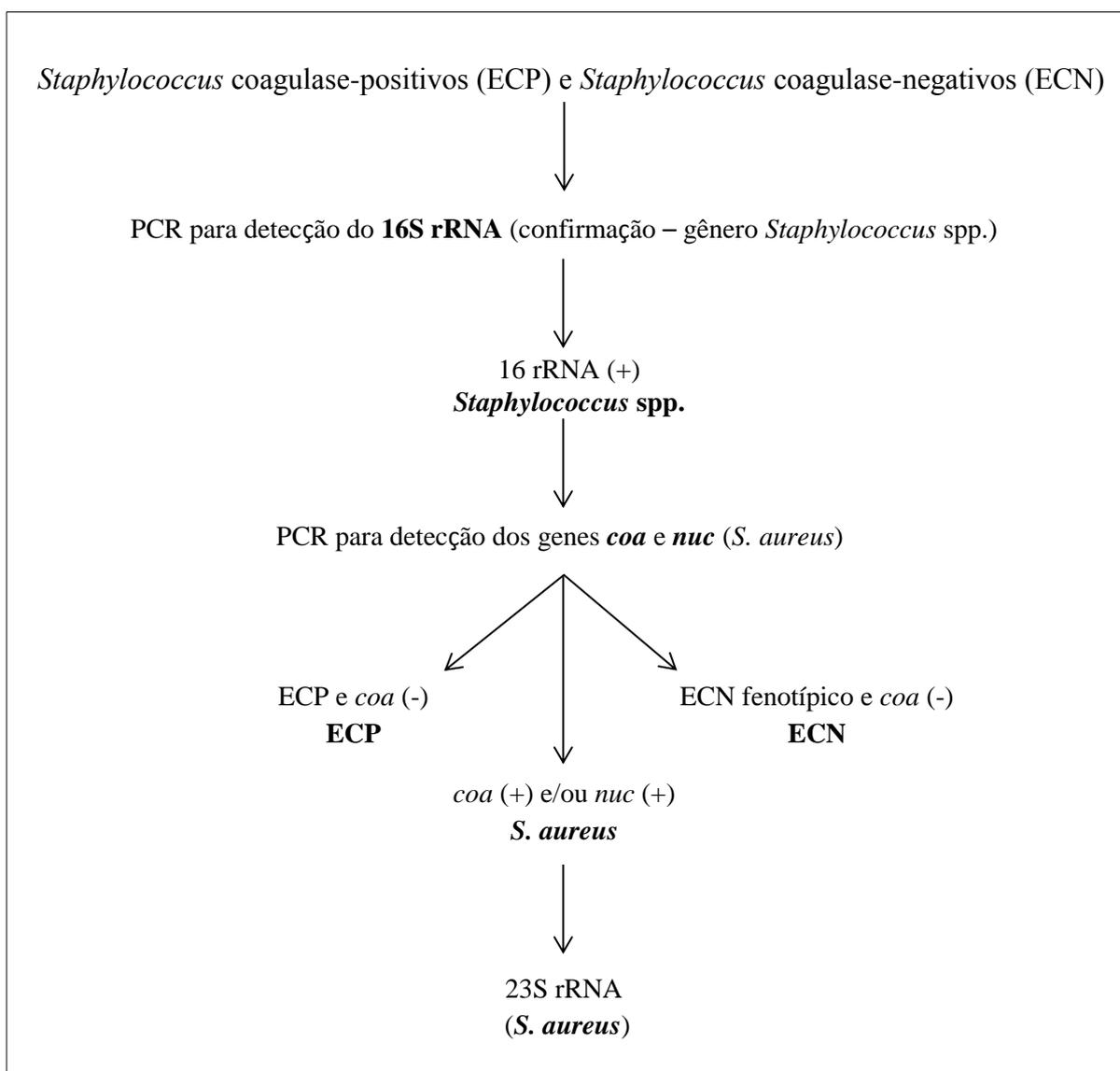
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização fenogenotípica de *Staphylococcus aureus*

Após a semeadura das 512 amostras de leite e 33 de sua cadeia produtiva, foi obtido um total de 291 *Staphylococcus* spp. Destes, 49,1% (143/291) foram positivos à prova da coagulase, sendo então identificados como *Staphylococcus* coagulase-positivos (ECP). Os demais 50,9% (148/291) foram negativos a esta prova e, presuntivamente identificados como *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECN).

A identificação fenotípica das espécies de ECP revelou que, dos 143 isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivos avaliados, 89,5% (128/143) eram *S. aureus*. Destes, um isolado era proveniente da cadeia produtiva. Para 10,5% (15/143) dos isolados, não foi possível a identificação fenotípica da espécie, sendo identificados somente como ECP.

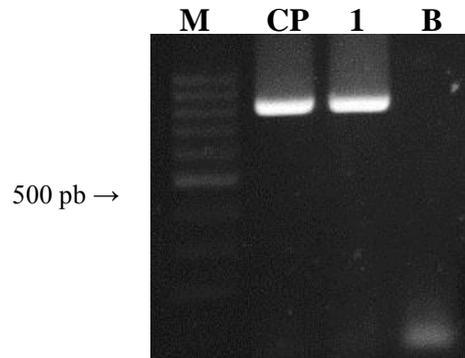
Baseado no conhecimento da existência de isolados de *S. aureus* atípicos, que não se apresentam positivos à prova da coagulase e podem ser erroneamente identificados como ECN durante a rotina diagnóstica (AKINEDEN et al., 2011; VANDENESCH et al. 1994; VANDENESCH et al. 1993; WANGER et al. 1992; NEVILLE et al. 1991; RUANE et al. 1986), todos os isolados de ECN (146/291) foram submetidos à reações de PCR para detecção de genes específicos de *S. aureus* (*coa*, *nuc* e 23S rRNA) assim como todos os de ECP (143/291) identificados no presente estudo (Figura 1). Três genes foram escolhidos para a caracterização de *S. aureus* devido à dificuldade encontrada na identificação deste agente quando somente um gene é utilizado.



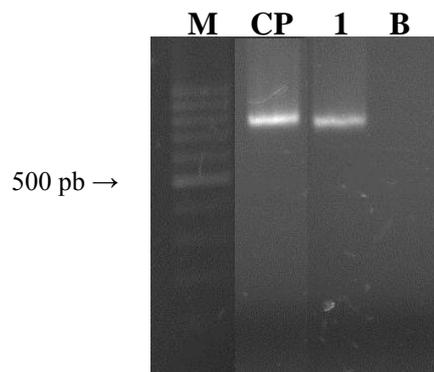
**Figura 1:** Chave de identificação proposta para diferenciação preliminar de *Staphylococcus* coagulase-positivos e *Staphylococcus* coagulase-negativos, e identificação de *S. aureus*.

Após a identificação fenotípica e extração do DNA bacteriano, todos os isolados, inclusive os ECN, foram submetidos à confirmação genotípica do gênero *Staphylococcus*, revelando que 100% (291/291) dos isolados apresentavam o gene 16S rRNA (756 pb), utilizado como marcador molecular do gênero *Staphylococcus* (Figura 2). Os genes *coa* (tamanho variável) e *nuc* (279 pb) foram detectados em 137 e 132 dos 291 isolados, respectivamente (Figuras 3 e 4). O gene 23S rRNA (1250 pb) foi detectado em 124 isolados (Figura 5), no entanto, em 26 (26/124) destes isolados, o *amplicon* obtido foi maior que 1250 pb. Com o objetivo de avaliar se os isolados que apresentavam este tipo de *amplicon* (> 1250 pb) poderiam ser identificados como *S. aureus*, os produtos de PCR da reação 23S rRNA de seis (6/26) destes isolados foram submetidos ao sequenciamento da fita *forward*. As seqüências obtidas foram editadas utilizando o programa Bioedit (HALL, 1999) e comparadas

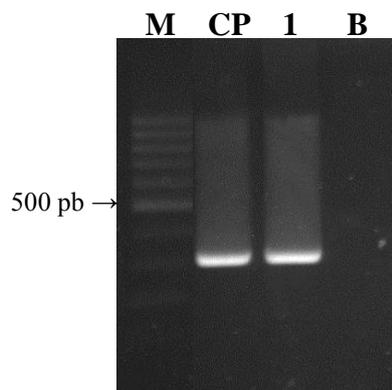
com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*GenBank*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). O sequenciamento confirmou a espécie *S. aureus* com 99% de identidade. Deste modo, os isolados que apresentavam este fragmento atípico foram considerados positivos para o gene 23S rRNA.



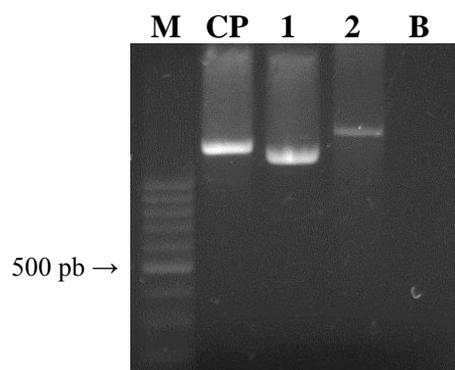
**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA (756 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle *S. aureus* ATCC 29213; 1: Isolado positivo; B: Branco.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *coa* (variável). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle *S. aureus* ATCC 29213; 1: Isolado positivo; B: Branco.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *nuc* (279 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle *S. aureus* ATCC 29213; 1: Isolado positivo; B: Branco.



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene 23S rRNA (1250 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle; 1: Isolado positivo; 2: Isolado positivo (>1250 pb); B: Branco.

Observou-se variabilidade quanto à presença dos genes investigados gerando diferentes perfis (Tabela 5).

**Tabela 5.** Perfis de amplificação dos genes *coa*, *nuc* e 23S rRNA para identificação de *S. aureus* obtidos.

| Perfis (nº de isolados)         | <i>coa</i> | <i>nuc</i> | 23S rRNA | Espécie          |
|---------------------------------|------------|------------|----------|------------------|
| 1 (113)                         | +          | +          | +        | <i>S. aureus</i> |
| 2 (14)                          | +          | +          | -        | <i>S. aureus</i> |
| 3 (8)                           | +          | -          | +        | <i>S. aureus</i> |
| 4 (3)                           | -          | +          | +        | <i>S. aureus</i> |
| 5 (2)                           | -          | +          | -        | <i>S. aureus</i> |
| 6 (2)                           | +          | -          | -        | <i>S. aureus</i> |
| <b>Total (<i>S. aureus</i>)</b> |            |            |          | <b>142</b>       |

\* +: Positivo; -: Negativo.

O perfil 1, com resultados positivos para os três genes, foi predominantemente encontrado em 112 isolados oriundos do leite e um da cadeia produtiva. No entanto, isolados de todos os seis perfis obtidos foram genotipicamente caracterizados como *S. aureus*, considerando a amplificação para pelo menos um dos genes que caracterizam esta espécie, revelando uma prevalência de 97,9% (142/145) entre os ECPs obtidos no presente estudo.

Dois, dos 142 *S. aureus* identificados, eram fenotipicamente negativos à prova da coagulase e possuíam os genes *coa*, *nuc* e 23S rRNA (perfil 1), sendo possível caracterizá-los como *S. aureus*. Para estes isolados, a prova da coagulase foi repetida e o resultado encontrado foi novamente negativo. Este achado corrobora com os resultados descritos por Akineden e colaboradores (2011), que também identificaram dois isolados de *S. aureus*, oriundos do leite de uma vaca com mastite subclínica, que não expressavam fenotipicamente a produção da coagulase, mas que foram genotipicamente caracterizados como *S. aureus* com base na amplificação dos genes *coa* e *nuc*, dentre outros. Isolados de *S. aureus* coagulase-negativos foram primeiramente isolados de amostras de leite provenientes de casos de mastite bovina subclínica (MALINOWSKI et al. 2009; MATTHEWS et al. 1997; LAEVENS et al. 1996) e, apesar de já descrito na literatura, este achado é considerado raro.

A coagulase é o principal fator de virulência em *S. aureus*, pois tem a capacidade de coagular a fibrina que se deposita ao redor da bactéria oferecendo-lhe proteção contra a ação

do sistema imune. Sua expressão está sujeita à regulação coordenada de vários loci gênicos, onde o mais estudado é o regulador *agr*. O sistema *agr* atua como regulador positivo de proteínas secretoras ( $\alpha$  e  $\beta$  hemolisinas, proteases, DNAses e estafiloquinases) e pode reprimir a transcrição dos genes que codificam a proteína A, coagulase e outras proteínas associadas à parede celular (NOVICK; JIANG, 2003). *In vitro*, alguns isolados de *S. aureus* podem apresentar-se negativos e isto estaria associado à clivagem parcial por proteases (estafiloquinases) (MARQUES, 2012).

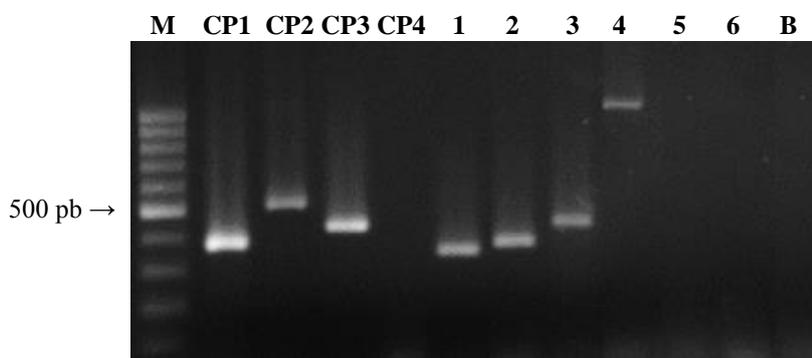
Em 3 dos 145 dos isolados fenotipicamente positivos à prova da coagulase, nenhum dos três genes foi detectado e, portanto, foram genotipicamente classificados como ECPs. Estes resultados corroboram com Lange e colaboradores (2011), que também encontraram uma alta prevalência de *S. aureus* (83%), oriundos de casos de mastite em propriedades leiteiras de diferentes municípios do Estado de Minas Gerais, frente às demais espécies de ECP.

Os isolados de ECN, não caracterizados genotipicamente como *S. aureus*, não foram considerados na realização deste estudo, resultando na amostragem final de 142 isolados genotipicamente caracterizados como *S. aureus* e 3 isolados de ECP não *S. aureus* (n=145).

## 5.2 M-PCR dos genes *nuc* para caracterização de outros *Staphylococcus* coagulase-positivos

Após padronização da técnica, através de reações de PCR *uniplex* para cada um dos iniciadores do gene *nuc* preconizados por Sasaki e colaboradores, os três isolados de ECP não *S. aureus*, foram submetidos à M-PCR dos genes *nuc* para as espécies *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini* grupo A e B, *S. hyicus* e *S. aureus* (SASAKI et al., 2010). Três isolados genotipicamente identificados como *S. aureus* (*coa*, *nuc* e 23S rRNA) também foram submetidos à M-PCR como controles.

Dos três isolados de ECP (não *S. aureus*), um apresentou *amplicon* maior que 1000 pb. Os outros dois isolados de ECP (não *S. aureus*) não puderam ser amplificados, assim como a cepa padrão *S. hyicus* 5368. Dos isolados de *S. aureus* previamente identificados, dois geraram fragmentos no tamanho esperado (359 pb). Entretanto, um destes isolados gerou fragmento de 430 pb, que corresponde ao esperado para *S. intermedius* (Figura 6). Deste modo, o protocolo de Sasaki e colaboradores (2010) não permitiu a discriminação entre as espécies de ECP avaliadas neste estudo.



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação da M-PCR dos genes *nuc* de ECP. M: marcador de tamanho molecular (100 bp), CP1: controle *S. aureus* ATCC 29213 (359 pb); CP2: controle *S. schleiferi* subsp. *coagulans* 3975 (526 pb); CP3: controle *S. intermedius* ATCC 29663 (430 pb); CP4: controle *S. hyicus* 5368 não amplificado;

1 e 2: isolados positivos para *S. aureus* (359 pb); 3: Isolado de *S. aureus* positivo para *S. intermedius* (430 pb); 4: Isolado de ECP que apresentou banda inespecífica (>100 pb); 5-6: Isolados de ECP não amplificados; B: Branco.

### 5.3 Identificação por MALDI-TOF MS

Setenta e dois isolados foram submetidos à análise proteômica MALDI-TOF MS. Destes, 33 foram previamente identificados como *S. aureus*, inclusive os dois isolados atípicos de *S. aureus* coagulase-negativos, e foram escolhidos por serem representantes de cada um dos perfis de amplificação obtidos. Os três isolados que não puderam ser caracterizados como *S. aureus* nem identificados pela M-PCR, sendo classificados somente como ECPs, também foram avaliados. Os demais 36 isolados avaliados por esta ferramenta foram ECNs, aleatoriamente selecionados, com o objetivo de validar a identificação proposta.

Todos os 33 isolados, identificados genotipicamente como *S. aureus* e pertencentes aos diferentes perfis encontrados, submetidos a esta análise foram confirmados como *S. aureus* pela técnica MALDI-TOF MS (Tabela 6). O isolado de *S. aureus*, caracterizado como tal pelos genes *coa*, *nuc* e 23S rRNA, mas identificado como *S. intermedius* pela técnica M-PCR, foi identificado como *S. aureus* pelo método MALDI-TOF MS.

**Tabela 6.** Isolados de *S. aureus* pertencente aos perfis encontrados na identificação genotípica e confirmados pela técnica MALDI-TOF MS.

| Perfis (nº de isolados) | <i>coa</i> | <i>nuc</i> | 23S rRNA | MALDI-TOF MS (nº de isolados do perfil avaliados) |
|-------------------------|------------|------------|----------|---|
| 1 (113)                 | +          | +          | +        | <i>S. aureus</i> (24)                             |
| 2 (14)                  | +          | +          | -        | <i>S. aureus</i> (2)                              |
| 3 (8)                   | +          | -          | +        | <i>S. aureus</i> (3)                              |
| 4 (3)                   | -          | +          | +        | <i>S. aureus</i> (1)                              |
| 5 (2)                   | -          | +          | -        | <i>S. aureus</i> (1)                              |
| 6 (2)                   | +          | -          | -        | <i>S. aureus</i> (2)                              |

+:Positivo; -: Negativo.

Os três isolados, anteriormente identificados somente como ECPs, foram identificados pelo MALDI-TOF MS, como dois isolados de *S. hyicus* e um de *S. intermedius*. Os dois isolados identificados como *S. hyicus* não haviam sido amplificados pela M-PCR proposta por Sasaki e colaboradores (2010), e o isolado identificado como *S. intermedius* foi o que apresentou um fragmento maior que 1000 pb. Estes resultados sugerem que a técnica M-PCR não se constituiu em uma ferramenta ideal para a caracterização das espécies de ECP neste estudo. Os 36 isolados de ECN avaliados, todos foram confirmados como tal, e as espécies mais encontradas foram *S. chromogenes*, *S. sciuri* e *S. xylosus*. A Tabela 7 resume os resultados encontrados na identificação fenotípica, genotípica e proteômica para os 36 isolados de ECP submetidos ao MALDI-TOF MS.

**Tabela 7.** Comparativo da identificação fenotípica, genotípica e proteômica dos 36 isolados de ECP analisados pela técnica MALDI-TOF MS e seus respectivos escores.

| Isolado | Identificação fenotípica | PCR genes <i>coa</i> , <i>nuc</i> , 23S rRNA | M-PCR genes <i>nuc</i> | MALDI-TOF MS (Escore)         |
|---------|--------------------------|--|------------------------|-------------------------------|
| 1       | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | <i>S. intermedius</i>  | <i>S. aureus</i> (2.354)      |
| 2       | ECP                      | <i>S. aureus</i>                             | <i>S. aureus</i>       | <i>S. aureus</i> (2.258)      |
| 3       | ECP                      | <i>S. aureus</i>                             | <i>S. aureus</i>       | <i>S. aureus</i> (2.380)      |
| 4       | ECN                      | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.329)      |
| 5       | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.403)      |
| 6       | ECN                      | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.317)      |
| 7       | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.459)      |
| 8       | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.367)      |
| 9       | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.408)      |
| 10      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.381)      |
| 11      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.441)      |
| 12      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.424)      |
| 13      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.443)      |
| 14      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.351)      |
| 15      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.405)      |
| 16      | ECP                      | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.419)      |
| 17      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.371)      |
| 18      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.418)      |
| 19      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.426)      |
| 20      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.450)      |
| 21      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.455)      |
| 22      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.410)      |
| 23      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.461)      |
| 24      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.379)      |
| 25      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.428)      |
| 26      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.410)      |
| 27      | ECP                      | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.477)      |
| 28      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.442)      |
| 29      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.451)      |
| 30      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.397)      |
| 31      | ECP                      | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.425)      |
| 32      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.422)      |
| 33      | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>                             | ND                     | <i>S. aureus</i> (2.424)      |
| 34      | ECP                      | Negativo (ECP)                               | Negativo               | <i>S. hyicus</i> (2.157)      |
| 35      | ECP                      | Negativo (ECP)                               | Negativo               | <i>S. hyicus</i> (2.116)      |
| 36      | <i>S. aureus</i>         | Negativo (ECP)                               | Fragmento inespecífico | <i>S. intermedius</i> (2.178) |

\*ND: Não determinado.

O cálculo do coeficiente Kappa de *Cohen*, que ajusta a concordância para decisões específicas positivas e negativas, resultou nos seguintes valores de concordância: 85,7% para os três genes, 94,4% para o gene *coa* e 85,8% para os genes *nuc* e 23S rRNA (Tabela 8). O cálculo foi feito considerando-se a chave de identificação de *S. aureus* proposta e a

identificação através do método proteômico, revelando uma excelente concordância entre os métodos.

**Tabela 8:** Coeficiente Kappa de concordância entre a identificação genotípica de *S. aureus* e a identificação proteômica por MALDI-TOF MS.

|   | <i>coa, nuc</i> e 23S rRNA | <i>coa</i>             | <i>nuc</i>            | 23S rRNA              |
|---|----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Kappa geral</b>                            | 0.857                      | 0.944                  | 0.858                 | 0.858                 |
| <b>P-valor geral</b>                          | < 0.001                    | < 0.001                | < 0.001               | < 0.001               |
| <b>Intervalo de 95% de confiança do Kappa</b> | sup: 0.951<br>inf: 0.763   | sup: 1.0<br>inf: 0.713 | sup: 1.0<br>inf: 0.63 | sup: 1.0<br>inf: 0.63 |

Quando comparada à ferramenta MALDI-TOF MS, considerada neste estudo como padrão-ouro, a chave de identificação genotípica proposta, com a utilização de três genes para identificação de *S. aureus*, mostrou-se ser 100% sensível e específica. Os valores preditivo positivo e negativo encontrados também foram 100%. A sensibilidade, capacidade de detecção dos verdadeiros positivos, diminuiu quando utilizado somente o gene *coa* para detecção de *S. aureus* (93,9%), assim como o valor preditivo negativo (95,1%). A especificidade e o valor preditivo positivo se mantiveram 100%. Quando utilizados os genes *nuc* ou 23S rRNA, a sensibilidade e o valor preditivo negativo diminuíram ainda mais (84,8% e 88,6%, respectivamente) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Percentuais de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN encontrados para a chave de identificação proposta.

| Genes                      | Valores (%)   |                |     |      |
|----------------------------|---------------|----------------|-----|------|
|                            | Sensibilidade | Especificidade | VPP | VPN  |
| <i>coa, nuc</i> e 23S rRNA | 100           | 100            | 100 | 100  |
| <i>coa</i>                 | 93,9          | 100            | 100 | 95,1 |
| <i>nuc</i>                 | 84,8          | 100            | 100 | 88,6 |
| 23S rRNA                   | 84,8          | 100            | 100 | 88,6 |

\* VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

Os resultados encontrados indicam a chave de identificação genotípica de *S. aureus* proposta pode ser usada de forma bastante satisfatória para caracterização deste agente. Esta abordagem permite a identificação confiável de *S. aureus*, mas comparada à proteômica MALDI-TOF MS é laboriosa e demorada. Entretanto, apesar de ser cada vez mais disponível, os custos com o equipamento e instalação ainda são bastante elevados. Para laboratórios com rotina diagnóstica menos intensa, o custo-benefício da implantação deste equipamento pode ser menor que o da utilização de ferramentas genotípicas, como a PCR.

A caracterização fenotípica e genotípica das demais espécies de ECP, principalmente em laboratórios de diagnóstico veterinário, ainda representa um entrave na diferenciação das espécies. Apesar dos esforços para o desenvolvimento de técnicas genotípicas, para diferenciação das espécies de ECP, muitos isolados podem não ser corretamente identificados. Neste trabalho, a identificação de *S. hyicus* e *S. intermedius* só foi possível graças ao MALDI-TOF MS.

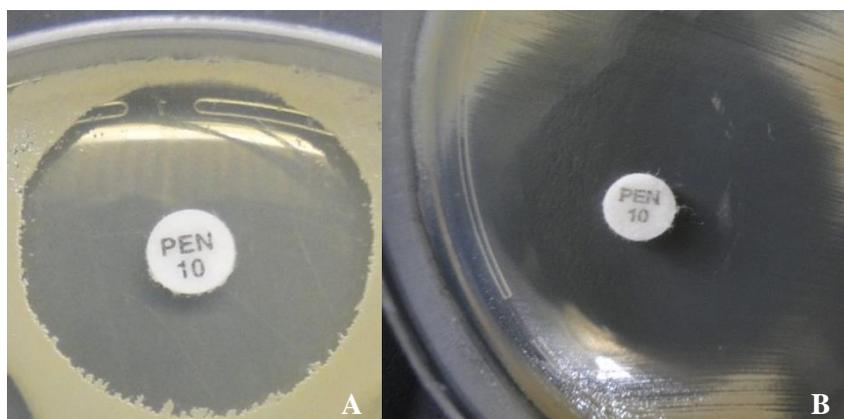
De acordo com as ferramentas utilizadas no presente estudo, genotípicas e proteômica, foram encontradas as seguintes espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos: 97,9% (142/145) *S. aureus*, 1,4% (2/145) *S. hyicus* e 0,7% (1/145) *S. intermedius*.

## 5.4 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

### 5.4.1 Detecção fenotípica da resistência aos beta-lactâmicos

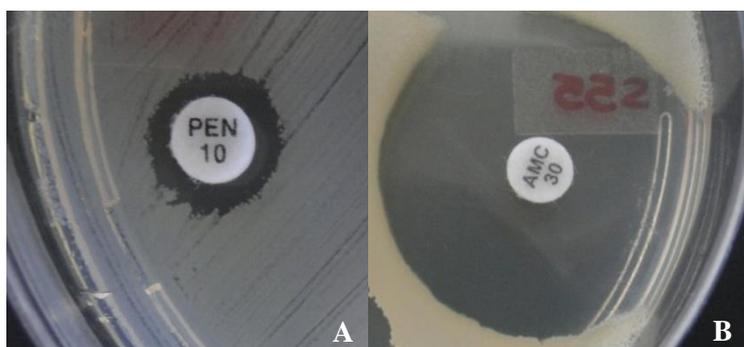
A maioria dos estafilococos é resistente à penicilina, raramente considerada uma opção no tratamento destas infecções, apesar de ainda existirem produtores que tratam a mastite bovina com este antimicrobiano. No presente trabalho, 80,7% (117/145) dos isolados avaliados foram resistentes à penicilina, corroborando com Silva e colaboradores (2012), que também encontraram elevada resistência a este antimicrobiano (95%) em *S. aureus* oriundos de casos de mastite subclínica no estado de Pernambuco, Brasil. Baixa sensibilidade à penicilina em ECPs isolados de casos de mastite bovina também foi relatada por outros autores (KREWER et al., 2013; NADER FILHO et al., 2007; FREITAS et al., 2005). A sensibilidade detectada não é confiável, uma vez que segundo o CLSI (2013), com padrões para bactérias isoladas de animais, isolados de estafilococos produtores de beta-lactamase podem mostrar-se fenotipicamente sensíveis à penicilina. Pelo fato das beta-lactamases estafilocócicas serem facilmente induzíveis, existe o risco de falha terapêutica no tratamento de infecções causadas por estes agentes. Por este motivo, é recomendado que isolados de *Staphylococcus* sensíveis à penicilina (halo de inibição  $\geq 29$ ) sejam testados para a produção de beta-lactamases, antes de reportá-los como tal.

O teste fenotípico recomendado para a detecção da produção de beta-lactamases em *S. aureus*, e adotado para as demais espécies de ECP neste estudo, é a difusão em disco de penicilina (10 UI) cuja interpretação é baseada na borda do halo de inibição. Se esta borda, ou margem, é difusa, o isolado não produz beta-lactamases. Mas, se é bem delimitada, o isolado pode ser considerado produtor de beta-lactamases e deve ser reportado como resistente. Este teste é considerado mais sensível, em *S. aureus*, que o teste do nitrocefim (CLSI VET-A4, 2013). Dos isolados sensíveis, 60,7% (17/28) foram positivos ao teste de zona *edge*, apresentando uma borda do halo de inibição definida (Figura 7), devendo ser reportados como resistentes à penicilina e o seu uso não recomendado. Dentre os isolados sensíveis à penicilina e negativos ao teste de zona *edge* está o único isolado oriundo da cadeia produtiva.



**Figura 7:** Teste de zona *edge* positivo, com borda do halo de inibição demarcada (A). Teste de zona *edge* negativo, com borda não definida (B).

Para contribuir com a leitura interpretativa do antibiograma, a amoxicilina associada ao inibidor de beta-lactamases ácido clavulânico foi incluída nos ensaios. A resistência foi detectada em apenas 1,4% (2/145) dos isolados (Figura 8). Tais resultados sugerem que a produção de beta-lactamases é o mecanismo implicado na resistência à penicilina observada e condizem com Waller e colaboradores (2011), que afirmam que a produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência mais comum em estafilococos.

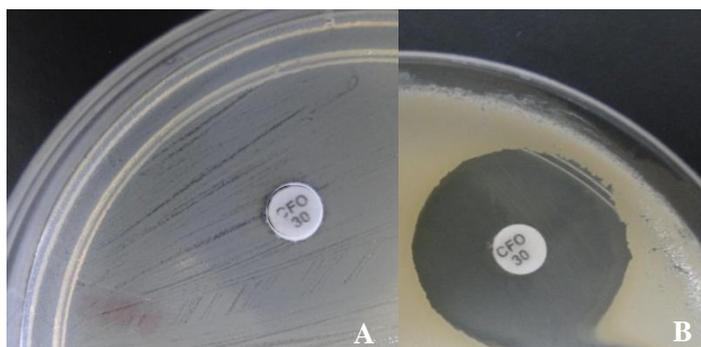


**Figura 8:** Isolado resistente à penicilina (PEN) (A) e sensível à combinação amoxicilina + ácido clavulânico (AMC) (B), no teste de difusão em disco.

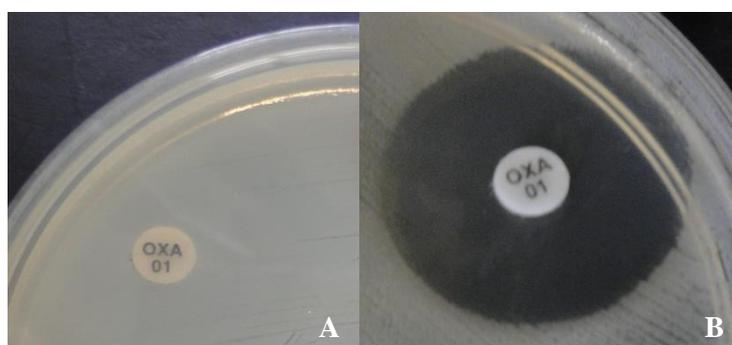
Os resultados da análise fenotípica da resistência à oxacilina corroboraram esta hipótese, uma vez que 99,3% dos *S. aureus* (141/142), inclusive o oriundo da cadeia produtiva, foram sensíveis à cefoxitina e, somente 0,7% (1/142) apresentou-se resistente a este antimicrobiano. Dentre os três isolados de ECP, somente *S. intermedius* (1/3) mostrou-se resistente à oxacilina. Já os dois isolados de *S. hyicus* foram sensíveis a este antimicrobiano.

Do ponto de vista clínico e econômico, a determinação da sensibilidade ou resistência de isolados a antimicrobianos é muito importante (MOON et al., 2007) e, além disto, tem implicação direta em saúde pública, pois a terapia antimicrobiana em animais representa um risco de seleção de cepas resistentes e introdução desta na cadeia alimentar (WHITE; MCDERMOTT, 2001; LEE, 2003).

Para *S. aureus*, o disco de cefoxitina é preconizado na detecção da resistência mediada pelo gene *mecA*, substituindo o disco de oxacilina. Já para as demais espécies de ECP, o disco de oxacilina deve ser utilizado (CLSI VET01-A4, 2013). Em ambos os casos, isolados com halos de inibição menores que o estabelecido devem ser reportados como resistentes à oxacilina. As Figuras 9 e 10 ilustram os resultados obtidos para cefoxitina e oxacilina, respectivamente.



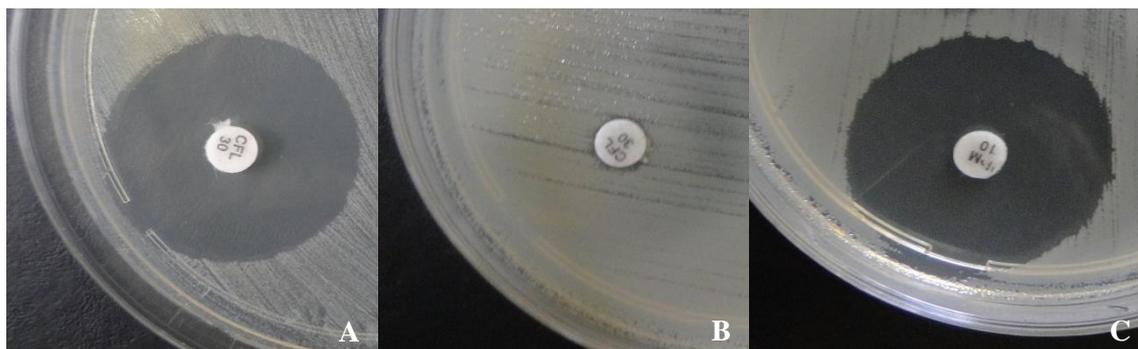
**Figura 9.** Teste de difusão em disco. Isolado de *S. aureus* resistente à cefoxitina (CFO) (A). Isolado de *S. aureus* sensível à cefoxitina (CFO) (B).



**Figura 10.** Teste de difusão em disco. Isolado de *S. intermedius* resistente à oxacilina (OXA) (A). Isolado de *S. hyicus* sensível à oxacilina (OXA) (B).

Os resultados do presente estudo sugerem que a prevalência de resistência à oxacilina em *S. aureus* oriundos de mastite bovina é geralmente baixa, corroborando achados prévios (KREWER et al., 2013; BOTREL et al., 2010; BENGTTSSON et al., 2009; MONECKE, et al., 2007). Entretanto, em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de trabalho, a resistência encontrada à oxacilina foi maior (65,6% de resistência à oxacilina e 66,4% à cefoxitina) (MENDONÇA et al., 2012). Uma das explicações para estes achados pode ser a seleção das propriedades. No presente estudo, as propriedades onde foram feitas as coletas possuíam assistência médica veterinária periódica, melhores condições de manejo dos animais, constante realização de CCS e tratamento adequado dos diagnosticados com mastite. Já no estudo conduzido por Mendonça e colaboradores (2012), as propriedades não possuíam as mesmas condições de assistência e de manejo.

Quanto à cefalotina, apenas o único *S. intermedius* identificado foi resistente a este antimicrobiano. A elevada sensibilidade encontrada corrobora com Silva e colaboradores (2012), que detectaram 100% de sensibilidade a este antimicrobiano, porém em isolados de *S. aureus*, e também com outros autores que afirmam que a resistência à cefalotina praticamente não existe (POL; RUEGG, 2007; DE OLIVEIRA et al. 2000). Todos os 10 isolados (100%) testados para o antimicrobiano imipenem foram sensíveis, o que já era esperado, uma vez que a resistência encontrada a este antimicrobiano é frequentemente muito baixa. A Figura 11 ilustra os resultados de sensibilidade e resistência encontrados para estes dois antimicrobianos.



**Figura 11:** Teste de difusão em disco. Isolado sensível à cefalotina (CFL) (A). Isolado de *S. intermedius* resistente à cefalotina (CFL) (B). Isolado sensível ao imipenem (IPM) (C).

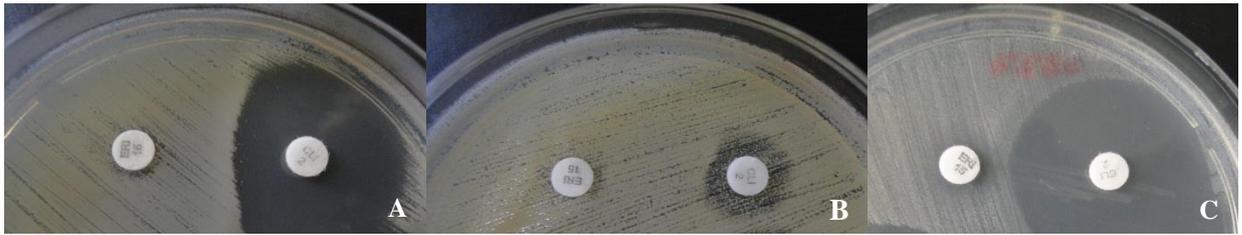
#### 5.4.2 Detecção da resistência induzível à clindamicina

Macrolídeos e lincosamidas são duas outras classes de antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite e também amplamente utilizadas no tratamento de infecções estafilocócicas humanas (MOON et al., 2007). Sabe-se que aumento da pressão seletiva na população bacteriana pode desencadear mecanismos de resistência a macrolídeos e lincosamidas, nas suas formas induzida ou constitutiva em *Staphylococcus* spp. Baseado no conhecimento que o cassete *mec*, presente em MRSA, carrega outros elementos genéticos codificadores de resistência a outras classes de antimicrobianos, como os genes *erm*, o presente estudo buscou avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos eritromicina (ERI), um macrolídeo, e clindamicina (CLI), uma lincosamida.

O teste de disco aproximação foi realizado com o intuito de avaliar o fenótipo de resistência pela proximidade de aplicação dos discos de eritromicina (15 µg) e clindamicina (2µg) (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013). A resistência constitutiva à clindamicina é observada quando isolados resistentes apresentam halos de inibição reduzidos ao redor dos discos. Já a resistência induzível é observada quando o halo de inibição ao redor do disco de clindamicina sofre uma constrição de diâmetro próximo ao disco de eritromicina, efeito também chamado de “zona D”.

Observou-se que 2,8% (4/145) dos *Staphylococcus* coagulase-positivos foram resistentes à eritromicina, sendo três *S. aureus* e um *S. intermedius*. Destes, dois (2/4) apresentaram uma constrição do diâmetro no halo de clindamicina (“zona D”), sendo considerados resistentes à clindamicina; um (1/4) isolado apresentou-se constitutivamente resistente à clindamicina, não sendo possível a medição do halo, e um (1/4) isolado apresentou-se resistente somente à eritromicina (Figura 15). O isolado que apresentou resistência constitutiva foi *S. intermedius*, também resistente aos demais antimicrobianos testados (penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e oxacilina) e sensível apenas ao imipenem. A multirresistência encontrada neste isolado reflete a importância da adequada identificação ao nível de espécie dos demais ECPs envolvidos em processos infecciosos, para que não sejam equivocadamente reportados como MRSA.

MRSA são frequentemente resistentes a outras classes de antimicrobianos, como tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas (ARDIC et al., 2005; WOODFORD, 2005; VOSS; DOEBBELING, 1995) e, apesar da baixa resistência encontrada à oxacilina e eritromicina, o monitoramento da suscetibilidade é essencial para o controle das infecções causadas por agentes resistentes a mais de uma classe antimicrobiana.



**Figura 12.** Teste de disco aproximação para detecção da resistência induzível à clindamicina. Resistência induzível à clindamicina (“zona D”) (A). Resistência constitutiva (B). Resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina (C).

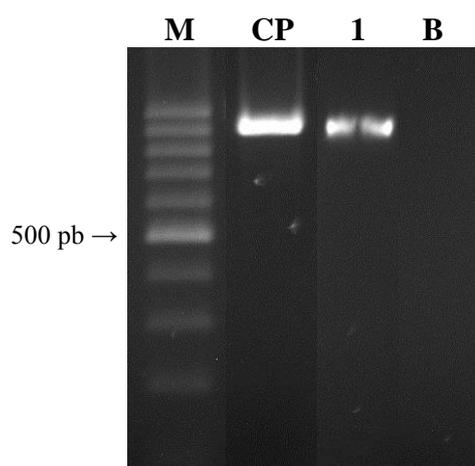
## 5.5 Detecção dos genes de resistência aos beta-lactâmicos

### 5.5.1 Detecção do gene *blaZ*

Devido à baixa resistência encontrada aos beta-lactâmicos cefoxitina, oxacilina e amoxicilina + ácido clavulânico, associada à elevada resistência à penicilina observada no presente estudo, que aponta para um mecanismo de resistência mediado pelo gene *blaZ*, a etapa seguinte adotada neste trabalho foi a pesquisa deste gene em todos os isolados, buscando correlacionar a presença de deste gene com o fenótipo de resistência à penicilina.

O mecanismo de resistência à penicilina associada à produção de beta-lactamases, principalmente penicilinases, é decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico após a exposição do microrganismo ao antibiótico. A síntese de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene plasmidial ou cromossomal *blaZ* e pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes, *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 BlaR1, 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 (MENDONÇA, 2012).

O gene *blaZ* foi detectado em 46,2% (67/145) dos isolados (Figura 13), todos *S. aureus*. Destes, 49 (49/67) isolados foram resistentes à penicilina e somente um (1/67) foi resistente à combinação amoxicilina + ácido clavulânico. A Tabela 10 resume os perfis encontrados quanto à suscetibilidade aos dois antimicrobianos avaliados, à presença da borda delimitada e do gene *blaZ* entre os isolados. O perfil predominantemente encontrado foi o perfil 1 com 46,2% (67/145), com isolados resistentes à penicilina e sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico, mas negativos para o gene *blaZ*. O perfil 2 é composto por 33,1% (47/145) dos isolados, os quais foram resistentes à penicilina, sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico e apresentaram o gene *blaZ*, sendo possível afirmar que o mecanismo de resistência envolvido é a produção de beta-lactamases. O único isolado oriundo da cadeia produtiva obtido no presente estudo e identificado como *S. aureus* pertence ao perfil 5, com isolados sensíveis à penicilina e à amoxicilina + ácido clavulânico, negativos ao teste de zona *edge*, mas positivos para o gene *blaZ*.



**Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *blaZ* (861 pb). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle; 1: Isolado positivo; B: Branco.

**Tabela 10.** Perfis encontrados entre os isolados quanto à suscetibilidade à penicilina (PEN) e amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), ao resultado do teste de zona *edge* e presença do gene *blaZ*.

| Perfil (nº de isolados) | Espécie                    | PEN | Zona <i>edge</i> (definida) | AMC | Gene <i>blaZ</i> |
|-------------------------|----------------------------|-----|-----------------------------|-----|------------------|
| 1 (67)                  | <i>S. aureus</i>           | R   | ND                          | S   | -                |
| 2 (48)                  | <i>S. aureus</i>           | R   | ND                          | S   | +                |
| 3 (16)                  | <i>S. aureus</i>           | S   | +                           | S   | +                |
| 4 (9)                   | <i>S. aureus/S. hyicus</i> | S   | -                           | S   | -                |
| 5 (2)                   | <i>S. aureus</i>           | S   | -                           | S   | +                |
| 6 (1)                   | <i>S. aureus</i>           | R   | ND                          | R   | +                |
| 7 (1)                   | <i>S. intermedius</i>      | R   | ND                          | R   | -                |
| 8 (1)                   | <i>S. aureus</i>           | S   | +                           | S   | -                |

\* +:Positivo; -: Negativo; ND: Não determinado.

A sensibilidade do teste de zona *edge* em comparação à detecção do gene *blaZ*, utilizada como padrão-ouro, foi elevada (88,9%). O mesmo pode-se observar para os valores de especificidade (90%), valor preditivo positivo (94,1%) e valor preditivo negativo (81,8%). Gill e colaboradores, em 1981, propuseram a utilização deste teste para a predição da produção de beta-lactamases em *S. aureus* e *S. epidermidis*, encontrando, para *S. aureus*, uma correlação de 100% entre o resultado positivo ao teste de zona *edge* e a produção de beta-lactamases.

A não detecção do gene *blaZ* na maior parte dos isolados fenotipicamente resistentes à penicilina, conduziu à etapa de detecção do gene *mecA*.

### 5.5.2 Detecção do gene *mecA* e seus reguladores

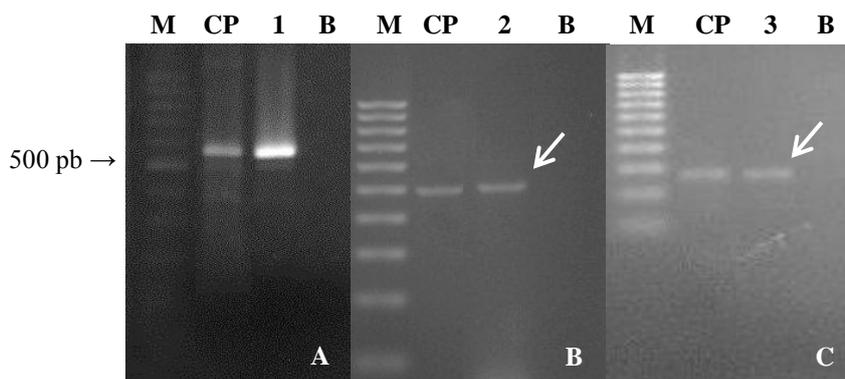
A resistência estafilocócica à oxacilina mediada pelo gene *mecA* implica em resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas, com exceção das de última geração,

carbapenemas e associações de beta-lactâmico com inibidores de beta-lactamase, como por exemplo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (TORRES; CERCENADO, 2010; JACQUELINE et al., 2009; CHENG et al., 2008).

A emergência de MRSA no gado leiteiro pode ser associada ao contato com outras espécies de animais, como por exemplo, suínos ou humanos, ou bactérias, como ECNs, que muitas vezes carregam genes determinantes da resistência antimicrobiana que podem ser transferidos para *S. aureus* associados à mastite (HOLMES; ZADOKS, 2011). Muitos estudos realizados pelo mundo têm demonstrado baixos níveis de MRSA associado à mastite bovina, como os desenvolvidos na Coréia (NAM et al., 2011), Alemanha (FESSLER et al., 2010), Suíça (HUBER et al., 2009), Japão (HATA et al., 2010), Turquia (TURKYILMAZ et al., 2010) e Bélgica (VANDERHAEGHEN et al., 2010b).

Todos os isolados, mesmo os sensíveis, foram submetidos a reações de PCR para detecção do gene de resistência *mecA* utilizando os iniciadores *mecA* “Universal”, proposto por Melo e colaboradores (*in press*). Este iniciador foi desenhado baseado em uma sequência conservada do gene *mecA* de *S. aureus*, permitindo a amplificação deste gene tanto em isolados de *S. aureus* de origem humana, quanto nos de origem bovina. Uma vez positivos, os isolados foram também submetidos a reações de PCR, também para investigação do gene *mecA*, utilizando os iniciadores *mecA* (MURAKAMI et al., 1991) e *mec* SsciuriInt (MELO et al., 2013).

O gene *mecA* foi detectado em 2,7% (4/145) dos isolados oriundos do leite, através dos iniciadores *mecA* “Universal”, proposto por Melo e colaboradores (*in press*), e *mecA*, proposto por Murakami e colaboradores (1991). Os isolados positivos para o gene *mecA* foram submetidos à pesquisa do gene *mecRI*, que foi detectado em 3 destes isolados (3/4). O gene *mecI* não foi detectado entre os isolados avaliados. Todos os isolados que apresentaram os genes *mecA* e *mecRI* foram sensíveis à cefoxitina, indicando a não expressão do gene *mecA* e, conseqüentemente, a não produção da PBP2a. A Figura 14 ilustra os produtos de amplificação das reações para detecção do gene *mecA*, pelos iniciadores *mecA* “Universal” (574 pb) e *mecA* (533 pb), e do gene *mecRI* (234 pb).



**Figura 14.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *mecA* pelos iniciadores: *mecA* “Universal” (574 pb) (A) e *mecA* (533 pb) (B); e dos produtos de amplificação do gene *mecRI* (234 pb) (C). M: Marcador de tamanho molecular (100 bp); CP: controle *S. aureus* ATCC 43300; 1: Isolado *mecA* positivo (*mecA* “Universal”); 2: Isolado *mecA* positivo (*mecA* de Murakami e colaboradores, 1991); 3: Isolado *mecRI* positivo; B: Branco.

Foram obtidos cinco perfis diferentes de amplificação dos genes de resistência de acordo com os resultados encontrados na difusão em disco com oxacilina ou cefoxitina (Tabela 11).

**Tabela 11.** Perfis de amplificação dos genes de resistência de acordo com os resultados encontrados na difusão em disco com oxacilina ou cefoxitina.

| Perfis<br>(n° de<br>isolados) | Espécie                             | Susctib.<br>à CFO/<br>OXA | <i>mecA</i><br>“Universal” | <i>mecA</i><br>(MURAKAMI<br>et al., 1991) | <i>mec</i><br>SsciuriInt | <i>mecI</i> | <i>mecRI</i> |
|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|---|--------------------------|-------------|--------------|
| 1 (139)                       | <i>S. aureus</i> e <i>S. hyicus</i> | S                         | -                          | -   | -                        | ND          | ND           |
| 2 (3)                         | <i>S. aureus</i>                    | S                         | +                          | +   | -                        | -           | +            |
| 3 (1)                         | <i>S. aureus</i>                    | S                         | +                          | +   | -                        | -           | -            |
| 4 (1)                         | <i>S. aureus</i>                    | R                         | -                          | -   | -                        | ND          | ND           |
| 5 (1)                         | <i>S. intermedius</i>               | R                         | -                          | -   | -                        | ND          | ND           |

\* +:Positivo; -: Negativo; ND: Não determinado.

Dos 67 isolados resistentes à penicilina, mas negativos para o gene *blaZ*, somente em um foram detectados os genes *mecA* e *mecRI*. A não detecção do gene *mecA* em isolados resistentes também foi reportada por Pehlivanoglu e Yardimci (2012), que encontraram 40% (8/20) de *S. aureus* e 55,6% (10/18) de ECNs resistentes à oxacilina mas negativos para o gene *mecA*. Da mesma forma, outros pesquisadores relataram *S. aureus* resistentes à oxacilina, porém sem o gene *mecA*, em isolados de casos de mastite bovina (KUMAR et al., 2010; TÜRÜTOĞLU et al, 2009; MOON et al., 2007). Nestes casos, diversos mecanismos como superexpressão de beta-lactamases, superprodução de PBPs e mutações pontuais nas PBPs podem ser os responsáveis pela resistência à oxacilina (PEHLIVANOGLU; YARDIMCI, 2012; CHAMBERS, 1997).

A presença de genes de resistência, como por exemplo, *blaZ* e *mecA*, não é necessariamente indicativa de fenótipos de resistência, nem tão pouco a ausência de tais genes determina sensibilidade. A correlação entre presença de genes e detecção de resistência fenotípica é uma área ainda pouco explorada e a utilização de PCR deve ser cautelosa para determinação dos perfis de resistência nas espécies estafilocócicas isoladas de leite bovino (SAMPIMON et al, 2011).

Embora pesquisas recentes tenham identificado mutações pontuais nas regiões de anelamento no gene *mecA* de isolados de *Staphylococcus* de origem bovina e desenvolvido iniciadores mais específicos para sua detecção, ainda é necessário maior elucidação dos fatores envolvidos na não detecção de genes de resistência em *Staphylococcus* spp. de origem animal.

## 6 CONCLUSÕES

- As espécies de ECP encontradas no presente estudo foram: *S. aureus* (97,9%), *S. hyicus* (1,4%) e *S. intermedius* (0,7%).
- A identificação genotípica de *S. aureus* proposta obteve excelente concordância com a identificação proteômica por MALDI-TOF MS. Além disto, apresentou 100% de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, quando comparada ao método proteômico, podendo ser usada de forma bastante satisfatória para caracterização deste agente.
- A elevada sensibilidade à amoxicilina + ácido clavulânico e oxacilina associada à resistência detectada à penicilina, sugere que a produção de beta-lactamases é o mecanismo implicado na resistência à penicilina observada nos isolados avaliados. No entanto, a maioria dos isolados resistentes não possuíam o gene *blaZ*.
- O isolado de *S. intermedius* foi resistente a todos os antimicrobianos testados, com exceção do imipenem. A multirresistência encontrada neste isolado reforça a importância do monitoramento das demais espécies de ECP envolvidas em processos infecciosos, com a adequada identificação ao nível de espécie.
- Os diferentes perfis de resistência fenotípica e genotípica aos beta-lactâmicos encontrados entre os isolados no presente estudo apontam para a necessidade de mais pesquisas para a melhor compreensão dos mecanismos de resistência nestes isolados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 38–42, 2011.
- ALATOOM, A. A.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2868–2873, 2011.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- AL-TALIB, H.; YEAN, C. Y.; AL-KHATEEB, A.; HASSAN, H.; SINGH, K. K.; AL-JASHAMY, K. A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 113–120, 2009.
- ARDIC, N.; OZYURT, M.; SARRYUPOGLU, B.; HAZNEDAROGLU, T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 213–218, 2005.
- BANNOEHR, J.; BEN ZAKOUR, N. L.; WALLER, A. S.; GUARDABASSI, L.; THODAY, K. L.; VAN DEN BROEK, A. H. M.; 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**, v. 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, p. 469–471, 2009.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 253–e52, 2012.
- BAPTISTE, K.E.; WILLIAMS, K.; WILLIAMS, N.J.; WATTRET, A.; CLEGG, P.D.; DAWSON, S.; CORKILL, J.E.; O'NEILL, T.; HART, C.A. Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1942–1944, 2005.
- 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.

BARBUDDHE, S.B.; MAIER, T.; SCHWARZ, G. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5402–5407, 2008.

BARDIAU, M.; YAMAZAKI, K.; DUPREZ, J. N.; TAMINIAU, B.; MAINIL, J. G.; OTE, I. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 181-186, 2013.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1877–1895, 2006.

BARROS, E. M.; IÓRIO, N. L. P.; BASTOS, M. C. F.; SANTOS, K. R. N.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M. Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 251-257, 2007.

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**, v.53, p. 43-54, 2002.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.

BENGTSSON, B.; UNNERSTAD, H. E.; ERICSSON, H.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; PERSSON WALLER, K. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 142–149, 2009.

BIZZINI, A.; GREUB, G. MALDI-TOF MS, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, p. 1614–1619, 2010.

BJORLAND, J.; STEINUM, T.; KVITLÉ, B.; WAAGEL, S.; SUNDE, M.; HEIR, E. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4363–4368, 2005.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; ERCOLINI, D.; PEPE, O.; COPPOLA, S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 192-201, 2010.

BLACK, J.G. **Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas**. 4<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.370-419, 2002.

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

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.

BODE, L. G.; VAN WUNNIK, P.; VAESSEN, N.; SAVELKOUL, P. H.; SMEETS, L. C. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in screening samples by relative quantification between the *mecA* gene and the SA442 gene. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, p.129-132, 2012.

BÖHME, K.; MORANDI, S.; CREMONESI, P.; NO, I.C.F.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CASTIGLIONI, B.; BRASCA, M.; CAÑAS, B.; CALO-MATA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Electrophoresis**, v. 33, p. 2355–2364, 2012.

BOTREL, M. A.; HAENNI, M; MORIGNAT, E.; SULPICE, P; MADEC, J. Y.; CALAVAS, D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 479–487, 2010.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 104–109, 2011.

CASANOVA, C.; ISELIN, L.; VON STEIGER, N.; DROZ, S.; SENDI, P. *Staphylococcus hyicus* bacteremia in a farmer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4377–4378, 2011.

CAPURRO A. **Diagnostic and epidemiological studies of staphylococci in bovine mastitis**. Tese de Doutorado. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2009.

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

CHENG, M.; ANTIGNAC, A.; KIM, C.; TOMASZ, A. Comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2709–2717, 2008.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S. Comparison of two matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic

identification for routine bacterial speciation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1169–1175, 2010.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E. E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 254-261, 2009.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards; Second Informational Supplement**. CLSI document VET01-S2 (ISBN 1-56238-880-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013.

COHN, L. A.; MIDDLETON, J. R. A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 31-45, 2010.

COSTA, G. M.; PAIVA, L. V.; FIGUEIREDO, H. C. P.; FIGUEIRA, A. R.; PEREIRA, U. P, SILVA, N. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 733–735, 2012.

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.; STROMMINGER B.; WITTE W.; STANEK C. Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 14, p. 307–310, 2008.

DECRISTOPHORIS, P.; FASOLA, A.; BENAGLI, C.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 45–51, 2011.

DEVRIESE, L. A; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe**, v.9, n. 7, p.598–605, 1972.

DEVRIESE, L.; VANCANNEY, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

DE OLIVEIRA, A. P.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; AARESTRUP, F. M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastites in Europe and the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 855–862, 2000.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCHMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R. N. ; BEACH, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32 (Suppl. 2), p. S114–S132, 2002.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1315-1320, 2004.

FESSLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 619–625, 2010.

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

FRIEDRICH, C.; RODLOFF, A. C.; CHHATWAL, G. S.; SCHELLENBERGER, W.; ESCHRICH, K. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2392–2397, 2007.

FITZGERALD, J. R.; PENADÉS, J. R. Staphylococci of animals, *In* J. A. Lindsay (ed.), *Staphylococcus: molecular genetics*. **Caister Academic Press**, Norfolk, United Kingdom. p. 255–269, 2008.

FITZGERALD, R. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 490–495, 2009.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J. MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados do leite de vacas com mastite no Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 171-177, 2005.

FRENEY, J.; KLOOS, W. E.; HAJEK, V.; WEBSTER, J. A. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 489–502, 1999.

FOSTER, G.; ROSS, H. M.; HUTSON, R. A.; COLLINS, M. D. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 489-502, 1997.

GAO, J.; FERRERI, M.; FUGING, Y.; XIUQUAN, L.; CHEN, L.; JINGLIANG, S.; HAN, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 550–552, 2012.

GHEBREMEDHIN, B.; LAYER, F.; KÖNIG, W.; KÖNIG, B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1019–1025, 2008.

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.

GRIFFETH, G. C.; MORRIS, D. O.; ABRAHAM, J. L.; SHOFER, S. F.; RANKIN, S. C. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 142–149, 2008.

HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, p. 401–408, 1976.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series: Oxford Journals**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HASMAN H., MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L.; STEGGER, M.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M. *Spa* type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. **Veterinary Microbiology**, v.141, p. 326–331, 2010.

HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; UCHIDA, I; TANAKA, K.; EQUCHI, M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, 2130–2139, 2010.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: Fischetti V.A.; Novick R. P.; Ferreti J. J.; Portnoy D. A.; Rood J. I. Gram-positive pathogens. Washington, D.C.: **ASM Press**, p. 442-449, 2000.

HOLMES, M. A; ZADOKS, R. N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 14, n. 4, p. 373-382, 2011.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1083–1089, 1998.

HUBER, H.; KOLLER,S.; GIEZENDANNER, N.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with

farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Euro surveillance**, v. 15, n. 16, pii: 19542, 2010.

IKAWATY, R.; BROUWER, E.C.; JANSEN, M.D.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Characterization of Dutch *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis using a Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis. **Veterinary Microbiology**, v.136, p. 277–284, 2009.

ILINA, E. N.; BOROVSKAYA, A. D.; MALAKHOVA, M. M. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, p. 75–86, 2009.

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.

JACQUELINE, C.; CAILLON, J.; LE MABECQUEL, V.; GE, Y.; BIEK, D.; BATARD, E.; POTEL, G. *In vivo* activity of a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, ceftaroline, against vancomycin-susceptible and resistant *Enterococcus faecalis* strains in a rabbit endocarditis model: a comparative study with linezolid and vancomycin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 5300–5302, 2009.

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

JOUSSON, O.; BELLO, D. D.; VANNI, M.; CARDINI, G.; SOLDANI, G.; PRETTI, C.; INTORRE, L. Genotypic versus phenotypic identification of staphylococcal species of canine origin with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 238–244, 2007.

JØRGENSEN, H. J.; MØRK, T.; CAUGANT, D. A.; KEARNS, A. ;RØRVIK, L. M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 8352-8361, 2005.

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.

KHANNA, T.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C.; WEESE, J.S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 298 –303, 2008.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008. 1760 p.

KREWER, C. C.; LACERDA, I. P. de; AMANSO, E. S.; CAVALCANTE, N. B.; PEIXOTO, R. de; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; COSTA, M. M. da; MOTA, R. A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 601-606, 2013.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; SINGH, R. S. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Current Microbiology**, v. 60, p. 379-386, 2010.

LAEVENS, H.; DEVRIESE, L. A.; DELUYKER, H.; HOMMEZ, J. DE KRUIF, A. An atypical *Staphylococcus aureus* intramammary infection in a dairy herd. **Veterinary Microbiology**, v. 52, p. 271-275, 1996.

LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p. 159-174, 1977.

LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; SOUZA, G.N.; MACHADO, M.A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A.P.S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6489-6494, 2003.

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.

LEONARD FC, MARKEY BK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. **Veterinary Journal**, v.175, p.27-36, 2008.

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

LOEFFLER, A.; LLOYD, D. H. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? **Epidemiology and Infection**, v. 138, p. 595-605, 2010.

LONGAUEROVA, A. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. **Bratislava Medical Journal**, v. 107, p. 448-452, 2006.

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

MALINOWSKI, E.; LASSA, H.; KLOSSOWSKA, A.; SMULSKI, S.; KACZMAROWSKI, M. Atypical *Staphylococcus aureus* as an etiological agent of mastitis in cows. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 53, p. 383–387, 2009.

MARQUES, V. F. **Caracterização fenogenotípica dos fatores de virulência em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.** 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2012.

MATTHEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S. P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 686–688, 1997.

MELO, D.A., COELHO, I. S., MOTTA, C. C., ROJAS, A. C. C. M., DUBENCZUK, F. C., COELHO, S. M. O., SOUZA, M. M. S. Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**. (Artigo aceito para publicação).

MENDONCA, E. C. L. **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.** 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2012.

MENDONCA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, A. D.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O. C.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 859-864, 2012.

MONECKE, S.; KUHNERT, P.; HOTZEL, H.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 128–140, 2007.

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. C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1176-1185, 2007.

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

MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M. V.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOURA, A. P. B. L.; COUTINHO, L. C. A. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, p. 124-130, 2012.

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

NAGY, E.; MAIER, T.; URBAN, E.; TERHES, G.; KOSTRZEWA, M. Species identification of clinical isolates of bacteroides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 15, p. 796–802, 2009.

NAM, H. M.; LEE, A. L.; JUNG, S. C.; KIM, M. N.; JANG, G. C.; WEE, S. H.; LIM, S. K. , et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 231–238, 2011.

NEVILLE, L. O.; BILLINGTON, O. J.; KIBBLER, C. C.; GILLESPIE, S. H. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* without clumping factor, protein A, and DNase. **Lancet**, v. 338, p. 518, 1991.

NOVICK, R.P.; JIANG, D. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. **Microbiology**, v. 149, p. 2709-2717, 2003.

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v.2, p.323–334, 2007.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Front Microbiology**, v. 3, p. 127, 2012.

PEHLIVANOGLU, F.; YARDIMCI, H. Detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine milk samples with mastitis. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 18, n. 5, p.849-855, 2012.

PERSSON WALLER K., COLDITZ I.G., LUN S.; OSTENSSON K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxininduced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v.75, p. 247-255, 2003.

PIGNONE, M.; GRETH, K. M.; COOPER, J.; EMERSON, D.; TANG, J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1963–1970, 2006.

PILLA, R.; BONURA, C.; MALVISI, M.; SNEL, G. G. M.; PICCININI, R. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as causative agent of dairy cow mastitis. **Veterinary Record**, 2013. doi: 10.1136/vr.101485. Disponível em: <veterinaryrecord.bmj.com>. Acesso em: 19 de ago. 2013.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 262–273, 2007.

REISCHL, U.; FRICK, J.; HOERMANSDORFER, S.; MELZL, H.; BOLLWEIN, M.; LINDE, H. J.; BECKER, K.; KÖCK, R.; TUSCHAK, C.; BUSCH, U.; SING, A. Single-nucleotide polymorphism in the *SCCmec-orfX* junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains. **Euro surveillance**, v. 49, p. 11-18, 2009.

ROBERTS MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, p. 147–59, 2008.

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.

RUANE, P. J.; MORGAN, M. A.; CITRON, D. M.; MULLIGAN, M. E. Failure of rapid agglutination methods to detect oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 490–492, 1986.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D.; PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 3449-3455, 2004.

SAEI, H.D. *coa* types and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. **Comparative Clinical Pathology**, v.21, p. 301-307, 2012.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; LEGER, D.; DUFOUR, S.; SHELDON, A. G.; SCHOLL, D. T.; BARKEMA, H. W. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1209–1221, 2012a.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; SCHOLL, D. T.; DEVRIES, T. J.; BARKEMA, H. W. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1921–1929, 2012b.

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.12, p.5739-5744, 2004.

SAKWINSKA, O.; MORRISSET, D.; MADEC, J.; WALDVOGEL, A.; MOREILLON, P.; HAENNI, M. Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhône Valley. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3428–3432, 2011.

SALGADO, B. A. B. **Identificação molecular e caracterização da resistência à mupirocina de cepas de *Staphylococcus spp.* de origem canina.** 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013.

SAMPIMON, O.C., LAM, T. J., MEVIUS, D.J., SCHUKKEN, Y.H., ZADOKS. R.N. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 150., p. 173–179, 2011.

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

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1118–1125, 2007.

SASAKI, T. TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SCALETTI, E. R.; LUCKNER, S. R.; KRAUSE, K. S. Structural features and kinetic characterization of alanine racemase from *Staphylococcus aureus* (Mu50). **Acta Crystallographica Section D (Biological Crystallography)**, v. 68, p. 82–92, 2011.

SHAH, M. M. LIHARA, H.; NODA, M.; SONG, S. X.; NHUNG, P. H.; OHKUSU, K.; KAWAMURA, Y.; EZAKI, T. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 25–30, 2007.

SILVA, E. R. da; PEREIRA; A. . G.; MORAES, W. da; SANTORO, K. R.; SILVA, T. R. M. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n.3, p. 701-711, 2012.

SMYTH D. S.; FEIL, E. J.; MEANEY ,W. J.; HARTIGAN, P. J.; TOLLERSRUD, T.; FITZGERALD, J.R.; ENRIGHT, M. C.; SMYTH, C. J. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p. 1343–1353, 2009.

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.

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, M.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control program. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 91-102, 2003.

- SPOOR, L. E.; MCADAM, P. R.; WEINERT, L. A.; RAMBAUT, A.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M.; KEARNS, A. M. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mbio**, v. 4, n. 4, p.1-6, 2013.
- STEPHAN, R.; HASSLER, C.; NITZSCHE, S.; IVERSON, C.; SWEIFEL, C. Characteristics of *Staphylococcus hyicus* strains isolated from pig carcasses in two different slaughterhouses. **Meat Science**, v. 80, p. 505–510, 2008.
- 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.
- TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis - not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 29-36 2009.
- TAPONEN, S.; SUPRÉ, K.; PIESSENS, V. VAN COILLIE, E.; DE VLIEDHER, S.; KOORT, J. M. K. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase variable species from bovine subclinical and mild clinical mastites. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 61-65, 2012.
- TORRES, C.; CERCENADO, E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 8, p. 541-553, 2010.
- TURKYILMAZ, S.; TEKBIYIK, S.; ORYASIN, E.; BOZDOGAN, B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 197-203, 2010.
- TURUTOGLU, H.; HASOKSUZ, M.; OZTURK, D.; YILDIRIM, M.; SAGNAK, S. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. **Veterinary Research Communications**, v. 33, p. 945-956, 2009.
- VANDENESCH, F.; BES, M.; LEBEAU, C.; GREENLAND, T.; BRUN, Y.; ETIENNE, J. Coagulase-negative *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 342, p. 994–995, 1993.
- VANDENESCH, F.; LEBEAU, C.; BES, M.; MCDEVITT, D.; GREENLAND, T.; NOVICK, R. P.; ETIENNE, J. Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptional and post-transcriptional defects. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 344–349, 1994.

- VANDERHAEGHEN, W.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. **Epidemiology & Infection**, v. 138, p. 606–625, 2010a.
- VANDERHAEGHEN, W.; CERPENTIER, T.; ADRIAENSEN, C.; VICCA, J.; HERMANS, K.; BUTAYE, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 166–171, 2010b.
- VARALDO P.E.; KILPPER-BALZ, R.; BIAVASCO, F.; SATTA, G.; SCHLEIFER, K. H. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 436–439, 1988.
- VENGUST, M.; ANDERSON, M.E.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 602–606, 2006.
- VON EIFF, C.; JANSEN, B.; KOHNENE, W.; BECKER, K. Infections associated with medical devices, pathogenesis, management and prophylaxis. **Drugs**, v. 65, p. 179–214, 2005.
- VOSS, A.; Doebbeling, B. N. The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 5, p. 101–106, 1995.
- VOYTENKO, A. V.; KANBAR, T.; ALBER, J.; LÄMMLER, C.; WEISS, R.; PRENGER-BERMINGHOFF, E.; ZSCHÖCK, M.; AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; DMITRENKO, O. A. Identification of *Staphylococcus hyicus* by polymerase chain reaction mediated amplification of species specific sequences of superoxide dismutase A encoding gene *sodA*. **Veterinary Microbiology**, v. 116, p. 211–216, 2006.
- WALLER, K. P., ASPAN, A., NYMAN, A., PERSSON, Y., ANDERSSON, U. G. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.112–116, 2011.
- WANGER, A. R.; MORRIS, S. L.; ERICSSON, C.; SINGH, K. V.; LAROCCO, M. T. Latex agglutination-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from neonates: epidemiologic features and comparison of typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2583–2588, 1992.
- WEESE, J. S. Staphylococcal control in the veterinary hospital. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 292–e58, 2012.
- WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E151–E155, 2001.
- WOODFORD, N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p. 2 – 21, 2005.

YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; UCHIDA, E.; HARUNA, A.; IGIMI, S. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 263-268, 2005.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 20–28, 2009.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n 11, p. 4947–4955, 2004.