

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

**DISSERTAÇÃO**

***STAPHYLOCOCCUS* spp. COAGULASE-NEGATIVOS EM UNIDADES  
LEITEIRAS: IDENTIFICAÇÃO FENOGENOTÍPICA E PROTEÔMICA  
E ANÁLISE DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

**ANNA CAROLINA COELHO MARÍN ROJAS**

2014



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

***STAPHYLOCOCCUS* spp. COAGULASE-NEGATIVOS EM UNIDADES  
LEITEIRAS: IDENTIFICAÇÃO FENOGENOTÍPICA E PROTEÔMICA  
E ANÁLISE DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

**ANNA CAROLINA COELHO MARÍN ROJAS**

*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**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2014

**“O período de maior ganho em  
conhecimento e experiência, é o período  
mais difícil da vida de alguém.”**

*Dalai Lama*

Dedico este trabalho aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, carinho, apoio e paciência. À minha mãe, Neide Maria Coelho Marín-Rojas, esse ser humano maravilhoso, por toda sua dedicação e por demonstrar, com a sua trajetória de vida, o significado das palavras tenacidade, perseverança e generosidade. Ao meu querido pai, Antonio Marín Rojas, por suas lições de superação, pelo incentivo constante e incondicional e por ensinar o valor do pensamento crítico e questionador. Ao meu irmão, Antônio Marcos Coelho Marín-Rojas, pela amizade e compreensão, ao longo dos anos.

À minha orientadora, Miliane Moreira Soares de Souza, por todas as oportunidades proporcionadas, por sua confiança e apoio e por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação à Rural e à Medicina Veterinária.

À Professora Shana de Mattos de Oliveira Coelho, co-orientadora, por seus conselhos e pelo empenho constante no crescimento do nosso Laboratório e do curso de Ciências Veterinárias.

À Professora Irene da Silva Coelho, obrigada por toda paciência, entusiasmo e gentileza inabaláveis!

À amiga, Cássia Couto da Motta, por sua amizade e companheirismo nas pequenas e grandes empreitadas. Por sua paciência, dedicação e senso impecável de método e organização.

Ao amigo, Felipe Carlos Dubenczuk, por sua competência, comprometimento e empenho com a pesquisa veterinária, que tornaram possível a realização deste trabalho. Muito obrigada!

A Pedro Emílio Ferreira Rodrigues, colega de turma e de profissão, pela colaboração com a realização das coletas de amostras.

Ao carneiro Estopa, por tantas doações de sangue em prol da Ciência.

A Marcelo Santos de Oliva, Pedro Trivisol de Castro Medeiros, Daniel Paiva Barros de Abreu, Greiciane França Bronzato de Almeida, Gabrielli Stefaninni Santiago, Marisol Alvim Gomez, Naiara de Miranda Bento Rodrigues, Bruno da Rocha Pribul, Bruno Oliveira de Carvalho e demais amigos e colegas do Laboratório de Bacteriologia, pela convivência, amizade e apoio. Daniel, obrigada por ajudar com a logística e o transporte.

A Dayanne Araújo de Melo e Bianca da Silva Soares, pelo apoio e amizade e por colaborarem diretamente com a execução deste trabalho. Muito obrigada!

A Tassia Torres Furtado pela infinita paciência e dicas com a acrilamida.

Às Professoras da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Beatriz Meurer Moreira e Marcia Giambiagi-deMarval, pela oportunidade de utilização do equipamento de MALDI-TOF MS e pelo fornecimento de cepas controle.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, e aos seus professores e funcionários, por seu trabalho e dedicação ao Curso e à Rural.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudos e pelos patrocínios concedidos a diversos projetos, possibilitando desta forma, a aquisição de material e equipamentos e a realização dos experimentos.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução desta dissertação.

## RESUMO

ROJAS, Anna Carolina Coelho Marín. ***Staphylococcus* spp. coagulase-negativos em unidades leiteiras: identificação fenogenotípica e proteômica e análise da resistência antimicrobiana.** 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

**Palavras-chave:** *groEL*, MALDI-TOF MS, PCR-RFLP, *Staphylococcus* coagulase-negativos.

Os estafilococos coagulase-negativos (ECNs) passaram a ter destaque como agentes etiológicos da mastite bovina, doença que traz grandes perdas econômicas aos fazendeiros e à indústria de laticínios. A identificação convencional das espécies de ECNs por meios fenotípicos é demorada e laboriosa e para contornar os problemas dos métodos bioquímicos, várias técnicas genotípicas foram propostas. Entre elas, o método de PCR-RFLP de uma sequência parcial do gene *groEL* é uma alternativa promissora por sua rapidez, reprodutibilidade e confiabilidade. Por outro lado, a abordagem proteômica, representada pela técnica de MALDI-TOF MS, além da facilidade de execução, fornece um diagnóstico extremamente rápido e preciso e tem sido cada vez mais empregada na identificação microbiológica. No âmbito da mastite bovina, o emprego racional dos antimicrobianos depende de um monitoramento contínuo da resistência aos fármacos mais utilizados nos plantéis leiteiros. Além disso, cepas resistentes representam um risco potencial à saúde pública. No gênero *Staphylococcus* spp., dois mecanismos determinam a resistência aos beta-lactâmicos: a síntese de beta-lactamases, codificadas pelo gene *blaZ* e a produção da PBP2a, uma PBP modificada, codificada pelo gene *mecA*. A expressão deste gene é preocupante por conferir resistência à toda classe dos beta-lactâmicos. Este trabalho teve como objetivo a identificação de 145 ECNs isolados de mastite bovina, através de métodos fenotípicos e moleculares e a investigação dos seus perfis fenotípicos de suscetibilidade à antimicrobianos de diferentes classes, especialmente os beta-lactâmicos e a detecção de genes associados à resistência. *Staphylococcus chromogenes* foi a espécie mais isolada, com prevalência de quase 70%. *S. xylosus* e *S. sciuri* apresentaram, cada uma, prevalência de 7%. A identificação fenotípica mostrou concordância de 78,6% com a identificação molecular. O coeficiente Kappa de Cohen calculado para os métodos de identificação utilizados foi de 59,7%, considerado um valor limítrofe entre uma concordância boa e moderada. A resistência antimicrobiana foi relativamente baixa: 24,8% para a penicilina, 9,6% para oxacilina, 6,2% para cefoxitina e 3,4% para eritromicina. Não foi observada resistência ao imipenem, cefalotina ou à associação amoxicilina+ácido clavulânico. O gene *mecA* foi detectado em 7,6% (11/145) dos isolados, embora apenas 2 deles tenham demonstrado resistência à cefoxitina no teste de difusão em disco. O gene *blaZ* foi encontrado em 44,4% (16/36) dos isolados resistentes à penicilina e em 7,3% (8/136) dos isolados suscetíveis a este antibiótico. A prevalência significativamente diferente encontrada entre as espécies de ECNs isolados de infecções intramamárias subclínicas e a distinta distribuição dos perfis de resistência entre elas, sugerem um impacto clínico e epidemiológico característico para cada uma das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos envolvidas na mastite bovina.

## ABSTRACT

ROJAS, Anna Carolina Coelho Marín. **Coagulase-negative staphylococci in milk farms: pheno-genotypic and proteomic identification and analysis of antimicrobial resistance.** 63p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

**Palavras-chave:** *groEL*, MALDI-TOF MS, PCR-RFLP, coagulase-negative staphylococci.

Coagulase-negative staphylococci (CNS) have gained attention as etiologic agents of bovine mastitis, a disease which imposes great economic losses to farmers and to the dairy industry. The conventional identification of CNS species, through phenotypic methods is time-consuming and laborious. Therefore, to overcome limitations of biochemical methods, several genotypic techniques have been proposed. Among them, the PCR-RFLP method using a partial conserved sequence of the *groEL* gene is a promising alternative, owing to its swiftness, reproducibility and reliability. On the other hand, the proteomic approach, through the MALDI-TOF MS technique, along with its ease of use, provides an accurate and exceedingly faster diagnosis and has been increasingly employed in microbiologic identification. In the field of bovine mastitis, the rational use of antimicrobials depends on the continuous monitoring of resistance towards the drugs most frequently used in bovine herds. Moreover, resistant strains represent a potential hazard to public health. In the genus *Staphylococcus*, two mechanisms determine resistance to beta-lactams: the beta-lactamase synthesis, coded by the *blaZ* gene, and the PBP2a production, a modified PBP, coded by the *mecA* gene. Its expression is worrisome because it grants resistance to all beta-lactams. This report aimed to assess the species identification of 145 CNS isolates from bovine mastitis, through phenotypic and molecular methods. Additionally, their phenotypic profiles of susceptibility to different antimicrobials were investigated, in particular to beta-lactams, along with the detection of resistance genes involved. *S. chromogenes* was the species most frequently isolated, with prevalence around 70%. *S. xylosus* e *S. sciuri* showed prevalence of 7% each. The biochemical identification showed agreement of 78,6% with the molecular identification. The Cohen's Kappa coefficient calculated for the identification methods used was 59,7%, which is considered a borderline value between a good and a moderate agreement. The antibiotic resistance was relatively low: 24,8% for penicillin, 9,6% for oxacillin, 6,2% for ceftiofur and 3,4% to erythromycin. It was not observed any resistance against imipenem, cephalotin or to amoxicillin+clavulanate. The *mecA* gene was detected in 7,6% (11/145) of the isolates, although only two of them showed resistance to ceftiofur in the disk diffusion test. The *blaZ* gene was found in 44,4% (16/36) of strains resistant to penicillin. It was also detected in 7,3% (8/136) of isolates susceptible to this antibiotic. The significant differences in prevalence, observed among CNS species isolated from subclinical intramammary infections and the distinct distribution of resistance profiles amid them, suggest a clinical and epidemiological impact inherent to each coagulase negative staphylococcal species implicated in bovine mastitis.

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Teste da fermentação de açúcares para identificação dos ECNs.	23
<b>Figura 2.</b>	Gel de poliacrilamida com isolados e cepas-padrão.	24
<b>Figura 3.</b>	Gel de poliacrilamida com isolados de <i>S.chromogenes</i> e <i>S. warneri</i> .	26
<b>Figura 4.</b>	Gel de poliacrilamida com isolados de <i>S.chromogenes</i> .	26
<b>Figura 5.</b>	Gel de poliacrilamida com isolados de <i>S.chromogenes</i> após a dupla digestão com PvuII/HindIII.	27
<b>Figura 6.</b>	Placa de antibiograma com beta-lactâmicos.	31



## ÍNDICE DE QUADROS

	Página
<b>Quadro 1.</b> Oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação do gene <i>groEL</i> de <i>Staphylococcus</i> spp.	16
<b>Quadro 2.</b> Oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação dos genes de resistência.	19
<b>Quadro 3.</b> Oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação do gene <i>blaZ</i> .	19
<b>Quadro 4.</b> Critérios para interpretação dos valores de concordância através do coeficiente Kappa.	20
<b>Quadro 5.</b> Padrões de RFLP obtidos com o programa NebCutter v2.0.	25
<b>Quadro 6.</b> Coeficientes Kappa de concordância entre a identificação fenotípica e a identificação molecular das espécies de ECNs.	30
<b>Quadro 7.</b> Detecção gênica e perfis de resistência associados aos beta-lactâmicos.	34

## ÍNDICE DE TABELAS

		Página
<b>Tabela 1.</b>	Relação das propriedades, suas respectivas cidades, vacas em lactação, vacas com mastite e número de amostras.	13
<b>Tabela 2.</b>	Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos através da identificação fenotípica dos isolados.	21
<b>Tabela 3.</b>	Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos obtidas através do PCR-RFLP do gene <i>groEL</i> .	24
<b>Tabela 4.</b>	Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos através de MALDI-TOF MS.	28
<b>Tabela 5.</b>	Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos segundo as análises genotípicas e proteômicas dos isolados.	29
<b>Tabela 6.</b>	Resistência fenotípica entre as espécies de ECNs.	33
<b>Tabela 7.</b>	Resistência genotípica e fenotípica entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	37

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>AMH</b>	gar Muller Hinton
<b>AMVF</b>	gar Manitol Vermelho de Fenol
<b>BHI</b>	Infuso Cérebro Coração
<b>C</b>	graus Celsius
<b>CCS</b>	Contagem de Células Somáticas
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMT</b>	<i>California Mastitis Test</i>
<b>CNS</b>	coagulase-negative staphylococci
<b>DDS</b>	Difusão em disco simples
<b>DNA</b>	cido desoxirribonuclico
<b>dNTP</b>	desorribonucleotdeo trifosfatado
<b>ECN</b>	Estafilococos Coagulase-Negativos
<b>ECP</b>	Estafilococos Coagulase-Positivos
<b>EDTA</b>	cido etilenodiamino tetra-actico
<b>h</b>	horas
<b>HCl</b>	cido clordrico
<b>H<sub>2</sub>O</b>	gua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	perxido de hidrognio
<b><i>hsp60</i></b>	<i>heat-shock protein 60</i> (gene)
<b>HSP60</b>	<i>heat-shock protein 60</i>
<b>KOH</b>	hidróxido de potássio
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>kDa</b>	kilo-Dalton
<b>mg</b>	miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>MH</b>	Meller-Hinton
<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 Vo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz

<b>MRSA</b>	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> – <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>ng</b>	nanogramas
<b>nm</b>	nanômetro
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<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 da Polimerase
<b>PCR-RFLP</b>	<i>Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>rpm</b>	rotação por minuto
<b>SCC<sub>mec</sub></b>	cassete cromossômico de <i>mec</i> estafilocócico
<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

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 Mastite Bovina	3
2.2 Gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	4
2.3 Importância dos <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos na mastite bovina	4
2.4 Espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos envolvidas na mastite bovina	5
2.5 Identificação dos <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	6
2.6 PCR-RFLP do gene <i>groEL</i>	9
2.7 Resistência aos antimicrobianos	9
<b>OBJETIVOS</b>	12
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	13
4.1 Amostragem	13
4.2 Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.	13
4.3 Prova do hidróxido de potássio KOH (3%) e Prova da Catalase	14
4.4 Identificação fenotípica das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	14
4.5 Identificação genotípica de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	15
4.6 Identificação por MALDI-TOF MS	17
4.7 Caracterização da suscetibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos e macrolídeos	17
4.8 Detecção genotípica de resistência aos beta-lactâmicos	19
4.9 Análise dos Dados	19
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	21
5.1 Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos isolados de mastite	21
5.2. Resistência antimicrobiana	30
5.3. Detecção de genes de resistência	33
<b>CONCLUSÕES</b>	39
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	40
<b>ANEXO A</b>	51

## 1 INTRODUÇÃO

No mundo todo, a mastite é a doença mais comum dos rebanhos leiteiros e a que exerce o maior impacto econômico sobre a indústria de laticínios. A mastite bovina é uma doença multifatorial, e tem como causa mais frequente as infecções bacterianas da glândula mamária. Muitos microrganismos têm sido isolados de infecções intramamárias em bovinos, entretanto, os principais agentes bacterianos envolvidos são estafilococos, estreptococos e coliformes (BOTREL et al., 2010; BRADLEY et al., 2007).

Recentemente, diversos estudos têm mostrado a alta prevalência das infecções por estafilococos coagulase-negativos (ECNs) na etiologia da mastite subclínica (SIMOJOKI, 2011). Este grupo consiste de mais de 40 espécies e subespécies, sendo que, atualmente, mais de 15 são associadas à mastite bovina (EUZÉBY, 2014; SAWANT et al., 2009). Embora sejam microrganismos frequentemente isolados de vacas com infecções intramamárias, o conhecimento sobre a prevalência relativa das diferentes espécies do grupo, bem como seu perfil de resistência a antimicrobianos, ainda apresentam muitas lacunas (PARK et al., 2011; WALLER et al., 2011).

Em função do grande número de espécies, com particularidades ecológicas próprias, os ECNs não podem mais ser considerados como um grupo homogêneo, e as espécies deveriam ser estudadas individualmente, para a avaliação correta do impacto real de cada uma, em rebanho leiteiros. Entretanto, a determinação convencional das espécies de ECNs é laboriosa e demorada, sendo realizada com base em diversas provas bioquímicas. Além disso, em função de perfis metabólicos bastante similares entre algumas espécies, os resultados podem ser enganosos, já que poucas provas são capazes de distinguir umas das outras e o grau de subjetividade intrínseco à leitura de alguns testes pode interferir na precisão dos protocolos fenotípicos (ZADOKS e WATTS, 2009).

Foram desenvolvidos kits comerciais de identificação rápida, como o *API Staph ID* e o *Staph-Zym*, para amostras de origem humana (HEIKENS et al., 2005). Seu desempenho nesses casos é relativamente adequado, embora seja frequente o número de amostras não identificadas ou que exigem testes complementares para a caracterização diagnóstica. Infelizmente, para amostras de origem animal os resultados obtidos são pouco satisfatórios (SANTOS et al, 2008) e estes sistemas não identificam muitas das espécies envolvidas na etiologia da mastite (BES et al., 2000).

Diversos métodos genotípicos de identificação têm sido desenvolvidos, na tentativa de solucionar esses problemas. Entre eles, destaca-se a identificação de espécies de *Staphylococcus* através da técnica de PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) de uma sequência parcial do gene *groEL*. Este gene codifica um polipeptídeo constitutivo de 60-kDa, a HSP60 (*heat-shock protein 60*), subunidade de uma chaperona imprescindível para o correto enovelamento de proteínas do microrganismo.

A utilização do gene *groEL* na identificação dos ECNs é justificada por ele possuir sequências bem conservadas intraespecificamente, mas com suficiente variação para permitir a diferenciação entre espécies (SANTOS et al, 2008; GOH et al, 1997).

Os antimicrobianos são ferramentas centrais nos programas de controle de mastite, portanto, o monitoramento da resistência bacteriana a esses medicamentos tem grande importância na prática veterinária. Há relatos de resistência aos beta-lactâmicos, macrolídeos e lincosamidas, em ECNs isolados do leite de vacas com mastite clínica e subclínica (PIESSENS, 2011a). Ainda assim, poucos estudos têm investigado as diferenças nos perfis de resistência entre as espécies de ECNs (SAMPIMON et al, 2009). Na ausência de intervenção terapêutica, esses microrganismos podem causar infecções crônicas que persistem durante todo o período de lactação. Seu controle é complicado em função da heterogeneidade

do grupo, no qual a presença de genes de resistência é um achado comum. Há evidências de que os ECNs podem atuar como reservatórios de elementos determinantes de resistência, com potencial de transmiti-los a outros estafilococos (MELO, 2013; TAPONEN et al., 2008).

Dentre os mecanismos de resistência a beta-lactâmicos já descritos para *Staphylococcus* spp., encontram-se a produção de beta-lactamases e a modificação das proteínas de ligação à penicilina, chamadas PBPs. O gene *mecA* codifica a proteína ligadora de penicilina modificada (PBP2a), que possui baixa afinidade pelos beta-lactâmicos. Em *Staphylococcus* spp., este é o mecanismo de resistência mais importante e implica na resistência a todos os antibióticos desta classe (MELO, 2013). O cassete *mec* carrega outros elementos genéticos como Tn554, pUB110 e pT181, que codificam a resistência à outras classes de antimicrobianos, como macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, aminoglicosídeos e tetraciclina. A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. contribui para a circulação mundial de clones multidroga-resistentes e tem sido apontada como mecanismo comum de resistência a fármacos (MELO, 2013).

Além disso, os estafilococos podem tornar-se resistentes através da produção de beta-lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico. A síntese desta enzima é codificada pelo gene plasmidial *blaZ* e pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaRI* (CLARKE e DYKE, 2001).

Assim, os objetivos deste trabalho foram a identificação fenotípica das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos, envolvidas na mastite bovina e a caracterização da sua suscetibilidade à antimicrobianos, em particular aos beta-lactâmicos, através da leitura interpretativa de antibiogramas e da detecção dos genes responsáveis por resistência a esses fármacos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mastite bovina

A palavra mastite, derivada do grego *mastos*, ou mamite, do latim *mammae*, designa uma doença de grande importância econômica, sobre a qual muito se tem investigado (DIAS, 2007). Etiologicamente, é uma doença complexa de caráter multifatorial, que pode envolver diversos patógenos, além de fatores ambientais ou inerentes ao animal. A mastite caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária, que pode ser desencadeado por injúria química, mecânica, ou mais frequentemente, por infecções bacterianas. A bactéria invasora interage com o tecido do úbere e ativa o sistema imune do animal, induzindo a migração de neutrófilos do sangue e resultando no aumento da contagem de células somáticas no leite (SIMOJOKI, 2011).

Esta patologia provoca alterações no parênquima glandular e nas propriedades físico-químicas do leite. No contexto da bovinocultura leiteira, além de ser a doença mais prevalente, é também a de maior relevância do ponto de vista econômico, constituindo-se no principal motivo para a utilização de antimicrobianos nos plantéis (SAINI et al., 2012). Os prejuízos diretos que acarreta aos produtores rurais decorrem da redução na quantidade e na qualidade do leite, aumento dos gastos com medicamentos e serviços veterinários, diminuição do valor comercial do plantel e descarte prematuro dos animais (MØRK et al., 2012).

A mastite clínica caracteriza-se por sintomas inflamatórios típicos, como edema, aumento de temperatura, vermelhidão e dor à palpação, além do aparecimento de grumos, pus e sangue no leite. Embora este tipo de mastite possa acarretar a perda funcional da glândula mamária e até a morte do animal, os maiores prejuízos são causados pela mastite subclínica, por seu caráter insidioso, já que os sinais no animal e as alterações das características do leite são pouco aparentes, necessitando métodos diagnósticos específicos (WALLER et al., 2011).

Apesar dos sintomas pouco evidentes, a mastite subclínica também promove alterações na composição do leite, com típico aumento na contagem de células somáticas (CCS) e redução nos teores de caseína, cálcio, gordura e lactose. Assim, a baixa qualidade do leite afeta diretamente a indústria de laticínios, pois o rendimento e a vida de prateleira de derivados lácteos, como queijos e iogurtes, dependem diretamente da qualidade inicial da matéria-prima (PIESSENS, 2011a). Deve-se ressaltar ainda, a importância das infecções intramamárias bovinas em relação à saúde pública, principalmente pelo envolvimento de bactérias patogênicas, algumas delas produtoras de toxinas termoestáveis (VANDERHAEGHEN et al., 2010).

Provas auxiliares que detectem a elevação da contagem de células somáticas (CCS) são de grande auxílio no diagnóstico da mastite subclínica. A mensuração pode ser direta, através da contagem eletrônica (CECS), ou indireta, por meio dos testes *California Mastitis Test* (CMT) ou *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) (PARADIS et al., 2010).

Os principais microrganismos causadores de mastite são convencionalmente agrupados, quanto à sua origem e ao modo de transmissão, em dois grupos: agentes das mastites contagiosas e agentes das mastites ambientais. Os microrganismos contagiosos são transmitidos principalmente durante a ordenha: através das mãos dos ordenhadores, do equipamento de ordenha, ou pela utilização de panos e esponjas de uso coletivo em quartos mamários infectados. Devido às suas características, determinam na maioria das vezes, infecções subclínicas persistentes, resultando em mastites crônicas (TAPONEN et al., 2006). Neste grupo, encontra-se o gênero *Staphylococcus*, com destaque especial para o *S. aureus*.

Nas últimas décadas, vários países têm alcançado uma redução significativa na CCS de seus plantéis leiteiros, como consequência de um controle mais adequado dos principais agentes patogênicos contagiosos (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*).



Entretanto tem sido observado, nesses rebanhos, o aumento na prevalência e na incidência de infecções intramamárias por *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECNs), que atualmente, lideram os quadros subclínicos em diversas regiões (FREY et al., 2013; SAINI et al., 2012). Este aumento pode ser resultado do aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos utilizados, do maior destaque que estes microrganismos adquiriram recentemente ou ainda, consequência de alterações na etiologia das infecções intramamárias, em função do controle de patógenos primários (PIESSENS, 2011a).

## 2.2 Gênero *Staphylococcus* spp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* (família *Staphylococcaceae*) são microrganismos gram-positivos esféricos, que à observação microscópica apresentam arranjo em “cacho de uva”. Integrantes deste gênero apresentam respiração anaeróbia facultativa, presença da enzima catalase, resistência à bacitracina, ausência de motilidade e halotolerância – a maioria das cepas sobrevive à presença de até 10% de cloreto de sódio no meio (PIESSENS, 2011a).

Enquanto algumas espécies fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos, outras estão ubiquamente distribuídas em diversos nichos ecológicos, como solo, água, ar, além de alimentos como a carne, o leite cru e os queijos (COTON et al., 2010; SCHLEIFER e BELL, 2009; IRLINGER, 2008).

Em 1985, mais de 15 espécies de *Staphylococcus* já haviam sido descritas e, nos últimos, anos este número tem aumentado muito, especialmente as de origem animal (TAPONEN et al., 2012; RIESEN e PERRETEN, 2010; SUPRÉ et al., 2010; SPERGSEER et al., 2003; VERNOZY-ROZAND et al., 2000). Atualmente, o gênero *Staphylococcus* consiste de 49 espécies e 26 subespécies, das quais a maioria são ECNs (EUZÉBY, 2014).

Espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos (*Staphylococcus aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus*) e de *Staphylococcus* coagulase-negativos são separadas por meio da prova fenotípica da coagulase, uma enzima que está associada à patogenicidade e realiza a conversão do fibrinogênio em fibrina, resultando na coagulação do plasma (SOARES, 2010).

De modo geral, os ECNs são microrganismos comensais de humanos e animais, com grau de patogenicidade relativamente baixo e que causam infecções de caráter predominantemente oportunista. Excepcionalmente, destaca-se o *S. epidermidis*, microrganismo típico da pele humana. Sua importância como agente de infecções nosocomiais severas encontra-se bem estabelecida, e deve-se à sua eficiência na produção de biofilmes e à frequência com que apresenta resistência aos antimicrobianos. Entretanto, o interesse pelas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos tem aumentado também na medicina veterinária. (VERDAYES et al., 2012; PIESSENS, 2011a).

## 2.3 Importância dos *Staphylococcus* coagulase-negativos na mastite bovina

Em rebanhos leiteiros de diversos países, os ECNs são os microrganismos mais isolados do leite bovino e são uma importante causa de mastite subclínica (DE VLIEGHER et al., 2012; PIESSENS et al., 2011b; PYORALA e TAPONEN, 2009; RAJALA-SCHULTZ et al., 2009). Devido à forte correlação entre inflamação e presença de infecção, a contagem de células somáticas (CCS) é um dos métodos mais utilizados de se constatar a saúde da glândula mamária. Nos quartos mamários saudáveis, a CCS fica normalmente entre 20.000/mL e 100.000/mL (SCHUKKEN et al., 2009).

Apesar de sua virulência comparativamente baixa, os ECNs aumentam a CCS nos quartos mamários acometidos e apresentam resistência frequente aos antimicrobianos

indicados no tratamento destas infecções. Muitos estudos indicam que microrganismos deste grupo devem ser considerados patógenos emergentes, o que justificaria uma maior atenção em rebanhos leiteiros que objetivam baixos índices de CCS (PYÖRÄLÄ e TAPONEN, 2009; PARADIS et al., 2010). Alguns deles realmente dispõem de fatores de virulência, como a capacidade de produzir *slime*, um mucopolissacarídeo que pode contribuir para sua disseminação e sucesso em infecções oportunistas (PIESSENS, 2011a).

Em pesquisas de abrangência nacional, nos Estados Unidos e em países europeus, os ECNs são frequentemente isolados de quartos com CCS elevada. Em geral, observa-se elevação de duas a três vezes na CCS, embora já tenham sido relatados aumentos de até dez vezes (TAPONEN et al., 2007). Na região de Flandres, na Bélgica, eles foram isolados de 41% dos quartos com cultura microbiológica positiva, em animais que apresentavam alta CCS (PIEPERS et al., 2007). Na Inglaterra, também foram o achado mais comum em quartos com CCS > 200.000 células/mL e em 8% dos casos clínicos de mastite foram considerados como o único agente responsável (BRADLEY et al., 2007).

Alguns estudos chegaram a sugerir um efeito protetor destes agentes, correlacionando sua presença com uma menor incidência de mastite clínica e maior produção de leite em novilhas recém-paridas (PIEPERS et al., 2010). No entanto, estudos com vacas adultas indicaram que animais com infecções intramamárias por ECNs eram, antes da infecção, animais de alto rendimento em relação à média do rebanho. Portanto, o efeito supostamente benéfico destes microrganismos nos quartos mamários, talvez esconda prejuízos bastante significativos no rendimento dos animais (PIESSENS, 2011a).

Na Holanda, a prevalência nacional de *Staphylococcus* coagulase-negativos aproxima-se de 11% (SAMPIMON et al., 2009). Na França, em um levantamento nacional, ECNs foram isolados de 13,7% de quadros subclínicos e em 9,5% de casos clínicos de mastite (BOTREL et al., 2010). Na Finlândia, foram isolados ECNs de 50% das amostras positivas no cultivo bacteriológico (PITKALA et al., 2004). Em um amplo estudo com rebanhos leiteiros dos Estados Unidos, a média nacional de isolamento de ECNs foi de 15% entre os animais com infecções intramamárias. Entretanto, neste trabalho, os índices observados nas diversas fazendas estudadas oscilaram entre 0 a 100% de infecções por esses patógenos (SCHUKKEN et al., 2009).

No Brasil, a taxa de isolamento de ECNs de casos de mastite bovina, varia entre 12% e 50%. Estudos realizados em rebanhos do Paraná e de Minas Gerais apontaram prevalências semelhantes destes agentes, em torno de 30% (SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

#### **2.4 Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas envolvidas na mastite bovina**

Os estudos divergem bastante sobre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas mais isoladas de infecções intramamárias no gado leiteiro, mas *S. chromogenes* parece ser a espécie predominante na maioria dos trabalhos. Outras espécies frequentemente encontradas são: *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. arlettae* e *S. xylosum* (PARK et al., 2011; SOARES, 2010; THORBERG et al., 2009; SAMPIMON et al., 2009; TAPONEN et al., 2007; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004). *S. hyicus*, uma espécie coagulase variável, também é frequentemente citada nos trabalhos. Espécies mais raramente associadas com a mastite bovina, mas recorrentes em vários estudos incluem *S. sciuri*, *S. capitis* e *S. hominis* (SAINI et al., 2012; SAMPIMON et al., 2009; CHAFFER et al., 1999).

Algumas delas colonizam naturalmente algumas regiões do corpo dos bovinos, principalmente pele e mucosas. *S. chromogenes*, frequentemente isolado do leite, é também encontrado no canal e na pele dos tetos mamários (PIESSENS, 2011a; THORBERG et al., 2009; TAPONEN et al., 2008).

Numa pesquisa sobre a distribuição de fatores de virulência em isolados de mastite bovina, diversos genes que codificam superantígenos (SAg) foram encontrados em cerca de 30% dos 263 ECNs estudados. A maioria dos isolados que possuíam esses genes foi identificada genotipicamente como *S. chromogenes* (PARK et al., 2011).

*Staphylococcus xylosus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. cohnii* são espécies predominantes em amostras coletadas no ambiente das fazendas, incluindo equipamentos de ordenha ou forragem usada na cama dos animais. Estas espécies também são encontradas na pele do teto e do úbere bovino, na pelagem e narinas dos animais. *S. xylosus* e *S. sciuri* são isoladas de infecções intramamárias em ruminantes, mas em menor proporção do que outras espécies tipicamente associadas à mastite (DE VLIEGHER et al., 2012; PIESENS, 2011a).

Dada a preferência por determinados nichos, as rotas de transmissão e as fontes de infecção de diferentes espécies podem diferir bastante. Através da técnica de PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), estudos concluíram que a fonte mais provável de infecções por *S. epidermidis* e *S. chromogenes* são, respectivamente, as mãos dos ordenhadores e a pele bovina. Constatou-se também que algumas cepas de *S. epidermidis* disseminam-se dentro dos plantéis e causam infecções persistentes (TAPONEN et al., 2008; THORBERG et al., 2006). Embora não seja comum que as mastites por *Staphylococcus* coagulase-negativos evoluam e manifestem-se clinicamente, *S. chromogenes*, *S. hyicus* e *S. simulans* já foram associados a quadros clínicos em vacas primíparas (PIESENS, 2011a).

Em rebanhos do Paraná, as espécies isoladas com maior frequência entre 104 isolados de ECNs foram: *S. hyicus* (variante coagulase-negativa) (26,3%), *S. chromogenes* (18,5%), *S. epidermidis* (17,5%), *S. xylosus* (9,6%) e *S. warneri* (9,6%) (SANTOS et al., 2010). Em um estudo realizado em fazendas de Minas Gerais, foram isolados 120 ECNs e as principais espécies incluíram: *S. hyicus* (variante coagulase-negativa) (15,0%), *S. chromogenes* (12,5%), *S. gallinarum* (12,5%), *S. lentus* (12,5%) e *S. epidermidis* (10,8%) (SANTOS et al., 2011). As espécies prevalentes entre os isolados obtidos de 10 propriedades da região Sul-fluminense foram: *S. xylosus* (70%), *S. cohnii* (10%), *S. hominis* (8%), *S. capitis* (7%) e *S. haemolyticus* (5%) (SOARES, 2010). Diferenças observadas com relação à distribuição de espécies de ECNs são em geral atribuídas a diferenças regionais ou a problemas dos métodos de identificação fenotípicos utilizados (COTON et al., 2010).

Embora a diversidade de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de infecções intramamárias bovinas seja grande, ainda não se conhece bem o impacto clínico e epidemiológico próprio de cada um (PIESENS, 2011a).

Estudos recentes encontraram diferenças na elevação da CCS por diferentes ECNs. Há indícios de um maior grau de patogenicidade associado a *S. chromogenes* e à espécie coagulase variável, *S. hyicus*, embora as causas destas observações não tenham sido elucidadas. Em modelos experimentais, vacas infectadas com *S. chromogenes* desenvolveram mastite clínica branda, com sinais clínicos e redução na produção leiteira de aproximadamente 16,3% (SIMOJOKI, 2011). Esta espécie também parece induzir escores mais altos no CMT (THORBERG et al. 2009). *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. epidermidis* demonstram maior tendência a causar infecções persistentes, quando comparados a outros ECNs. Infecções experimentais por *S. simulans* resultaram em uma resposta inflamatória ligeiramente mais intensa do que *S. epidermidis* (SIMOJOKI, 2011; SAMPIMON et al., 2009).

## 2.5 Identificação dos *Staphylococcus* coagulase-negativos

Na rotina laboratorial, os ECNs são normalmente diagnosticados como um grupo, sem identificação da espécie envolvida. A compreensão do seu papel na etiologia da mastite bovina é complicada não apenas pela heterogeneidade do grupo, mas também pela alta prevalência de espécies com características fenotípicas raras, atípicas ou mal definidas, o que

dificulta a correta caracterização através dos métodos fenotípicos. Entretanto, para o esclarecimento de achados contraditórios sobre as infecções por estes microrganismos, é imprescindível a identificação precisa das diversas espécies envolvidas. Deste modo, os métodos convencionais de identificação, laboriosos e pouco confiáveis, deveriam ser complementados com métodos moleculares ou proteômicos mais robustos e acurados (FREY et al., 2013; PIESENS, 2011a).

Em comparação com o grupo dos *Staphylococcus* coagulase-positivos (ECPs), a identificação dos ECNs requer um grande número de provas microbiológicas bioquímicas, utilizadas em esquemas de identificação convencionais ou simplificados (LUCHEIS, 2011; CUNHA et al., 2004; THORBERG e BRÄNDSTRÖM, 2000; WATTS et al., 1991; DEVRIESE et al., 1985; KLOOS e SCHLEIFER, 1975). Apesar do desempenho razoável destes protocolos, seu emprego fica inviabilizado na rotina diagnóstica dos laboratórios, por serem laboriosos e demandarem bastante tempo para execução (DE VLIEGHER et al., 2012).

Foram desenvolvidos kits comerciais que possibilitam uma identificação rápida das espécies do grupo a partir de amostras clínicas humanas, como o *API Staph ID* (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e o *Staph-Zym* (Rosco, Taastrup, Dinamarca). Esses sistemas combinam algumas provas bioquímicas e são relativamente eficientes na identificação de isolados humanos. Apesar do alto custo, sua aplicação em laboratórios hospitalares tem o seu maior atrativo na rapidez da obtenção dos resultados. Ainda assim, limitações na sua precisão são frequentemente relatadas, principalmente com isolados que não sejam *S. epidermidis* (CUNHA et al., 2004; RENNEBERG et al., 1995; BANNERMAN et al., 1993). Um estudo comparando a identificação pelo *API Staph ID*, de cepas de referência e isolados clínicos humanos, com o sequenciamento dos genes *tuf*, 16S rRNA e *sodA*, observou que este sistema comercial alcançou uma identificação correta para 85% (40/47) dos isolados (HEIKENS et al., 2005).

Em função da sua praticidade, eles chegaram a ser recomendados nos Estados Unidos, pelo *National Mastitis Council*, para a diferenciação das espécies de ECNs em amostras animais (HOGAN et al., 1999). Entretanto, sua capacidade de identificação de isolados de mastite bovina, tem sido investigada e questionada, uma vez que ocorre baixa sensibilidade, relacionada ao alto número de isolados não identificados (PARK et al., 2011; ONNI et al., 2010; CAPURRO et al., 2009; SAMPIMON et al., 2009; TAPONEN et al., 2008; THORBERG e BRÄNDSTRÖM, 2000). Além disso, o nível de concordância desses kits com os métodos de referência, convencionais ou genotípicos (como o sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*) é pouco satisfatório, oscilando entre 31% - 77% (PARK et al., 2011; SAMPIMON et al., 2009). Este tipo de imprecisão pode acarretar erros de interpretação, e o impacto de certas espécies pode ser subestimado.

A identificação por kits parece ser particularmente problemática para as espécies *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. epidermidis*, quando obtidas de amostras animais, inviabilizando sua aplicação no diagnóstico da mastite bovina (PARK et al., 2011; FESSLER et al., 2010; ONNI et al., 2010; SAMPIMON et al., 2009). Levando-se em consideração que tais sistemas foram desenvolvidos para o processamento de amostras clínicas humanas, estes resultados não são surpreendentes, já que a composição das populações de ECNs provenientes de ruminantes é bastante distinta (PIESENS, 2011a). Além disso, pode haver variabilidade intraespecífica em cepas isoladas de diferentes espécies de hospedeiros (ZADOKS e WATTS, 2009; SUPRÉ et al., 2009).

Na tentativa de superar os problemas associados à identificação fenotípica, muitos métodos moleculares foram sugeridos para a diferenciação dos *Staphylococcus* coagulase-negativos. O sequenciamento de genes *housekeeping*, por exemplo, é bastante utilizado em estudos filogenéticos para definir novas espécies e a distância genética entre elas, mas o custo

elevado limita sua aplicação na rotina diagnóstica (GHEBREMEDHIN et al., 2008; TAKAHASHI et al., 1999).

A ribotipagem é um método em que a restrição do genoma é seguida da hibridização com sondas complementares ao DNA ribossomal. Esta técnica pode ser automatizada e apresenta uma boa discriminação das espécies de *Staphylococcus* (TAPONEN et al., 2008; van BELKUM et al., 2007; BES et al., 2000).

Algumas técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* cujos alvos são regiões específicas do genoma bacteriano, foram otimizadas para a identificação rápida de ECNs, tanto de origem humana como de origem animal. Entre elas destacam-se o tDNA-PCR (*transfer RNA intergenic spacer length polymorphism*-PCR) (SUPRÉ et al., 2009), o ITS-PCR (16S-23S rDNA *gene internal transcribed spacer*-PCR) (BES et al., 2000) e o (GTG)<sub>5</sub>-repPCR (repetitive PCR com o primer GTG<sub>5</sub>) (BRAEM et al., 2011). O princípio básico destes métodos é a comparação dos perfis de bandas dos isolados, com os perfis de cepas-padrão, para chegar à identificação final da espécie. Assim, a composição dos perfis de referência é da maior importância. De modo a aumentar o poder de resolução destas técnicas, uma etapa com enzimas de restrição pode ser incluída, do mesmo modo que é realizado no PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis*) (ZADOKS e WATTS, 2009). Outro método já sugerido para a identificação de ECNs consiste na genotipagem por AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), baseado na clivagem do DNA genômico por endonucleases e posteriormente, na amplificação seletiva de alguns dos fragmentos através da PCR (PIESSENS, 2011a).

A utilização do PCR-RFLP de alguns genes (16s rRNA, *rrs*, *femA*, *gap*, *rpoB*, *tuf*, *sodA*, *dnaJ*, *hsp60*, entre outros), também tem sido proposto para a especiação de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de amostras animais (ONNI et al., 2010; HAUSCHILD E STEPANOVIC, 2008).

A técnica de PCR-RFLP compara perfis de fragmentos de DNA, obtidos a partir da ação de enzimas de restrição sobre os produtos da amplificação (*amplicons*) do gene alvo. Os fragmentos são separados com base no seu tamanho molecular por eletroforese em gel, dando origem a padrões característicos para cada espécie. Normalmente, os perfis gerados contêm um número limitado de fragmentos e possuem grande especificidade. As vantagens deste método são a rapidez, reprodutibilidade, a facilidade de execução e o custo relativamente baixo, mas em alguns casos, limitações no seu poder discriminatório podem levar a falhas na diferenciação de espécies intimamente relacionadas (ONNI et al., 2012; PARK et al., 2011; SANTOS et al., 2008).

Recentemente, a promissora técnica de análise proteômica, MALDI-TOF MS (Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz) tem sido cada vez mais utilizada, particularmente na identificação microbiológica, destacando-se a velocidade de obtenção dos resultados, baixo custo, quantidade mínima de amostra exigida e baixos níveis de resíduos químicos e biológicos gerados (SALGADO, 2013; CARBONNELLE et al., 2011; ALATOOM et al., 2011; DUBOIS et al., 2010). O excelente desempenho desta técnica, na identificação das espécies de ECNs isolados de mastite bovina foi apontado por diversos estudos (FREY et al., 2013; SALGADO, 2013; PIESSENS, 2011a; GIEBEL et al., 2010). Um pequeno fragmento da colônia a ser identificada é colocada juntamente com a matriz apropriada, sobre a placa do equipamento. A aplicação de um laser de nitrogênio provoca o aquecimento da matriz e uma parte dela é rapidamente vaporizada com a amostra. Os íons gerados são acelerados em direção ao detector, dando origem aos espectros das proteínas e peptídeos específicos para o microrganismo analisado, que serão comparados com os espectros do banco de dados do aparelho, permitindo a identificação subsequente precisa da espécie bacteriana. O MALDI-TOF MS demonstrou ser um método acurado de identificação e classificação bacteriana,

mesmo em amostras com baixos níveis de células ou com populações mistas de microrganismos (DECRISTOPHORIS et al., 2011).

## 2.6 PCR-RFLP do gene *groEL*

O gene *groEL* codifica o polipeptídeo GroEL ou HSP60 (*heat shock protein 60*), que é a subunidade de 60-kDa de uma chaperona constitutivamente expressa, que auxilia no enovelamento adequado de proteínas bacterianas (FINK, 1999).

Por ser bastante conservado intraespecificamente, mas com variações pontuais suficientes para permitir a distinção interespecífica, este gene tem sido utilizado em análises filogenéticas de diversos gêneros bacterianos, incluindo: *Bifidobacterium* (JIAN et al., 2001), *Helicobacter* (MIKKONEN et al., 2004), *Rickettsia* (LEE et al., 2003), *Staphylococcus* e *Micrococcus* (KWOK e CHOW, 2003; GOH et al., 1997), *Vibrio* (KWOK et al., 2002), *Enterococcus* (TENG et al., 2001), *Lactococcus* e *Vagococcus* (GOH et al., 2000).

Deste modo, uma técnica baseada no PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) de um fragmento do gene *groEL*, foi proposta para a identificação de espécies do gênero *Staphylococcus*. Barros e colaboradores (2007) descreveram e validaram o método, utilizando uma sequência parcial conservada do gene e a endonuclease AluI, codificada pelo gene *aluI* de *Arthrobacter luteus* e que reconhece o sítio 5'-AGCT-3', clivando-o.

O poder discriminatório da técnica foi posteriormente comprovado com estafilococos isolados de amostras de mastite bovina (SANTOS et al., 2008), mastite caprina (ONNI et al., 2012) e dermatites caninas (SALGADO, 2013). Com relação ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos em particular, a utilização do gene *groEL* demonstrou poder de resolução superior aos genes citados anteriormente, como *gap* e 16S rRNA, nos quais a especificidade dos padrões obtidos não foi tão satisfatória e várias espécies geraram perfis de bandas muito semelhantes (ONNI et al., 2012; SANTOS, et al., 2008; BARROS et al., 2007).

O protocolo inicial do PCR-RFLP do gene 16S rRNA exigia a utilização de três endonucleases, AluI, PstI e RsaI, mas não conseguiu uma boa diferenciação entre *S. epidermidis*, *S. caprae* e *S. capitis*. Tentou-se a associação consecutiva com o PCR-RFLP do gene *gap*, mas os *primers* utilizados não funcionaram para as espécies *S. warneri* e *S. sciuri* (ONNI et al., 2010). O protocolo do PCR-RFLP do gene *groEL* necessita apenas da enzima AluI, embora seja sugerida uma dupla clivagem posterior com as endonucleases HindIII e PvuII para melhor diferenciação das espécies *S. chromogenes*, *S. capitis* e *S. hyicus* (SANTOS et al., 2008; BARROS et al., 2007).

## 2.7 Resistência a antimicrobianos

A terapia antimicrobiana é implementada na prevenção e no controle da mastite bovina, e eleva o ônus para o produtor, não só pelo custo do medicamento mas por determinar um período de carência, em que o leite deve ser descartado em função da presença de resíduos do fármaco. A utilização indiscriminada desses medicamentos representa também um risco para a saúde pública, porque tem o potencial de selecionar cepas resistentes (SAINI et al., 2012; PIESSENS, 2011a).

Os antimicrobianos mais empregados, nesse contexto, são os beta-lactâmicos. O uso habitual da cloxacilina, um beta-lactâmico resistente às penicilinas, ao fim da lactação (“terapia da vaca seca”), tem sido questionado quanto à capacidade de seleção de cepas resistentes à meticilina, um antimicrobiano reservado para o tratamento hospitalar de infecções refratárias (MELO, 2013; SAINI et al., 2012).

A emergência e transferência de cepas resistentes ou de determinantes genéticos de resistência, de populações animais para populações humanas, através da cadeia produtiva dos alimentos, é uma preocupação crescente (MELO, 2013). No caso da pecuária leiteira, mesmo que uma parte do leite produzido receba tratamentos térmicos adequados, ainda são práticas frequentes o consumo de leite cru e a venda de laticínios produzidos a partir de leite não pasteurizado. Portanto, é necessário monitorar a suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos presentes nos produtos de origem animal, por razões de saúde pública e saúde animal, além de uma maior segurança alimentar (SAINI et al., 2012).

Embora a prevalência de cepas resistentes em plantéis leiteiros seja relativamente baixa, há relatos cada vez mais frequentes de resistência dos ECNs a antimicrobianos comumente utilizados no controle da mastite, como os beta-lactâmicos, macrolídeos e aminoglicosídeos (MELO, 2013; SAMPIMON et al., 2011; SOARES, 2010; SAWANT et al., 2009; WALTHER e PERRETTEN, 2007).

Além disso, foi constatada uma correlação direta entre os antimicrobianos utilizados nas fazendas e a redução na suscetibilidade a esses medicamentos, em ECNs isolados dos rebanhos (PIESSENS, 2011a; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004). Essa observação sugere que a pressão seletiva é um fator importante no desenvolvimento da resistência nesses microrganismos (BOTREL et al., 2010). Estudos demonstraram ainda, que os ECNs isolados de fazendas que empregam métodos convencionais de produção, têm maior probabilidade de ser resistentes à ampicilina, penicilina e tetraciclina, do que os obtidos de fazendas orgânicas (POL e RUEGG, 2007; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004).

Há diferenças consideráveis nos perfis dos rebanhos de diferentes regiões ou países, mas de modo geral, a resistência à penicilina parece ser a mais comum.

Esta resistência, no gênero *Staphylococcus*, é determinada principalmente pela produção de uma beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*. Pode também ocorrer através da presença e expressão do gene *mecA* (SOARES, 2010; BOTREL et al., 2010; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004; PITKALA et al., 2004). O cassete SCC*mec* contém os genes *mec* — *mecA* ou *mecC* (*mecA*<sub>LGA251</sub>) — que codificam uma proteína de ligação à penicilina alternativa, a PBP2a. Esta PBP modificada confere resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, mesmo os que resistem à ação das penicilinas (MELO, 2013; BARBIER et al., 2010; TSUBAKISHITA et al., 2010).

Nesse sentido, a maior importância dos *Staphylococcus* coagulase-negativos reside na sua capacidade de carrear elementos de resistência, como o cassete cromossomal SCC*mec*, pois há potencial de transferência destes elementos para microrganismos mais patogênicos para humanos e animais, como *S. aureus* (SAMPIMON et al., 2011).

Em julho de 2013, foi publicada a quarta edição dos padrões veterinários do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com a revisão e a atualização dos critérios e testes indicados para a avaliação da resistência a antimicrobianos, de patógenos bacterianos isolados de animais. Entre as alterações mais significativas, estão a recomendação do teste de difusão com discos de cefoxitina, em detrimento dos de oxacilina, na determinação da suscetibilidade à classe dos beta-lactâmicos e como preditor da presença do gene *mecA*, em *Staphylococcus* coagulase-negativos. Cepas que expressam este gene são resistentes à meticilina e a todas as classes de penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e monobactâmicos. Embora o critério interpretativo da oxacilina mostre uma boa correlação com a detecção do gene *mecA* em *S. epidermidis*, para os demais ECNs ela em geral superestima a resistência aos beta-lactâmicos e a presença do gene *mecA*. O teste de difusão com o disco de cefoxitina tem maior especificidade do que a oxacilina na predição do gene *mecA* em ECNs, além de apresentar uma leitura mais fácil no antibiograma. Ainda segundo o documento do CLSI, a detecção do gene *mecA* por PCR ou da PBP2a (por testes de aglutinação em látex, por exemplo), são mais precisos e podem ser utilizados para a confirmação dos resultados fenotípicos. A penicilina e

a cefoxitina indicam, respectivamente, resistência mediada por beta-lactamases e pela produção de PBP2a. Entretanto, suscetibilidade a esses antimicrobianos não significa necessariamente suscetibilidade a todos os outros beta-lactâmicos, e a realização de antibiogramas para os demais fármacos ainda é recomendada (CLSI VET01-A4; 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

Apesar da baixa prevalência de ECNs resistentes à meticilina isolados do leite (2-10%), a colonização de animais de produção por estas cepas é motivo de preocupação, agravada pelo fato de que elas mostram-se frequentemente resistentes a outras classes de antimicrobianos, incluindo macrolídeos, tetraciclínas e aminoglicosídeos (FREY et al., 2013; MOON et al., 2007; WOODFORD, 2005).

Alguns autores registraram diferenças significativas nos perfis de suscetibilidade de algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos. A resistência à meticilina parece ser mais comum em *S. epidermidis* (SAWANT et al., 2009). Em isolados bovinos desta espécie, a multirresistência às diferentes classes antimicrobianas é também mais usual do que em outros ECNs. Por outro lado, isolados resistentes à eritromicina são mais observados entre *S. equorum*, enquanto que a resistência à oxacilina é mais encontrada em cepas de *S. xylosus*. Além disso, há relatos de diferenças na ocorrência do gene *mecA* em diferentes espécies (SAMPIMON et al., 2011; FESSLER et al., 2010; SAWANT et al., 2009).

Em *Staphylococcus sciuri*, um gene homólogo ao *mecA*, o gene nativo *mecA1* ou *pbpD*, não faz parte do complexo *mec*. A maioria das cepas desta espécie são suscetíveis aos compostos beta-lactâmicos. Entretanto, modificações nas regiões promotoras do gene *pbpD* regulam positivamente a expressão do *mecA*, provocando o surgimento de resistência à meticilina. Há indícios de que o gene *pbpD* do *S. sciuri* tenha dado origem ao gene *mecA* encontrado em *S. aureus* (MELO, 2013; TSUBAKISHITA et al., 2010; WU et al., 2005; COUTO et al., 2003).

Deste modo, tendo em vista a necessidade crescente da identificação precisa das espécies de ECNs envolvidas na mastite bovina, bem como da investigação dos perfis de suscetibilidade destas espécies, diferentes métodos fenotípicos e moleculares foram utilizados neste trabalho, para a especiação e detecção de resistência antimicrobiana nos isolados.



## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de quadros de mastite bovina, por métodos fenotípicos e genotípicos e avaliar o seu perfil de resistência antimicrobiana, em especial aos  $\beta$ -lactâmicos.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes métodos de identificação de *Staphylococcus* coagulase-negativos: o método fenotípico, através de provas bioquímicas laboratoriais convencionais e o método genotípico, através do PCR-RFLP de uma sequência parcial do gene *groEL*.
- Confirmar a identificação das espécies através da técnica de MALDI-TOF MS, utilizada como parâmetro para avaliar a confiabilidade dos métodos fenotípico e genotípico.
- Avaliar a suscetibilidade dos isolados a diferentes classes de antimicrobianos, em especial os beta-lactâmicos.
- Avaliar os isolados quanto à produção de beta-lactamases e de PBP2a, através da leitura interpretativa dos antibiogramas, segundo os novos critérios do CLSI (2013).
- Detectar a presença de genes que codificam resistência aos beta-lactâmicos.
- Comparar e interpretar a suscetibilidade antimicrobiana das espécies de ECNs encontradas, estabelecendo perfis de expressão enzimática que conferem resistência aos principais antibióticos utilizados nos rebanhos leiteiros, buscando correlação entre as análises genotípicas e fenotípicas de resistência aos beta-lactâmicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

Foram utilizados 145 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, oriundos de 512 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, além de 33 amostras coletadas da cadeia produtiva, de acordo com o tipo de ordenha realizada nas fazendas. As amostras foram coletadas em 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, 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-se 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 dos animais considerados positivos, por ordenha manual e individual, em frasco coletor estéril, após o descarte dos três primeiros jatos. Foram observadas as normas de antissepsia dos tetos e mãos, como a utilização de álcool iodado e toalhas de papel na limpeza do local. 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 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foram processadas e estocadas.

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

As amostras de leite 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 puras

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 morfológicas.

### **4.3 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, confirmando a prova do Gram. No teste da catalase, um fragmento de colônia bacteriana foi adicionada 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).

### **4.4 Identificação fenotípica das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos**

#### **4.4.1 Prova da Coagulase**

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

#### **4.4.2 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 (1mL) incubada por 24 hs em caldo BHI (Britania) foi distribuída por toda a superfície de uma placa com ágar Müller Hinton, com o auxílio de um *swab*. Um disco de bacitracina 0,04 UI (SENSIFAR - CEFAR<sup>®</sup>) foi depositado sobre a superfície do meio, contendo o inóculo. Após incubação por 24 hs 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, 10mm (KONEMAN et al., 2008). Os isolados identificados como *Staphylococcus* coagulase-negativos foram estocados em caldo BHI, acrescido de glicerol a 45 %.

#### **4.4.3 Resistência à novobiocina**

Uma suspensão bacteriana (1mL) incubada por 24 hs em caldo BHI (Britania) foi distribuída por toda a superfície de uma placa com ágar Müller Hinton, com o auxílio de um *swab*. Um disco de novobiocina 5 µg (SENSIFAR-CEFAR<sup>®</sup>) foi depositado sobre a superfície do meio com o inóculo. Após incubação por 24 hs a 35°C ± 2°C, a zona de inibição ao redor do disco foi observada e medida. Os estafilococos são considerados resistentes à novobiocina quando são formados halos inferiores a 12 mm (KONEMAN et al., 2008).

#### 4.4.4 Prova de fermentação de açúcares e produção de urease

Os açúcares avaliados foram: maltose, frutose, sacarose, lactose, D-manitol, manose, rafinose, trealose, celobiose, xilose, ribose e arabinose. A fermentação dos açúcares foi testada utilizando-se o caldo Vermelho de Fenol (Merck) acrescido de 1% do açúcar. A produção de ácido, indicada pela diminuição do pH e conseqüente mudança de cor do caldo para amarelo, foi avaliada após 24, 48 e 72 hs, à temperatura de 37°C (KONEMAN et al., 2008).

A prova da uréia foi realizada com uma suspensão densa do microrganismo, preparada em caldo urease (Himedia). O desenvolvimento da cor rosa no meio, após 4 hs de incubação, representa resultado positivo; provas negativas devem ser reincubadas durante uma noite (KONEMAN et al., 2008).

Todos os testes fenotípicos citados foram realizados para os 145 isolados e os resultados foram comparados com a tabela apresentada no Anexo A para identificação das espécies.

#### 4.5 Identificação genotípica de *Staphylococcus coagulase-negativos*

Os isolados foram reativados em ágar BHI e, posteriormente, submetidos à extração do DNA total para as análises genotípicas.

##### 4.5.1 Extração do DNA total bacteriano

Para a extração do DNA bacteriano, foi realizada a metodologia 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. Posteriormente, 1,5mL da cultura foram transferidos para microtubos e centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante descartado. Esta etapa foi repetida três vezes. As células foram ressuspensas em 600 µL de solução de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em vórtex, sendo então incubadas a 65°C por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e adicionados de 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Foi efetuada a homogeneização da mistura, por 2 minutos e adição de igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400µL) e foram adicionados 800µL de etanol 100% gelado, seguido de incubação a -20°C por 2 a 12 hs, para a precipitação do DNA. Depois disso, os microtubos foram centrifugados a 13.000 RPM por 30 min e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com etanol 70% (aproximadamente 500µL) e então seco à temperatura ambiente. Os *pellets* foram então ressuspensos em 30 µL de solução tampão TE (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0).

Para quantificação, o DNA extraído foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) e 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 qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

##### 4.5.2 Amplificação do gene *groEL* (*hsp60*) por PCR

Os ECNs foram identificados genotipicamente, a partir do PCR-RFLP de um fragmento de 550pb do gene *groEL* (BARROS et al., 2007). Para a amplificação desta sequência, foram utilizados os *primers* listados no quadro 1.

**Quadro 1.** *Primers* empregados na amplificação do gene *groEL* de *Staphylococcus* spp.

Primer	Sequência	Referência
H279A	(5'- GAIIIIIGCIGGIGA(TC)GGIACIACIAC-3')	(GOH et al., 1997)
H280A	(5'-(TC)(TG)I(TC) (TG)ITCICC(AG)AAICCGGIGC(TC)TT-3')	(GOH et al, 1997)

Ciclo: 95°C 3 min, (94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min.

As concentrações utilizadas nas reações foram: tampão 10X (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl e 0.1% Triton X-100), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5mg de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP (Fermentas) e 1U de Taq polimerase (Fermentas), em um volume total de reação de 20µl contendo 20 ng do DNA extraído. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e revelados com o corante SYBR *Green* (Invitrogen), possibilitando a visualização em luz ultravioleta e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação, utilizando o marcador de peso molecular de 50 pb (Fermentas).

#### 4.5.3 PCR-RFLP

A amplificação do fragmento de 550pb do gene *groEL* foi bem sucedida em 85,5% (124/145) dos isolados. Para estes 124 isolados, após a amplificação, procedeu-se a clivagem enzimática utilizando-se a endonuclease de restrição AluI (Promega) (BARROS et al., 2007). A digestão foi efetuada com cerca de 500ng do produto de PCR, num volume total de 30 µl (Buffer B 1X; 3 µg de BSA acetilado e 5U de *AluI*), por no mínimo 2hs a 37°C. Posteriormente, para visualização dos fragmentos resultantes, 3 µL de *loading* foram adicionados a 15 µL do mix de clivagem e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, por 80min a 120V, em cuba de eletroforese (Vertical Slab Gel, Bio-Rad), preenchida com solução tampão TBE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio por 10 minutos e descorado em água destilada por outros 10 min. A visualização e captura de imagem foi realizada em transiluminador UV. O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com *ladder* de DNA de 50pb.

Isolados identificados como *S. chromogenes*, *S. hyicus* ou *S. capitis* tiveram seus DNAs submetidos a uma dupla digestão, com as enzimas HindIII (10 U) e PvuII (10 U) (Promega). A digestão foi efetuada segundo o protocolo acima citado, com exceção do *buffer* utilizado. Como estas enzimas necessitam *buffers* diferentes, optou-se pela utilização do *Multi-Core Buffer* (Promega), para que a dupla clivagem fosse efetuada em uma única etapa.

Foram utilizadas as cepas de referência: *S. warneri* ATCC 10209, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. xylosus* ATCC 29971, *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. hominis* ATCC 27844 e *S. simulans* ATCC 27851, obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ. A cepa de referência *S. chromogenes* 610 foi gentilmente cedida pela Professora Marcia Giambiagi-deMarval, do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, UFRJ.

Além disso, todas as sequências parciais de *groEL*, para as diversas espécies de ECNs, depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foram utilizadas em análises *in silico*, com o programa NebCutter v2.0 ([http://tools.neb.com/NEB\\_cutter2/](http://tools.neb.com/NEB_cutter2/)), gerando perfis de restrição computacionais e permitindo a visualização dos perfis esperados, principalmente para as espécies cujas cepas padrão não estavam disponíveis.

#### 4.6 Identificação por MALDI-TOF MS

Dentre os 124 isolados já identificados pelo PCR-RFLP, 40 foram aleatoriamente escolhidos para identificação pelo MALDI-TOF MS. Além deles, 21 isolados que não foram capazes de produzir o fragmento esperado do gene *groEL*, também foram identificados através do método proteômico. Assim, um total de sessenta e um isolados foram avaliados pela técnica de Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS).

Para o preparo das amostras, os isolados foram cultivados 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, 1µL 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 337nm 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, considerou-se como uma identificação aceitável valores iguais ou superiores a dois.

#### 4.7 Caracterização da suscetibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos e macrolídeos

##### 4.7.1 Preparo do inóculo pelo método de suspensão direta das colônias

Os testes de detecção fenotípica de resistência foram executados conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (2013), com padrões para bactérias isoladas de animais. Após 24 horas de incubação a 35°C ± 2°C em ágar nutritivo e não seletivo, as colônias foram suspendidas em caldo Muller-Hinton, até se obter uma turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração de, aproximadamente, 1,5 x 10<sup>8</sup> microrganismos/mL (CLSI VET01-A4, 2013).

Para comparação e controle dos testes, foram utilizadas a cepa padrão *S. aureus* ATCC 43300 e a cepa padrão *S. aureus* ATCC 29213, obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS)-Fiocruz.

##### 4.7.2 Teste de difusão em disco para predição de resistência mediada pelo gene *mecA*

O teste de difusão em disco foi realizado através da semeadura de uma suspensão direta das colônias dos isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos. As suspensões foram calibradas para atingirem valores equivalentes à escala 0,5 de McFarland e aplicadas com *swab* sobre a superfície de placas com ágar Muller-Hinton, seguido da deposição dos discos de cefoxitina (30 µg). Após incubação a 35°C ± 2°C por 24 hs, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados e medidos. Isolados com halos iguais ou inferiores a 24mm foram considerados resistentes à cefoxitina e os isolados foram considerados meticilina-resistentes (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

#### **4.7.3 Difusão em disco para detecção de suscetibilidade à oxacilina, penicilina e amoxicilina + ácido clavulânico**

A semeadura dos isolados nas placas seguiu o procedimento descrito no item 4.7.2, seguido da deposição dos discos de oxacilina (1µg), penicilina G (10UI) e discos com a associação amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg). Após incubação a 35°C ± 2°C por 24 hs, os halos formados ao redor dos discos foram avaliados e os seus diâmetros medidos. Os isolados foram considerados resistentes à oxacilina, penicilina e amoxicilina + clavulanato, quando seus halos apresentaram-se iguais ou inferiores a 17mm, 28mm e 19mm, respectivamente (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

#### **4.7.4 Detecção da resistência ao imipenem e à cefalotina por difusão em disco simples**

Segundo o CLSI, a detecção de resistência aos beta-lactâmicos deve ser realizada rotineiramente com a penicilina, para detecção da produção de beta-lactamases, e com a cefoxitina, para detecção da produção da PBP2a. Eventualmente, isolados suscetíveis a estes antimicrobianos podem ser testados para os demais beta-lactâmicos, como cefalosporinas e carbapenemas, para determinação da sua suscetibilidade específica a cada fármaco, conforme os halos de inibição publicados (CLSI VET01-S2, 2013).

Isolados suscetíveis à cefalotina são necessariamente suscetíveis à todos as cefalosporinas de primeira geração. O imipenem é um beta-lactâmico da classe dos carbapenemas. Deste modo, um número menor de isolados foi avaliado em uma análise preliminar, para triagem da possível resistência a estes antimicrobianos. Entre os isolados suscetíveis à penicilina e à cefoxitina, 15 isolados foram aleatoriamente escolhidos. O teste foi realizado através da semeadura dos isolados, a partir de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland, sobre a superfície de placas de ágar Muller-Hinton, seguido da deposição dos discos de imipenem (10 µg) e cefalotina (30 µg). Após incubação a 35°C ± 2°C por 24hs, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados e medidos. Os isolados foram considerados resistentes quando seus halos foram iguais ou inferiores a 19mm, no caso do imipenem e 14mm, no caso da cefalotina (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

#### **4.7.5 Teste de disco-aproximação para detecção da resistência induzível à clindamicina**

O teste foi realizado através da semeadura de isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos, provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland, sobre a superfície de placas de ágar Muller-Hinton, seguido da deposição do disco de eritromicina (15µg), aplicado a 26 mm de distância em relação ao disco de clindamicina (2µg). Após incubação a 35°C ± 2°C, por 24 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados e medidos (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013). Os isolados que apresentaram uma constrição de diâmetro, no halo de inibição ao redor do disco de clindamicina (zona D), próximo ao disco de eritromicina, indicaram resistência induzida à clindamicina. Os isolados foram considerados resistentes à eritromicina quando seu halo de inibição foi igual ou inferior a 13mm e no caso da clindamicina, quando foi igual ou inferior a 14mm.

## 4.8 Detecção genotípica de resistência aos beta-lactâmicos

### 4.8.1 Genes de resistência à cefoxitina em *Staphylococcus coagulase-negativos*

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes: *mecA* (MURAKAMI et al.1991), *mecI* (LENCASTRE et al., 2002), *mecRI* (ROSATO et al., 2003), *mec* “Universal”, *mec SsciuriInt* (MELO, 2013) e *pbpD* (COUTO et al., 2010), conforme os *primers* e ciclos descritos no quadro 2.

**Quadro 2.** *Primers* empregados para a amplificação dos genes de resistência.

Gene/tam. do fragmento	<i>Primers</i>	Ciclo*	Referência
<i>mecA</i> (533 pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1	MURAKAMI et al.1991
<i>mecI</i> (209 pb)	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	2	LENCASTRE et al., 2002
<i>mecRI</i> (234 pb)	CCA AAC CCG ACA ACT AC CGT GTC AGA TAC ATT TCG	3	ROSATO et al., 2003
<i>pbpD</i> (1120 pb)	ATCCATCAATATTGAACCA TATATCTTCACCAACACC	4	COUTO et al., 2010
<i>mec</i> “Universal” (574 pb)	ACG TTA CAA GAT ATG AAG ACA TTA ATA GCC ATC ATC	5	MELO, 2013
<i>mec SsciuriInt</i> (809pb)	CAG GCA TGC AGA AAA ATC AA TTG AGT CGA ACC AGG TGA TG	5	MELO, 2013

\*1. (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 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 4 min. 3. 95 °C 2 min (95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min; 4. (95 °C 1 min, 55 °C 1 min., 72 °C 1 min) x 25 e 72 °C 4 min; 94 °C 5 min; 5. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min.

### 4.8.2 Amplificação do gene relacionado à produção de beta-lactamases

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação do gene *blaZ*, que codifica a produção de uma penicilinase, em *Staphylococcus* spp. (ROSATO et al., 2003) (Quadro 3).

**Quadro 3.** *Primers* empregados para a amplificação do gene *blaZ*.

Gene/Tamanho do fragmento	<i>Primers</i>	Ciclo*
<i>blaZ</i> (861 pb)	TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG 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.

## 4.9. Análise dos Dados

A prevalência das espécies de ECNs, dos genes de resistência e os perfis de resistência antimicrobiana, obtidos nos diferentes testes, foram expressos em porcentagens analisadas de forma descritiva.

A concordância entre os testes fenotípicos, genotípicos e proteômicos, foi calculada através da concordância percentual simples e também pelo coeficiente Kappa de *Cohen* (programa MedCalc, v. 12.7.8). A análise de concordância Kappa foi interpretada segundo critérios descritos no quadro 4:



**Quadro 4.** 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. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** v. 33, p.159-174, 1977.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de mastite

#### 5.1.1 Identificação fenotípica

Através dos testes fenotípicos e provas bioquímicas, os 145 *Staphylococcus* coagulase-negativos foram classificados segundo as espécies listadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina identificadas através de painel bioquímico.

Espécie	Prevalência
<i>S. chromogenes</i>	63,45 % (92/145)
<i>S. sciuri</i>	6,9 % (10/145)
<i>S. xylosus</i>	5,51 % (8/145)
<i>S. lugdunensis</i>	4,83 % (7/145)
<i>S. simulans</i>	3,45 % (5/145)
<i>S. hyicus</i>	3,45 % (5/145)
<i>S. auricularis</i>	3,45 % (5/145)
<i>S. warneri</i>	2,76 % (4/145)
<i>S. epidermidis</i>	2,1 % (3/145)
<i>S. haemolyticus</i>	1,37 % (2/145)
<i>S. hominis</i>	1,37 % (2/145)
<i>S. cohnii</i>	0,68 % (1/145)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	0,68 % (1/145)
Total	145

Através da identificação fenotípica, foram encontradas 13 espécies de ECNs entre os 145 isolados estudados. A de maior prevalência foi *S. chromogenes*, com 63,4%. *S. sciuri* foi a segunda espécie mais frequente (6,9 %), seguida de *S. xylosus* (5,5%). *S. haemolyticus* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* foram as espécies menos observadas, com apenas 1 isolado de cada.

Em dois estudos recentes em rebanhos brasileiros, em que apenas provas bioquímicas foram utilizadas para a identificação, a distribuição de espécies foi bastante diversa da encontrada no presente trabalho. Em rebanhos do Paraná, 104 isolados de ECNs foram obtidos e as espécies mais prevalentes foram: *S. hyicus* (variante coagulase-negativa) (26,3%), *S. chromogenes* (18,5%), *S. epidermidis* (17,5%), *S. xylosus* (9,6%) e *S. warneri* (9,6%) (SANTOS et al., 2010). Já em fazendas de Minas Gerais, entre os 120 ECNs pesquisados, as principais espécies foram: *S. hyicus* (variante coagulase-negativa) (15,0%), *S. chromogenes* (12,5%), *S. gallinarum* (12,5%), *S. lentus* (12,5%) e *S. epidermidis* (10,8%) (SANTOS et al., 2011).

Estas diferenças com relação à distribuição de espécies podem estar relacionadas a diferenças regionais, diferenças no manejo das fazendas ou ainda a problemas dos métodos fenotípicos, influenciados pela variabilidade na expressão de propriedades bioquímicas, o que leva à incerteza no diagnóstico das espécies de ECNs pelo método convencional (COTON et al, 2010).

O grande número de espécies pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos impede o estabelecimento de protocolos fenotípicos simples, com provas-chave que determinem rapidamente a espécie envolvida. Deste modo, ao contrário do grupo dos

*Staphylococcus* coagulase-positivos, muitos testes bioquímicos são necessários para o diagnóstico adequado dos ECNs.

Além da noção, ainda comum, de que este grupo é homogêneo e não possui relevância clínica, o tempo gasto e a incerteza na identificação convencional, representam os principais entraves ao diagnóstico adequado dessas espécies, em laboratórios de análises clínicas. Para a maioria dos laboratórios de rotina, a realização dos protocolos fenotípicos propostos, que compreendem muitas vezes, mais de 15 provas bioquímicas, torna-se inviável, em função da demora para obtenção dos resultados, da baixa reprodutibilidade e dos custos envolvidos. Assim, apesar do seu papel em diversos processos infecciosos, esses microrganismos são, normalmente, relegados à categoria de contaminantes, na rotina laboratorial (HWANG et al., 2011; SOARES, 2010).

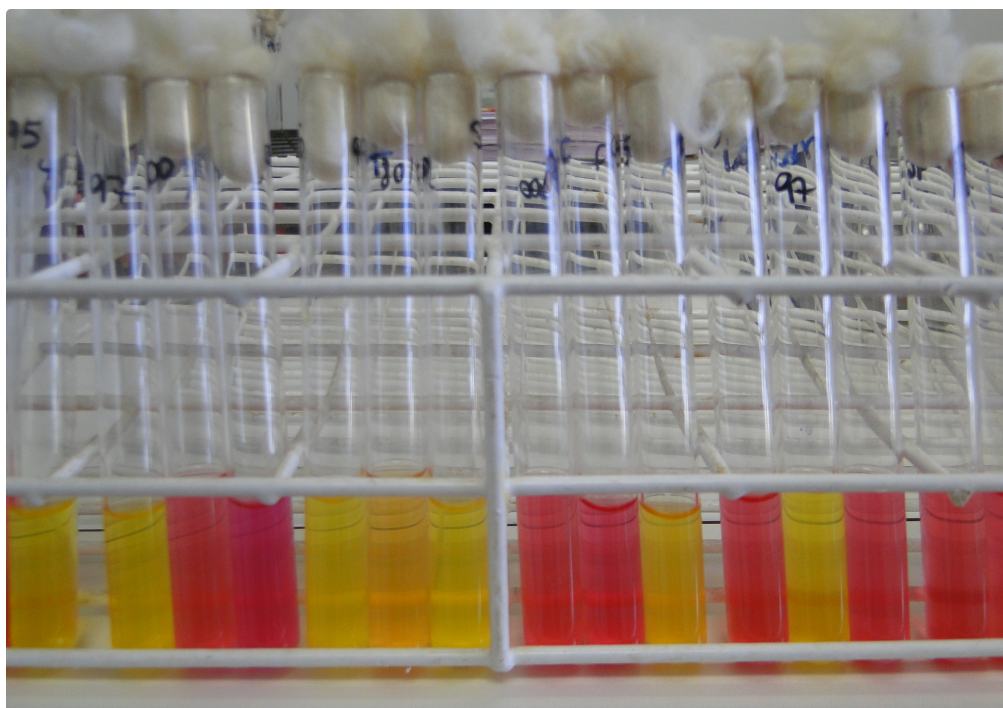
A expressão variável de características fenotípicas, por muitas das espécies, complica ainda mais o emprego dos testes convencionais (BARROS et al, 2007) e o grande número das que apresentam propriedades fenotípicas raras, atípicas ou mal definidas, diminui muito a eficiência e a confiabilidade dos esquemas propostos (FREY et al, 2013; LUCHEIS, 2011, CUNHA et al., 2004). Com relação à fermentação de açúcares (Fig.1), por exemplo, 90% das cepas de *S. hyicus*, *S. epidermidis* e *S. cohnii* são positivas na fermentação da manose, mas apresentam reação lenta. O mesmo ocorre para *S. warneri* e *S. simulans* com relação à maltose e em cepas de *S. sciuri* e *S. lentus*, com relação à xilose, maltose, manose e lactose.

Em um estudo realizado em 10 propriedades da Região Sul-Fluminense, em 2010, as espécies predominantes, identificadas através de testes fenotípicos foram: *S. xylosus* (70%), *S. cohnii* (10%), *S. hominis* (8%), *S. capitis* (7%) e *S. haemolyticus* (5%) (SOARES, 2010). É possível que as variações na distribuição das espécies encontradas, reflita em parte, a imprecisão dos métodos fenotípicos. Por outro lado, diferenças entre as propriedades estudadas, com relação ao manejo do rebanho, podem ter influenciado o resultado.

*S. chromogenes* e *S. xylosus* são espécies encontradas na pele e nas mucosas do gado leiteiro. Entretanto, estudos sobre as rotas e fontes de transmissão, baseados em genotipagem, indicaram que a fonte de infecção mais importante para *S. xylosus* é o ambiente da fazenda, como a forragem da cama dos animais. Parece haver, ainda, uma maior prevalência de infecções por *S. xylosus* em rebanhos que fazem o pré-dipping com clorexidina, quando comparados aos rebanhos que utilizam álcool iodado ou que não realizam o pré-dipping. Além disso, as espécies predominantes de ECNs, isoladas das mãos de ordenhadores foram *S. xylosus* e *S. epidermidis* (TAPONEM et al, 2008). Para *S. chromogenes*, a fonte mais provável de infecção é a pele úbere e dos tetos (PIESSENS, 2011a).

O diagnóstico dos ECNs como grupo, já há algum tempo, não é mais considerado tão aceitável na medicina humana, principalmente quando são infecções em recém-natos, pacientes imunocomprometidos ou submetidos ao uso de sondas, drenos e próteses (HWANG et al., 2011). O isolamento de *S. epidermidis* de infecções oculares e urinárias, principalmente em ambientes hospitalares, implica uma abordagem terapêutica mais agressiva do que a empregada para outras espécies de ECNs (LOZANO et al., 2012; DAVE et al., 2011). Em medicina veterinária, o diagnóstico das espécies envolvidas é importante do ponto de vista epidemiológico, para que se estabeleça finalmente, o impacto clínico e os perfis de resistência e virulência, dos diversos integrantes do grupo.

O advento de kits comerciais, desenvolvidos para a avaliação de amostras humanas, permitiu maior rapidez no processamento diagnóstico, mas mesmo nesses casos, sua precisão é insatisfatória e alguns dos sistemas exigem diversos testes complementares para a identificação das cepas. Em relação às amostras veterinárias, a falta de confiabilidade dos kits tem sido constantemente relatada (FREY et al, 2013; PIESSENS, 2011a; PARK et. al, 2011).



**Fig.1: Teste da fermentação de açúcares para identificação dos ECNs**

Para contornar esses obstáculos, diversas estratégias moleculares foram propostas. O sequenciamento de genes *housekeeping*, especialmente o 16S rRNA, é muito utilizado na identificação de espécies do gênero *Staphylococcus*. Entretanto, ele não possui variabilidade interespecífica suficiente para o grupo dos ECNs, que apresenta espécies intimamente relacionadas. Além disso, o sequenciamento de genes é laborioso, demorado e relativamente caro, para ser empregado rotineiramente (ZADOKS e WATTS, 2009).

Foram elaborados outros métodos de identificação moleculares baseados em genes *housekeeping* com maior variabilidade interespecífica. Entre eles podem ser citados: *groEL* ou *hsp60* (*heat-shock protein 60*) (SANTOS et al, 2007; GOH et al, 1996); *dnaJ* ou *hsp40* (HAUSCHILD e STEPANOVIC; 2008); *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase) (MELLMANN et al., 2006), *sodA* (superóxido dismutase A) e *tuf* (fator de extensão Tu) (HEIKENS et al., 2005).

A técnica de PCR-RFLP foi investigada com vários desses genes, mas o que demonstrou melhor diferenciação entre as espécies, até o momento, foi o gene *groEL* ou *hsp60*. Recentemente, alguns trabalhos validaram a sua utilização na identificação de ECNs isolados de quadros de mastite em ruminantes (ONNI et al, 2012; SANTOS et al., 2008).

### **5.1.2 Identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos através do PCR-RFLP do gene *groEL***

Após a amplificação da sequência parcial de 550pb do gene *groEL*, a endonuclease AluI foi empregada na clivagem dos amplicons. A eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, dos fragmentos resultantes, permitiu a obtenção de padrões de bandas característicos para os isolados. Através da comparação com os padrões das cepas de referência, foi possível a identificação das espécies, conforme o exposto na Tabela 3.

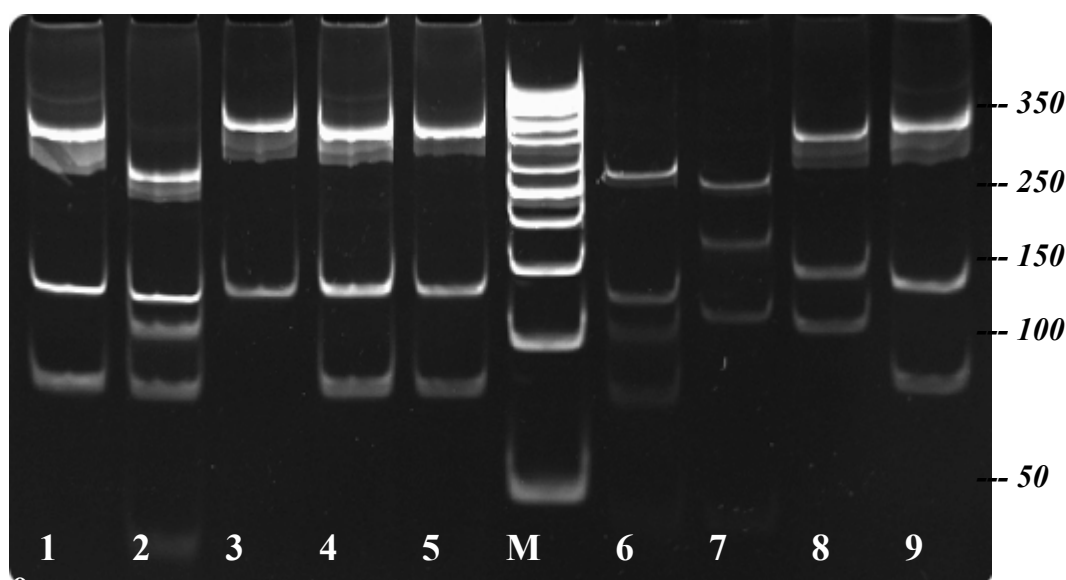
**Tabela 3.** Espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos causadores de mastite em rebanhos leiteiros definidas através do PCR-RFLP do gene *groEL*.

Espécie	Prevalência
<i>S. chromogenes</i>	57,95 % (84/145)
<i>S. xylosus</i>	6,9 % (10/145)
<i>S. sciuri</i>	6,9 % (10/145)
<i>S. warneri</i>	3,45 % (5/145)
<i>S. epidermidis</i>	2,75 % (4/145)
<i>S. hominis</i>	2,07 % (3/145)
<i>S. haemolyticus</i>	1,37 % (2/145)
<i>S. simulans</i>	1,37 % (2/145)
<i>S. cohnii</i>	1,37 % (2/145)
<i>S. lugdunensis</i>	1,37 % (2/145)
Não identificados	14,5% (21/145)
Total	145

A sequência parcial de 550pb do gene *groEL*, foi utilizada com êxito na identificação de 34 espécies do gênero *Staphylococcus*, através da técnica de *Southern Blotting* (GOH et al., 1997). A variabilidade desta sequência entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* também é suficiente para permitir que o sequenciamento faça a distinção adequada entre elas (KWOK et al., 2003). Entretanto, o PCR-FRLP é mais rápido, barato e de execução mais fácil do que esses métodos (SANTOS et al., 2008).

Os oligonucleotídeos H279A e H280A, são denominados *primers* degenerados, já que várias das bases originais foram substituídas pela inosina. A inosina serve como base complementar para qualquer das quatro bases nitrogenadas fundamentais (adenina, guanina, citosina ou timina). Estes *primers* foram desenhados por Goh e colaboradores (1996), para que fosse possível a amplificação de uma sequência do gene *groEL*, de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

A maioria dos isolados (124/145), bem como as cepas de referência utilizadas, amplificaram adequadamente o fragmento de 550pb, o que permitiu a digestão com a endonuclease *AluI* e a visualização de padrões distintos de banda (Fig. 2 e Fig.3).



**Fig.2:** 1, 4 e 5 Isolados identificados como *S. chromogenes*; 2 Isolados de *S. xylosus*; 3 Isolado de *S. haemolyticus*; 6-9 Cepas de referência de *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. chromogenes*, respectivamente; (M) Marcador de 50 pb.

Entretanto, no presente trabalho, 21 dos 145 isolados não produziram *amplicons*, nas condições de PCR aplicadas. Assim, embora a especificidade do *groEL* tenha sido de 100%, sua sensibilidade foi de 85,5%. É possível que as condições de PCR utilizadas fossem inadequadas para os isolados em questão, ou ainda, que variabilidades na região de anelamento dos *primers* tenham impedido o sucesso da amplificação.

Santos e colaboradores (2008) relataram grande semelhança nos padrões de bandas das espécies *S. chromogenes*, *S. hyicus* e *S. capitis*, após a clivagem com a endonuclease AluI e sugeriram uma dupla clivagem do amplicon de 550pb, com as enzimas de restrição, PvuII e HindIII, de modo a esclarecer ambiguidades na identificação.

Seguindo esta recomendação, todos os isolados previamente identificados como alguma destas três espécies, através da clivagem com a AluI, foram submetidos à dupla clivagem. Confirmou-se, desta forma, que pertenciam à espécie *S. chromogenes*.

Os padrões dos isolados puderam ser facilmente correlacionados com os padrões das cepas de referência disponíveis em nosso laboratório ou com os padrões de restrição computacional, obtidos *in silico* com o programa NebCutter V2.0 ([http://tools.neb.com/NEB\\_cutter2/](http://tools.neb.com/NEB_cutter2/)) e com as sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Exemplos dos padrões de algumas espécies encontram-se no Quadro 5. Pode, entretanto, ser esperado um desvio padrão de até 10% nos tamanhos dos fragmentos (SANTOS et al., 2008).

**Quadro 5.** Padrões de RFLP obtidos pela análise do gene *groEL*, das espécies normalmente isoladas de mastite bovina, com o programa NebCutter v2.0.

Espécies	Fragmentos (pb)	
	AluI	PvuII/HindIII
<i>S. capitis</i>	9,13,66,101, 360	13,68,108,360
<i>S. cohnii</i>	2,21,69,93,102,267	
<i>S. chromogenes</i>	75,107,372	180, 374
<i>S. epidermidis</i>	173, 189, 191	
<i>S. haemolyticus</i>	9,107, 438	
<i>S. hyicus</i>	13,95, 117, 324	13,536
<i>S. hominis</i>	7,542	
<i>S. lugdunensis</i>	107,111,336	
<i>S.</i>		
<i>saprophyticus</i>	20,75,87,371	
<i>S. sciuri</i>	14,93,447	
<i>S. simulans</i>	2,46,114,146,246	
<i>S. warneri</i>	102, 143, 366	
<i>S. xylosus</i>	20,75,79,123,258	
<i>S. auricularis</i>	13, 536	

Foi possível, neste trabalho, a detecção de padrões polimórficos intraespecíficos, em isolados de *S. chromogenes*. Dois padrões de banda foram observados para esta espécie: um padrão esperado de três bandas, idêntico ao da cepa de referência e um padrão anômalo com apenas duas bandas (Fig. 3 e Fig. 4).

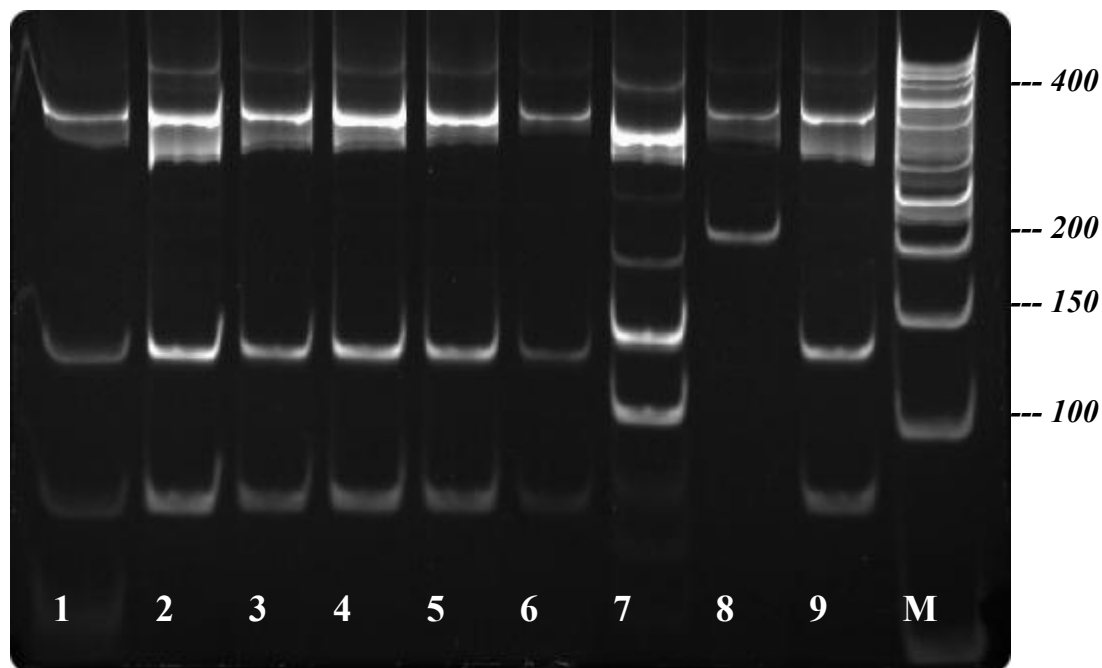


Fig. 3: 1 Cepa de referência de *S. chromogenes*; 2 a 6, 9 Isolados de *S. chromogenes* com padrão típico de 3 bandas; 7 Isolado de *S. warneri*; 8 Isolado de *S. chromogenes* com padrão polimórfico de 2 bandas; (M) Marcador de 50 pb.

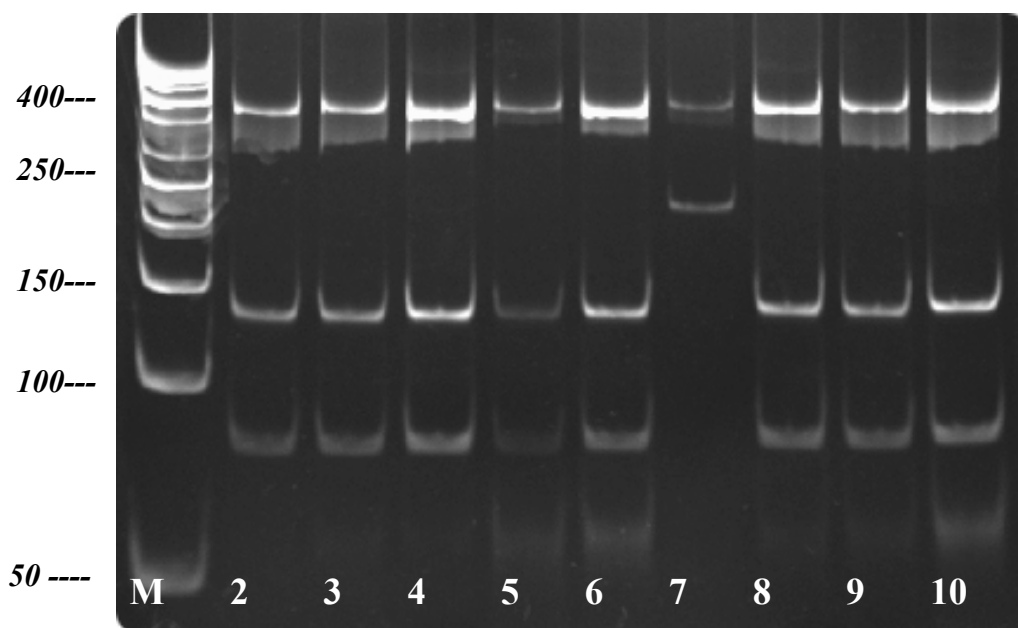


Fig. 4: (M) Marcador de 50 pb; 2 a 9 Isolados de *S. chromogenes*; 7 Isolado de *S. chromogenes* com padrão polimórfico de 2 bandas; 10 Cepa de referência de *S. chromogenes*.

Mais de 80% (68/84) dos isolados de *S. chromogenes* apresentou o padrão típico da espécie, com três bandas, enquanto que cerca de 19% (16/84) deu origem ao padrão de duas bandas. Aparentemente, estes isolados perderam um sítio de restrição da enzima *AluI*, e os fragmentos de 75pb e 107pb tornaram-se um único fragmento de aproximadamente 200pb (Fig.3 e Fig.4).

Deve-se ressaltar que todos os isolados de *S. chromogenes*, não importando o padrão apresentado após a digestão com a enzima *AluI*, quando submetidos à dupla clivagem com as endonucleases *PvuII* e *HindIII*, apresentaram padrões de bandas idênticos (Fig.5), indicando

que não houve alteração nos pontos de atuação destas enzimas. Polimorfismos deste tipo, resultando em diferentes padrões para isolados da mesma espécie, já foram relatados para *S. aureus* e *S. lugdunensis* (BARROS et al., 2007). Como foi verificado para essas espécies, os dois padrões observados neste trabalho, para *S. chromogenes*, foram característicos da espécie e distintos das demais cepas de referência.

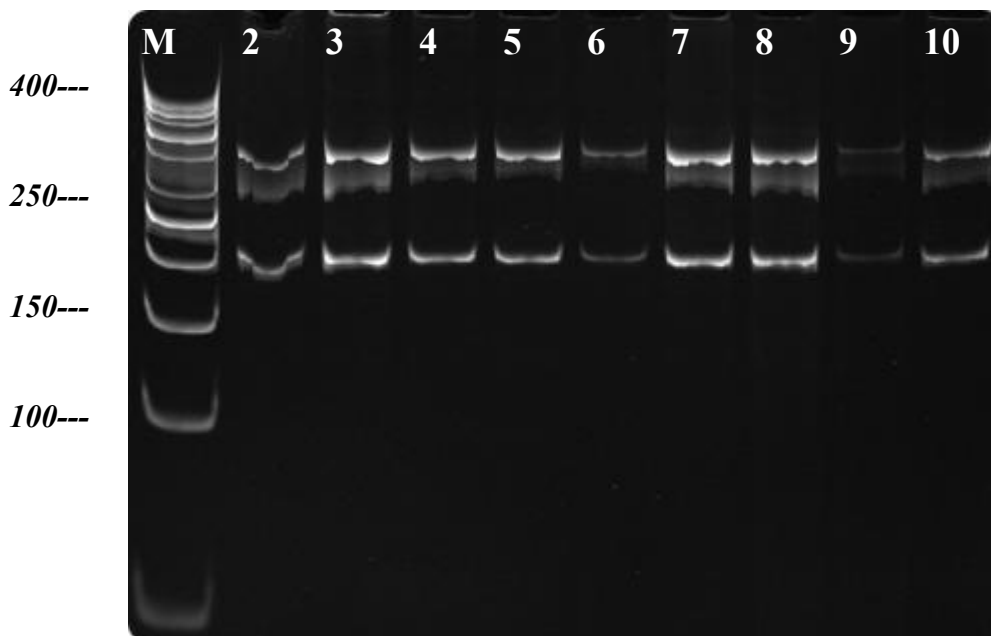


Fig. 5 (M) Marcador de 50pb; 2 a 9 Isolados de *S. chromogenes* após a dupla digestão com PvuII/HindIII; (10) Cepa de referência de *S. chromogenes*

A identificação correta dos patógenos envolvidos é importante para o controle da mastite e para investigações epidemiológicas, bem como na compreensão do impacto das infecções por diferentes espécies de ECNs. Assim, o PCR-RFLP do gene *groEL* provou ser uma ferramenta adequada para a identificação de patógenos estafilocócicos em bovinos, independentemente de suas características fenotípicas (SANTOS et al., 2008). Embora a identificação de 21 isolados não tenha sido possível através desta técnica, os 124 isolados que amplificaram a sequência parcial do gene, puderam ser facilmente correlacionados com os padrões das cepas de referência ou com a análise *in silico* dos perfis de restrição, possibilitando, deste modo, a determinação das espécies a que pertenciam. Foi possível ainda, confirmar a identificação efetuada pelo PCR-RFLP de 40 destes isolados (40/124) através do método proteômico MALDI-TOF MS.

Onni e colaboradores (2010) utilizaram a técnica de PCR-RFLP com o gene 16S rRNA e a digestão do *amplicon* foi realizada com 3 endonucleases (AluI, PstI e RsaI). Não houve uma boa diferenciação entre as espécies *S. epidermidis*, *S. capitis* e *S. caprae*. Por isso, no mesmo trabalho, foi selecionado o gene *gap*, que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, para completar a identificação por PCR-RFLP. Entretanto, os *primers* utilizados não conseguiram amplificar os isolados de *S. warneri* e *S. sciuri*.

### 5.1.3 Identificação dos *Staphylococcus* coagulase-negativos por MALDI-TOF MS

Os 21 isolados não identificados genotipicamente e outros 40 isolados, escolhidos aleatoriamente, foram identificados através da técnica de MALDI-TOF MS. A identificação destes isolados encontra-se na Tabela 4.



**Tabela 4.** Identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos através de MALDI-TOF MS.

<b>Espécie</b>	<b>Prevalência</b>	
<i>S. chromogenes</i>	70,5 %	(43/61)
<i>S. sciuri</i>	6,5 %	(4/61)
<i>S. warneri</i>	5 %	(3/61)
<i>S. xylosus</i>	3,3 %	(2/61)
<i>S. epidermidis</i>	3,3 %	(2/61)
<i>S. hominis</i>	3,3 %	(2/61)
<i>S. hyicus</i>	3,3%	(2/61)
<i>S. simulans</i>	1,6 %	(1/61)
<i>S. lugdunensis</i>	1,6 %	(1/61)
<i>S. auricularis</i>	1,6 %	(1/61)
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>(61)</b>

A identificação proteômica atingiu *scores* acima de 2.0 em 95% (58/61) dos 61 isolados. Valores iguais ou superiores a 2.0 indicam grande segurança na identificação da espécie. Apenas 3 isolados (5%) obtiveram valores entre 1.8 e 2.0, indicando certeza apenas para o gênero *Staphylococcus*.

Os 21 isolados que não puderam ser identificados pelo PCR-RFLP, por não amplificarem adequadamente o gene *groEL*, foram identificados por MALDI-TOF MS como: *S. chromogenes* (17/21), *S. hyicus* (2/21), *S. warneri* (1/21) e *S. auricularis* (1/21).

No presente trabalho, a concordância do PCR-RFLP do gene *groEL* com o MALDI-TOF MS foi de 100%, que confirmou a identificação das espécies já efetuada pelo método genotípico. Sua sensibilidade entretanto, foi superior, e possibilitou a caracterização de todos os 61 isolados avaliados.

Este método já foi empregado, com grande sucesso, na identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos e negativos. Em um estudo recente, o sequenciamento do gene *groEL* foi comparado com a técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de *Staphylococcus* coagulase-positivos, e a concordância entre os métodos foi quase perfeita. A técnica proteômica apresentou precisão e robustez equivalentes ao sequenciamento, com as vantagens da velocidade e facilidade de execução (DECRISTOPHORIS et al., 2011).

Neste trabalho, a técnica genotípica possibilitou uma identificação confiável das espécies. Entretanto, quando comparada à abordagem proteômica, ela seria considerada laboriosa, onerosa e demorada. A identificação por MALDI-TOF MS permite uma identificação precisa em no máximo 24 horas, o tempo necessário para o crescimento dos isolados. É claro que, assim como no caso do PCR-RFLP, para garantir a eficiência da técnica, é preciso que um banco de dados de referência esteja disponível. Neste contexto, para cada tipo de microrganismo, um número suficiente de cepas previamente identificadas filogeneticamente, deve ser utilizada na calibração do aparelho, possibilitando a construção dos espectros característicos para cada espécie bacteriana.

Assim, as qualidades de alta sensibilidade e especificidade, associadas à rapidez, reprodutibilidade e facilidade dos procedimentos, fazem do método proteômico uma ferramenta diagnóstica extremamente efetiva. Obstáculos à biologia molecular, como mutações nas regiões de anelamento de *primers* ou as inúmeras variáveis que podem afetar o sucesso das reações de PCR, não influenciam a técnica de MALDI-TOF MS. Mais de 15 espécies de ECNs estão associadas à mastite bovina e este é um método indiscutivelmente rápido e confiável para identificá-las (FREY et al., 2013; LOONEN et al., 2012).

#### 5.1.4 Prevalência das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos em infecções intramamárias bovinas.

Através dos diagnósticos molecular e proteômico, foi possível a identificação definitiva dos 145 isolados estudados. A distribuição final das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5.** Distribuição final das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos segundo as análises moleculares e proteômicas.

Espécie	Prevalência	Leite	Cadeia
<i>S. chromogenes</i>	69,6 % (101/145)	91	10
<i>S. xylosus</i>	6,9 % (10/145)	8	2
<i>S. sciuri</i>	6,9 % (10/145)	8	2
<i>S. warneri</i>	4,22 % (6/145)	6	-
<i>S. epidermidis</i>	2,75 % (4/145)	2	2
<i>S. hominis</i>	2,1 % (3/145)	3	-
<i>S. haemolyticus</i>	1,37 % (2/145)	2	-
<i>S. simulans</i>	1,37 % (2/145)	1	1
<i>S. cohnii</i>	1,37 % (2/145)	2	-
<i>S. lugdunensis</i>	1,37 % (2/145)	1	1
<i>S. hyicus</i>	1,37 % (2/145)	1	1
<i>S. auricularis</i>	0,68 % (1/145)	1	-
Total	145	126	19

A distribuição das espécies em estudos recentes, que fizeram uso de métodos genotípicos, indica que os ECNs normalmente encontrados em infecções intramamárias bovinas são: *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. xylosus* (WALLER et al., 2011; PERRY et al., 2010; CAPURRO et al., 2009; SAMPIMON et al., 2009; TAPONEN et al., 2008)

No presente estudo, cerca de 70% dos isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos foram identificados, inequivocamente, como *S. chromogenes*. Apesar de variações consideráveis entre as diferentes regiões e rebanhos, esta espécie parece ser a prevalente em amostras de mastite subclínica, no mundo inteiro. Há indícios de um maior grau de patogenicidade em *S. chromogenes*, em relação a outros ECNs, além de maior tendência para causar infecções persistentes, talvez pela maior adaptação ao hospedeiro bovino (FREY et al., 2013; SAINI et al., 2012; PIESSENS, 2011).

*S. xylosus* é uma bactéria comensal da pele e mucosas de mamíferos e aves, sendo usualmente encontrada em amostras de leite e carne crua (SOARES, 2010). É isolada, com grande frequência, de amostras ambientais das fazendas e das mãos dos ordenhadores (PIESSENS, 2011a). *S. sciuri* é considerada saprófita e raramente patogênica, sendo a espécie-tipo do grupo *Staphylococcus sciuri*, aos quais pertencem também as espécies *S. vitulus*, *S. lentus* e, mais recentemente, *S. fleuretti* (EUZÉBY, 2014). Relatada como uma espécie comensal de roedores, marsupiais, cetáceos, também tem sido isolada de animais domésticos e de criação, sadios e enfermos, que incluem cães, gatos, equinos, bovinos, suínos e ovinos (SILVA, 2013).

Em um estudo efetuado com 417 ECNs isolados de mastite bovina na Suíça, 97,8% tiveram a espécie claramente determinada por MALDI-TOF MS. Foram encontradas 19 espécies. Entre os 268 ECNs isolados como os únicos patógenos presentes nas amostras, as espécies predominantes foram: *S. xylosus* (34,3%), *S. chromogenes* (20,9%), *S. haemolyticus*

(8,2%) e *S. sciuri* (7,8%). Neste estudo, dois terços de *S. xylosus* foram resistentes à oxacilina, mas não apresentaram o gene *mecA* (FREY et al., 2013).

### 5.1.5 Análise estatística de concordância entre a identificação fenotípica e a identificação final, pelo método molecular e proteômico.

A identificação fenotípica apresentou uma concordância percentual simples de 78,6% com a identificação considerada definitiva, obtida conjuntamente com os métodos de PCR-RFLP e MALDI-TOF MS. Em geral, a eficiência da caracterização através de provas bioquímicas, segundo os diversos esquemas fenotípicos propostos, varia de 70% a 90% (BANNERMAN et al., 2003).

O cálculo do coeficiente Kappa de *Cohen*, que ajusta a concordância para decisões específicas positivas e negativas, resultou em um valor de concordância geral de 59,7% (quadro 5). O cálculo foi feito considerando-se a identificação pelas provas bioquímicas e a identificação molecular, obtida através dos métodos genotípico ou proteômico (no caso dos 21 isolados que não puderam ser avaliados pelo método genotípico).

Este valor de Kappa é limítrofe entre uma concordância moderada e uma boa concordância. No entanto, os valores de Kappa para cada espécie (categoria) oscilaram bastante. Os valores de Kappa para as espécies *S. sciuri* e *S. xylosus* mostraram excelente concordância (respectivamente 89,3% e 88,2%). Além disso, foi muito boa para *S. chromogenes* (78,5%), moderada para *S. epidermidis* (52,9%) e mostrou-se baixa ou nula, para as demais espécies. Os piores valores foram obtidos para *S. simulans*, *S. lugdunensis* e *S. haemolyticus*. Entretanto, isso pode ser consequência do baixo número de isolados dessas espécies, o que prejudica uma análise estatística adequada.

**Quadro 6.** Coeficientes Kappa de concordância entre a identificação fenotípica e a identificação molecular das principais espécies de ECNs.

	Kappa geral	<i>S. sciuri</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. lugdunensis</i>	
<b>Valor do Kappa</b>	0,597	0.893	0,882	0,785	0.529	0.103	-0.022	-0.022	
<b>P-valor</b>	<b>&lt; 0,001</b>								
<b>IC de 95%</b>	<b>Sup.</b>	0,679	1.0	1.0	0,946	0.685	0.258	0.112	0.112
	<b>Inf.</b>	0,515	0.73	0.72	0,625	0.373	-0.052	-0.156	-0.156

## 5.2. Resistência Antimicrobiana

### 5.2.1 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos

A resistência à cefoxitina foi encontrada em 6,2% dos isolados (9/145), sendo este o critério, segundo o CLSI, para que sejam considerados meticilina-resistentes (CLSI VET01-A4; 2013; CLSI VET01-S2, 2013). Este resultado está de acordo com o que tem sido observado para ECNs, em geral, que têm apresentado em torno de 2 a 10% de resistência à meticilina (FREY et al., 2013; SAMPIMON et al., 2011).

As espécies dos isolados resistentes foram: 4 *S. chromogenes*, 3 *S. epidermidis*, 2 *S. hominis* e 1 *S. hyicus*. Considerando-se o número total de isolados obtidos destas espécies, a

resistência foi relativamente alta para *S. hyicus*, *S. hominis* e *S. epidermidis*, alcançando prevalências de 50%(1/2), 66% (2/3) e 75%(3/4), respectivamente.

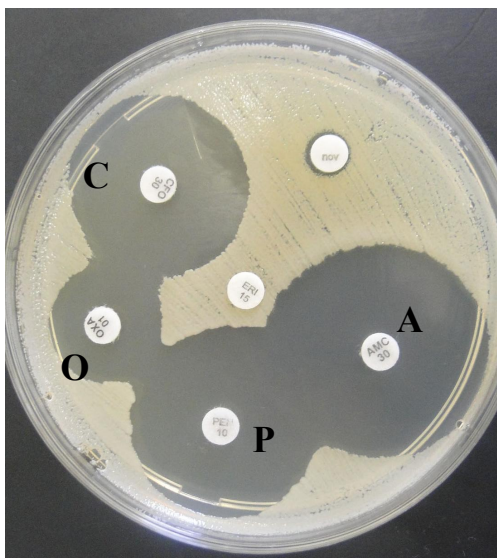
A resistência à cefoxitina indica resistência à toda classe dos beta-lactâmicos, devido à provável presença e expressão do gene *mecA*. Cepas com esse tipo de resistência são denominadas meticilina-resistentes, constituindo um achado preocupante, principalmente quando ocorre em amostras isoladas de animais de produção. Estas cepas frequentemente apresentam resistência a outras classes antimicrobianas. Neste trabalho, foi observado que 55% dos isolados meticilina-resistentes apresentaram suscetibilidade reduzida à eritromicina, um macrolídeo.

A resistência à oxacilina, foi encontrada em 9,6% dos isolados (14/145). De acordo com os novos critérios veterinários do CLSI, divulgados em 2013, o teste de difusão em disco para detecção da resistência à meticilina não deve mais ser realizado com discos de oxacilina, para os ECNs.

Observou-se que, dos 14 isolados resistentes à oxacilina, nove foram suscetíveis à cefoxitina, sugerindo uma resistência devido à hiperprodução de beta-lactamases. A cefoxitina é, atualmente, utilizada como indicativo da presença do gene *mecA*, que codifica a PBP2a e determina resistência inclusive, às penicilinas resistentes às beta-lactamases.

Foi possível a constatação dos problemas da oxacilina como bom preditor para a presença do gene *mecA* (Fig.6), já que alguns isolados resistentes à oxacilina, mas suscetíveis à cefoxitina, foram simultaneamente resistentes à penicilina e suscetíveis à associação beta-lactâmico + inibidor de beta-lactamases (amoxicilina+clavulanato). Essa observação sugere a resistência por hiperprodução de penicilinas.

Deste modo, a utilização da oxacilina como critério fenotípico da expressão do gene *mecA*, está sujeita a falhas, especialmente no caso dos ECNs, como havia sido relatado anteriormente em trabalhos que questionavam a utilização dos discos de oxacilina para esse fim (SAMPIMON et al., 2011; FESSLER et al., 2010).



**Fig. 6** Placa de antibiograma, mostrando resistência à oxacilina (O) e penicilina (P), e suscetibilidade à cefoxitina (C) e amoxicilina + ácido clavulânico (A). O isolado também foi resistente à eritromicina e novobiocina.

Os isolados resistentes à oxacilina pertenciam às seguintes espécies: *S. sciuri* (7/14), *S. epidermidis* (3/14), *S. lugdunensis* (1/14), *S. hominis* (1/14), *S. xylosus* (1/14) e *S. chromogenes* (1/14). Observou-se que 70% dos isolados de *S. sciuri* e 75% dos isolados de *S. epidermidis*, apresentaram resistência à oxacilina.

A resistência à penicilina foi encontrada em 24,8% de todos os isolados (36/145). Diversos estudos apontam a resistência à penicilina como a mais comum nos rebanhos bovinos (FREY et al., 2013; SAINI et al., 2012; PIESSENS, 2011a).

Entre os isolados resistentes estão as seguintes espécies: *S. chromogenes* (22/36), *S. sciuri* (4/36), *S. haemolyticus* (2/36), *S. xylosus* (2/36), *S. epidermidis* (2/36), *S. warneri* (2/36), *S. hyicus* (1/36) e *S. auricularis* (1/36).

Portanto, 50% dos isolados de *S. epidermidis* (2/4) e de *S. hyicus* (1/2), 40% de *S. sciuri* (4/10), 33,3% de *S. warneri* (2/3), 21,8% de *S. chromogenes* (22/101) e 20% de *S. xylosus* (2/10) mostraram-se resistentes à penicilina. Foram também resistentes a este antibiótico, ambos os isolados de *S. haemolyticus* e o único *S. auricularis* encontrado, resultando dessa forma, em uma resistência de 100% para essas espécies.

Em um estudo realizado em 2011, na Alemanha, foi encontrada resistência à penicilina em 70% e 18% dos isolados das espécies *S. epidermidis* e *S. chromogenes*, respectivamente (SAMPIMON et al., 2011).

Assim, a resistência aos beta-lactâmicos foi baixa, mas houve variação entre as espécies. Estes resultados são condizentes também com os encontrados por Frey e colaboradores (2013). Neste trabalho, com 417 isolados de ECNs, a resistência observada para a penicilina foi de 23,3%. Além disso, *S. epidermidis* foi a espécie predominante entre os isolados que apresentaram multirresistência. Outras espécies que apresentaram esta característica foram: *S. sciuri*, *S. chromogenes* e *S. haemolyticus*.

Entre os 15 ECNs aleatoriamente escolhidos entre os isolados suscetíveis a todos os outros antimicrobianos beta-lactâmicos testados (cefoxitina, oxacilina e penicilina) (15/100), não foi observada qualquer resistência à cefalotina, ao imipinem ou à associação amoxicilina +clavulanato. Deste modo, a detecção de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* coagulase-negativos foi adequadamente avaliada apenas com a utilização da cefoxitina e da penicilina, como recomendado pelo CLSI (CLSI VET01-A4; 2013; CLSI VET01-S2, 2013).

### 5.2.2 Resistência à eritromicina e clindamicina

A resistência à eritromicina foi baixa, sendo observada em apenas 3,4% dos isolados (5/145), dos quais 60% (3/5) apresentaram resistência também à clindamicina, uma lincosamida. O “teste D” permitiu concluir que esta resistência, nos três isolados, era constitutiva. Os outros 2 isolados não apresentaram qualquer resistência à clidamicina.

Dos isolados resistentes à eritromicina, 3 eram *S. chromogenes* (dois deles também resistentes à clindamicina), 1 *S. epidermidis* e 1 *S. xylosus* (também resistente à clindamicina).

A resistência à eritromicina foi incomum, o que foi observado também em outros estudos com ECNs (RAJALA-SCHULTZ et al., 2009; SAMPIMON et al., 2009; SAWANT et al., 2009). A resistência aos macrolídeos e lincosamidas em estafilococos bovinos não parece ser um problema na prática veterinária (LÜTHJE et al., 2007). Entretanto, essas classes incluem fármacos importantes no tratamento de infecções humanas, principalmente quando o paciente apresenta hipersensibilidade às penicilinas (GATERMANN et al., 2007).

Devido à disseminação potencial de determinantes de resistência entre patógenos e espécies comensais, o monitoramento de resistência à macrolídeos e lincosamidas em ECNs bovinos, é importante.

### 5.2.3 Distribuição da resistência nas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos

No presente trabalho, foi constatado que 33,1% dos isolados foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados e 11% deles apresentaram-se multirresistentes (Tabela 6).

Entre os isolados resistentes a mais de uma classe de antimicrobianos, as espécies predominantes foram: *S. chromogenes* (6/16), *S. sciuri* (4/16) e *S. epidermidis* (3/16). Devido ao número de isolados dessas espécies, verifica-se que a multirresistência foi encontrada em 75% dos *S. epidermidis* (3/4), 40% de *S. sciuri* (4/10) e 6% de *S. chromogenes* (6/101).

Estes resultados foram bastante semelhantes aos observados em um estudo recente na Alemanha, que relatou 41% de ECNs isolados do leite (n=170) como resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos e 10,6% de cepas multirresistentes, entre as quais as espécies predominantes foram *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. haemolyticus*. Em *S. xylosus*, que também foi a terceira espécie mais prevalente nesse trabalho, a resistência à oxacilina foi significativamente mais frequente do que em outras espécies. Assim, como no presente estudo, não foi observada resistência à cefalotina (SAMPIMON et al., 2011).

**Tabela 6.** Distribuição da resistência fenotípica entre as espécies de ECNs.

Espécie	n total	Cef	Oxa	Pen	Eri	Cli	(R)	
<i>S. chromogenes</i>	101	3	1	22	3	2	25	25%
<i>S. xylosus</i>	10	-	1	2	1	1	4	40%
<i>S. sciuri</i>	10	-	7	4	-	-	7	70%
<i>S. warneri</i>	6	-	-	2	-	-	2	34%
<i>S. epidermidis</i>	4	3	3	2	1	-	3	75%
<i>S. hominis</i>	3	2	1	-	-	-	2	66%
<i>S. haemolyticus</i>	2	-	-	2	-	-	2	100%
<i>S. simulans</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	2	-	1	-	-	-	1	50%
<i>S. hyicus</i>	2	1	-	1	-	-	1	50%
<i>S. auricularis</i>	1	-	-	1	-	-	1	100%
Total	145	9	14	36	5	3	48	33%

Dados de suscetibilidade de microrganismos relevantes para a medicina veterinária são utilizados para monitorar a prevalência de cepas resistentes, fornecendo informações epidemiológicas sobre a disseminação de resistência antimicrobiana. Embora incomuns, há relatos de falhas terapêuticas no tratamento de infecções por ECNs. Ainda assim, diferenças nas respostas entre as espécies, não foram demonstradas (PIESSENS, 2011a; RAJALA-SCHULTZ et al., 2009).

## 5.3. Detecção de genes de resistência

### 5.3.1 Detecção do gene *blaZ*

A síntese da beta-lactamase em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene plasmidial ou cromossomal *blaZ*, e pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico.

Dos isolados fenotipicamente resistentes à penicilina, 44,4%(16/36) apresentaram-se positivos para o gene *blaZ*, sendo a maioria identificada como *S. chromogenes* (13/16). Os outros 3 isolados resistentes nos quais foi detectada a presença do gene foram: *S. sciuri*, *S. epidermidis* e *S. auricularis*.

Além disso, 8,3% (9/108) dos isolados suscetíveis à penicilina, também foram positivos para este gene, sendo 7 *S. chromogenes* e 2 *S. sciuri*. Deste modo, quase 20% dos *S. chromogenes* foram portadores do gene *blaZ* (20/101).

Resultados semelhantes sobre a presença de *blaZ* em *S. chromogenes* (18%) foram observados em rebanhos dos Estados Unidos, mas neste caso, a identificação dos ECNs foi realizada apenas com métodos fenotípicos (SAWANT et al., 2009).

Em outros trabalhos, como o realizado por Frey e colaboradores (2013), a proporção de isolados positivos para *blaZ* variou marcadamente entre as espécies, sendo mais frequente em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (acima de 40%). Neste estudo nenhum isolado de *S. simulans* e poucos de *S. chromogenes* apresentaram o gene.

### 5.3.2 Detecção do gene *mecA*

O gene *mecA* foi detectado em 7,6% dos isolados (11/145), com pelo menos um dos três *primers* utilizados. Dois destes isolados foram resistentes à cefoxitina, possuíam o gene *mecRI* e foram ambos identificados como *S. epidermidis*.

Embora o gene *mecI*, inibidor do *mecA*, não tenha sido detectado em nenhum dos isolados positivos para *mecA*, os 9 isolados restantes foram fenotipicamente sensíveis à cefoxitina, indicando a não expressão do gene e ausência da produção de PBP2a.

A identificação destes isolados mostrou que 60% dos isolados de *S. sciuri* (6/10) apresentavam o gene *mecA*. Três isolados de *S. chromogenes* foram igualmente positivos para a detecção deste gene. Os perfis de suscetibilidade e detecção gênica estão expostos no Quadro 7.

**Quadro 7.** Detecção gênica e perfis de resistência associados aos beta-lactâmicos.

Espécie	Cef	Oxa	Pen	<i>mecA</i> Murakami	<i>mecA</i> Universal	<i>mecA</i> <i>sciuri</i>	<i>mecRI</i>	<i>mecI</i>	<i>pbpD</i>	<i>blaZ</i>
SE	R	R	R	+	+	-	+	-	-	+
SE	R	R	S	+	+	-	+	-	-	-
SS	S	R	R	-	-	+	-	-	-	-
SS	S	R	R	-	-	+	-	-	+	-
SS	S	R	S	-	+	+	-	-	+	-
SS	S	R	S	-	+	+	-	-	-	-
SC	S	S	R	-	+	-	-	-	-	-
SS	S	S	S	-	-	+	-	-	+	-
SC	S	S	S	-	+	-	-	-	-	-
SC	S	S	S	-	+	-	-	-	+	-
SS	S	S	S	-	-	+	-	-	-	+

(SE) *S. epidermidis*; (SS) *S. sciuri*; (SC) *S. chromogenes*.

Dos 9 isolados fenotipicamente resistentes à cefoxitina, apenas 2 deles, ambos da espécie *S. epidermidis*, apresentaram-se positivos para o gene *mecA*. Os outros 7 isolados foram negativos na detecção deste gene, com os 3 *primers* usados para este fim, incluindo *mecA* “Universal” e *mecA* “Sciuri”, iniciadores mais apropriados na detecção do *mecA* em isolados de origem animal (MELO, 2013).

Em diversos trabalhos, isolados negativos para *blaZ* e *mecA* apresentaram resistência à penicilina e à oxacilina. Uma das hipóteses sugeridas é a existência de mutações nas regiões de anelamento dos *primers* desses genes, impedindo a amplificação (FREY et al., 2013;

SAMPIMON et al., 2011; MOON et al., 2007; HAVERI et al., 2005). A presença de genes de resistência não é necessariamente indicativa de fenótipos resistentes, e vice-versa (FREY et al., 2013; SAMPIMON et al., 2011)

Embora a resistência à oxacilina tenha sido relativamente alta em rebanhos da Suíça, (47%, n=196/417), o gene *mecA* só foi detectado em 9,7% (19/196) dos isolados resistentes, sendo encontrado em *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* e *S. fleurettii*. Dos isolados que apresentaram resistência à oxacilina, mas foram negativos para a detecção do *mecA* (90,3%; n=177/196), apenas 11,3% (20/177) foram positivos para o gene *blaZ*. Desta maneira, apenas uma pequena parte dos ECNs estudados naquele trabalho, menos de 20%, teve a sua resistência à oxacilina explicada pela produção de PBP2a ou pela hiperprodução de beta-lactamases (FREY et al., 2013). Ainda nesse trabalho, foram encontrados 3 *S. sciuri* e 5 *S. fleurettii* (uma das espécies do grupo *sciuri*). Todos eles foram positivos para o gene *mecA*, mas apresentaram suscetibilidade à oxacilina.

O CLSI recomenda o teste de difusão em disco com cefoxitina, para a predição de resistência mediada por *mecA* em ECNs, para os quais o critério estabelecido é uma zona de inibição igual ou menor a 24 mm, ao redor do disco de 30µg. Estes isolados devem ser designados como meticilina resistentes. Entretanto, o valor foi adotado da medicina humana e não está relacionado especificamente a ECNs de origem animal. Até hoje, pouco se sabe da correlação entre testes fenotípicos e genotípicos, na avaliação adequada de resistência à meticilina, em ECNs isolados de animais (FESSLER et al, 2010).

Da mesma forma, no presente trabalho, houve discrepâncias na correlação entre a resistência fenotípica à cefoxitina e a detecção do gene *mecA*. Esta correlação mostrou-se adequada, somente, para dois isolados de *S. epidermidis*, a espécie coagulase-negativa de maior relevância na medicina humana. A falta de correlação fenogenotípica para os outros 7 isolados pode ser resultado da inadequação dos critérios para a realização de antibiogramas em amostras bovinas ou problemas na detecção do *mecA* em isolados de origem animal.

Mecanismos de transferência horizontal de genes, no gênero *Staphylococcus*, são efetivamente utilizados *in vivo* (SILVA, 2013). Assim, um dos principais problemas da presença de determinantes de resistência em ECNs está na possibilidade de servirem como doadores a patógenos mais virulentos, em especial *S. aureus*, que compartilha do mesmo habitat, sendo frequentemente isolado de amostras de mastite, da pele bovina e de portadores humanos (FOX et al., 2005).

Animais colonizados podem transmitir estafilococos meticilina-resistentes para humanos que estejam em contato próximo com eles. Já foram relatadas infecções humanas acarretadas por *S. aureus* e *S. pseudintermedius* meticilina-resistentes, associados à animais de produção.

Exemplos de transferência provável do *mecA*, de ECNs para *S. aureus*, incluem a detecção de MRSA (*S. aureus* meticilina-resistente) em um paciente, durante o tratamento hospitalar, pela transferência do SCCmec de *S. epidermidis* e um surto de MRSA, em uma ala neonatal, através da transferência horizontal do SCCmec de *S. haemolyticus* (SAMPIMON et al., 2011; BERGLUND e SODERQUIST, 2008).

A suinocultura ou os seres humanos parecem ser as origens mais prováveis da presença de MRSA no gado. Existe a preocupação, no entanto, de que o uso de antimicrobianos no tratamento da mastite, promova a emergência ou a seleção de MRSA e de outros estafilococos meticilina-resistentes, no gado leiteiro (SAMPIMON et al., 2011; MOON et al., 2007).

No presente estudo, 75% dos *S. epidermidis* isolados (n=3/4) foram resistentes à todos os beta-lactâmicos. Dois deles apresentaram o gene *mecA*. A resistência à meticilina e a multirresistência em *S. epidermidis* obtidos de ruminantes já foram descritas. Seres humanos e o gado leiteiro podem compartilhar cepas de *S. epidermidis* resistentes à meticilina,



indicando um potencial zoonótico para a espécie (FESSLER et al., 2010; SAWANT et al., 2009). É difícil demonstrar a direção da transmissão inter-espécies, mas parece haver maior probabilidade de disseminação dos humanos para o gado, do que o oposto (THORBERG et al., 2006).

### 5.3.3 Detecção de *pbpD* (*mecA1*) em *S. sciuri*

O gene *pbpD* foi encontrado em 19,3% (28/145) de todos os ECNs estudados. Ele foi detectado em 100% dos isolados de *S. warneri* (6/6), em 40% dos *S. sciuri* (4/10), 14% dos *S. chromogenes* (14/101) e em um único isolado das seguintes espécies: *S. xylosum*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* e *S. cohnii*.

A relevância deste gene está na sua homologia com o gene *mecA*. O *pbpD*, também conhecido como *mecA1*, é um gene cromossomal, possivelmente nativo da espécie *S. sciuri* e há indícios de que ele seria o precursor evolutivo do gene *mecA*, exógeno para a espécie *S. aureus*.

A origem do *mecA* é desconhecida, porém, estudos sugerem que sua fonte está relacionada aos ECNs e ao *pbpD*. Foi postulado que *S. sciuri* seria a fonte original do *mecA*. Há um elevado grau de homologia entre os dois genes, atingindo 79,5% de similaridade com o *mecA* encontrado em MRSA. Além disso, a proteína PBPD identificada em *S. sciuri*, apresenta 80% de semelhança, em sua estrutura primária, com a PBP2a (COUTO et al., 2010).

A presença constitutiva do gene *mecA* ou do seu homólogo *mecA1* (*pbpD*) associada à suscetibilidade aos beta-lactâmicos, foi relatada para *S. sciuri* (SILVA, 2013; COUTO et al., 2010). No presente trabalho, 3 isolados de *S. sciuri* apresentaram ambos os genes, 1 isolado apresentou apenas o *pbpD* e 3 isolados da espécie apresentaram apenas o *mecA*. Todos os isolados de *S. sciuri* (n=10) foram suscetíveis à cefoxitina.

*Staphylococcus warneri* não pertence ao grupo *sciuri*, mas neste estudo, todos os isolados desta espécie (n=6) apresentaram o gene *pbpD*.

Entre os isolados de *S. sciuri* (n=37) estudados por Frey e colaboradores (2013), todos apresentaram o gene *pbpD* e mostraram resistência limitrofe à oxacilina.

### 5.3.4 Perfil de suscetibilidade das espécies isoladas

Os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência foram bastante distintos entre as 12 espécies de ECNs isoladas neste trabalho (Tabela 7).

Como pode ser observado, a resistência a pelo menos um dos antimicrobianos avaliados, ocorreu em 100% dos isolados de *S. haemolyticus*, 75% de *S. epidermidis*, 70% de *S. sciuri* e 66% de *S. hominis*. Quando todos os ECNs são avaliados como um grupo, a média de resistência atinge apenas 33%. Assim, observa-se que estas espécies apresentam índices bem superiores, quando analisadas individualmente. O número de isolados de cada uma, entretanto, não foi muito alto, sugerindo baixa prevalência em casos de mastite.

*S. chromogenes*, a espécie mais isolada neste estudo, apresentou resistência fenotípica de 25%, isto é, abaixo da média geral. Entretanto, embora suscetíveis nos antibiogramas realizados, outros 19 isolados (19%), foram positivos para pelo menos um dos genes avaliados (*mecA*, *blaZ* ou *mecA1*) por PCR.

De modo geral, esses resultados estão de acordo com o que tem sido observado para essas espécies. *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. haemolyticus* parecem apresentar altos índices de resistência aos antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento da mastite, em particular, aos beta-lactâmicos (FREY et al., 2013; PIESSENS, 2011a). *S. epidermidis* e *S. hominis* são espécies comensais da pele humana e, juntamente com *S. haemolyticus*,

frequentemente são isoladas de infecções hospitalares (LOZANO et al, 2012). Apesar de ser a espécie mais frequente, em diversos países, *S. chromogenes* tem, proporcionalmente, um nível de resistência menor.

**Tabela 7.** Distribuição da resistência genotípica e fenotípica entre as espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Espécie	n total	(S) e sem genes de resistência <sup>†</sup>		(S) e com genes de resistência		(R)	
<i>S. chromogenes</i>	101	57	57%	19	19%	25	25%
<i>S. xylosus</i>	10	5	50%	1	10%	4	40%
<i>S. sciuri</i>	10	1	10%	2	20%	7	70%
<i>S. warneri</i>	6	-	-	4	66%	2	34%
<i>S. epidermidis</i>	4	1	25%	-	-	3	75%
<i>S. hominis</i>	3	-	-	1	34%	2	66%
<i>S. haemolyticus</i>	2	-	-	-	-	2	100%
<i>S. simulans</i>	2	2		-	-	-	-
<i>S. cohnii</i>	2	1	50%	1	50%	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	2	1	50%	-	-	1	50%
<i>S. hyicus</i>	2	1	50%	-	-	1	50%
<i>S. auricularis</i>	1	-	-	-	-	1	100%
Total	145	69	48%	28	19%	48	33%

<sup>(†)</sup> Detecção positiva para pelo menos um dos genes (*mecA*, *blaZ* ou *mecA1*)

(S) Isolados fenotipicamente sensíveis a todos os antimicrobianos testados;

(R) Isolados fenotipicamente resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados.

*S. sciuri*, apesar de ser raramente relatada como causadora de infecções em animais, não só foi uma das espécies mais isoladas neste trabalho, como além disso, 70% dos isolados mostraram resistência fenotípica a antimicrobianos e outros 20% eram portadores de genes de resistência. Todos os isolados de *S. waneri*, neste estudo, ou foram resistentes fenotipicamente ou eram portadores de genes de resistência.

Deste modo, há evidências de variações fenotípicas e genotípicas no perfil de resistência das diferentes espécies de ECNs. Aparentemente, espécies menos prevalentes nos rebanhos apresentam elevados níveis de resistência aos antimicrobianos, com destaque para *S. epidermidis* (TAPONEN et al., 2012; SIMOJOKI et al, 2011).

No presente estudo, foi possível a constatação de que os métodos fenotípicos bioquímicos de identificação de ECNs não apresentam uma confiabilidade adequada para a investigação do impacto de cada espécie nas infecções intramamárias bovinas. Por outro lado, o PCR-RFLP do gene *groEL* foi preciso na identificação dos isolados que amplificaram a sequência parcial deste gene, possibilitando sua correta caracterização. O MALDI-TOF MS é um método acurado, rápido e eficiente de identificação microbiológica. Entretanto, a utilização desta técnica na rotina diagnóstica ainda é inviabilizada pelo alto custo de instalação do equipamento, na maioria dos laboratórios.

A espécie de ECN mais prevalente neste trabalho foi *S. chromogenes*, resultado que está de acordo com o que tem sido observado em rebanhos leiteiros do mundo todo, e pode estar relacionado à presença frequente deste microrganismo na microbiota normal da pele e do úbere dos animais.

A resistência antimicrobiana encontrada foi relativamente baixa, sendo mais significativa para a penicilina. Entretanto, o caráter multirresistente de alguns isolados, especialmente aqueles identificados como *S. epidermidis*, espécie integrante da microbiota

humana, denotam a importância do constante monitoramento dos perfis de suscetibilidade destes agentes. Por fim, a detecção dos genes de resistência não apresentou uma boa correlação com a resistência fenotípica dos isolados, fato relativamente comum em estudos com amostras de origem animal. As causas mais prováveis para este fenômeno são a adoção de parâmetros humanos na detecção fenotípica de resistência antimicrobiana, além de mutações na região de anelamento dos iniciadores oligonucleotídeos, que impedem a amplificação adequada dos genes em questão.

## 6 CONCLUSÕES

- O método fenotípico de identificação dos ECNs, através de testes bioquímicos, obteve concordância de 78,6% com a identificação molecular, obtida através de método genotípico e proteômico.
- A técnica genotípica de PCR-RFLP, com utilização de uma sequência parcial do gene *groEL*, foi adequada e confiável para a identificação de ECNs isolados da mastite bovina. A concordância com a técnica proteômica de MALDI-TOF MS foi de 100%.
- As espécies de ECNs mais prevalentes entre os 145 isolados estudados foram: *S. chromogenes* (70%), *S. sciuri* (7%) e *S. xylosum* (7%).
- Através do PCR-RFLP do gene *groEL* foi possível a detecção de um polimorfismo intraespecífico na espécie *S. chromogenes*, através da observação de um padrão de restrição atípico para 18 isolados desta espécie (18/101).
- Os índices de resistência antimicrobiana foram baixos para a eritromicina (3,4%), cefoxitina (6,2%) e oxacilina (9,6%). Não houve resistência à cefalotina, imipenem ou à associação amoxicilina+ácido clavulânico.
- A resistência antimicrobiana foi de 24,8% para a penicilina, e 44,4% destes isolados apresentaram-se positivos para o gene *blaZ*.
- A oxacilina não se mostrou um bom preditor da presença do gene *mecA*, justificando as recomendações do CLSI veterinário.
- O gene *mecA* foi detectado em 7,6% dos isolados, com pelo menos um dos três *primers* utilizados para este fim.
- O gene *mecA1* (ou *pbpD*) foi encontrado em 19,3% de todos os isolados, sendo detectado em 100% dos *S. warneri* e 40% dos *S. sciuri*.
- No presente estudo, observou-se que os ECNs isolados de vacas com mastite, são geralmente suscetíveis aos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento desta doença nos rebanhos leiteiros.
- Isolados multirresistentes, principalmente das espécies *S. epidermidis*, *S. sciuri* e *S. chromogenes* foram detectados, o que reforça a necessidade da realização do antibiograma.
- Há diferenças nos perfis fenotípicos e genotípicos das diversas espécies de ECNs isoladas de mastite bovina e há necessidade de maiores investigações dos seus potenciais individuais de resistência e virulência, para o desenvolvimento de melhores estratégias de manejo ou tratamento das infecções.



negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. **Veterinary Microbiology**. v. 147, p. 67-74, 2011.

CAPURRO, A., ARTURSSON, K., WALLER, K. P., BENGTSSON, B., ERICSSON-UNNERSTAD, H., ASPAN A. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**. v. 134, p. 327-333, 2009.

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.

CHAFFER, M., LEITNER, G., WINKLER, M., GLICKMAN, A., KRIFUCKS, O., EZRA, E., SARAN, A. Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 46, p. 707-712, 1999.

CLARKE, S. R., DYKE, K. G. H. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactamase operon are inducible. **Genetics and Molecular Biology: Microbiology**. v. 147, p. 803-810, 2001.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard — Fourth Edition**. CLSI document VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement**. CLSI document VET01-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

COTON, E., DESMONTS, M. H., LEROY, S., COTON, M., JAMET, E., CHRISTIEANS, S., DONNIO, P. Y., LEBERT, I., TALON, R. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**. v.137, p. 221-229. 2010.

COUTO, I., WU, S.W., TOMASZ, A., DE LENCASTRE, H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. **Journal of Bacteriology**. v.185, p.645–653. 2003.

COUTO, I., LENCASTRE, H., SEVERINA, E., KLOOS, W., WEBSTER, J.A., HUBNER, R.J., SANCHES, I.S., TOMASZ, A. Ubiquitous Presence of a *mecA* Homologue in Natural Isolates of *Staphylococcus sciuri*. **Microbial Drug Resistance**. v.2, p.377-391, 2010.

CUNHA, M. L. R. S., SINZATO, Y. K., SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 99, p. 855-860, 2004.

DAVE, S.B., TOMA, H.S., KIM, S.J. Ophthalmic antibiotic use and multidrug-resistant

*Staphylococcus epidermidis*: a controlled, longitudinal study. **Ophthalmology**. v.118, p. 2035-2040, 2011

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.

DE VliegHER, S., FOX, L. K., PIEPERS, S., MCDougALL, S., BARKEMA, H. W. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.1025–1040, 2012.

DEVRIESE, L. A., SCHLEIFER, K. H., ADEGOKE, G. O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. **Journal of Applied Bacteriology**. 58:45-55. 1985.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasileira**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

DUBOUIS, D., LEYSSENE, D., CHACORNAC, J. P., KOSTRZEWA, M., SCHMIT, P. O., TALON, R., BONNET, R., DELMAS, J. Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p. 941–945, 2010.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)**. 1997-2013. Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 18 janeiro 2014.

FESSLER, A. T., BILLERBECK, C., KADLEC, K., SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, p. 1576-1582, 2010.

FINK, A.L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiological Reviews**. v. 79, p. 425–449, 1999.

FOX, L. K., ZADOKS, R. N., GASKINS, C. T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**. v. 107, p. 295-299, 2005.

FREY, Y., RODRIGUEZ, J.P., THOMANN, A., SCHWENDENER, S., PERRETEN, V. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**. v. 96, n. 4, p.2247-2257. 2013.

GATERMANN, S.G., KOSCHINSKI, T., FRIEDRICH, S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology and Infection**. v.13, p. 777–781, 2007.

GHEBREMEDHIN, B., LAYER, F., KONIG, W., KONIG, 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.

GIEBEL, R., WORDEN, C., RUST, S. M., KLEINHEINZ, G. T., ROBBINS, M., SANDRIN, T. R. Microbial Fingerprinting using MALDI-TOF MS: Applications and Challenges. **Advances in Applied Microbiology**. v. 71, p. 149-84, 2010.

GOH, S. H., FACKLAM, R. R., CHANG, M., HILL, J. E., TYRREL, G. J., BURNS, E. C., CHAN, M., HE, C., RAHIM, T., SHAW, C., HEMMINGSEN, S. M. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 3953–3959, 2000.

GOH, S.H., POTTER, S., WOOD, J.O., HEMMINGSEN, S.M., REYNOLDS, R.P., CHOW, A.W. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v.34, p. 818–823, 1996.

GOH, S.H., SANTUCCI, Z., KLOOS, W.E., FALTYN, M., GEORGE, C.G., DRIEDGER, D., HEMMINGSEN, S.M. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, p. 3116–3121, 1997.

HAUSCHILD, T., STEPANOVIC, S. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *dnaJ* gene. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 3875–3879, 2008.

HAVERI, M., SUOMINEN, S., RANTALA, L., HONKANEN-BUZALSKI, T., PYORALA, S., Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. **Veterinary Microbiology**. v.106, p. 97–102, 2005.

HEIKENS, E., FLEER, A., PAAUW, A., FLORIJN, A., FLUIT, A. C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 2286-2290, 2005.

HOGAN, J. S., GONZALES, N., HARMON, R. J., NICKERSON, S. C., OLIVER, S. P., PANKEY, J. W., SODERQUIST, B. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Madison: National Mastitis Council Inc., Edição Revisada. 222 p. Wisconsin, 1999.

HWANG, S. M.; KIM, M. S., PARK, K. U., SONG, J., KIM, E. C. *tuf* Gene Sequence Analysis Has Greater Discriminatory Power than 16S rRNA Sequence Analysis in Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, p. 4142-4149, 2011.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p.302-310, 2008.

JIAN, W., ZHU, L., DONG, X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p.1633–1638, 2001.



KLOOS, W. E., SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.1, p.82-88, 1975.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M, SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, J.R. **Koneman Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6. ed. 1565p. Tradução/revisão técnica: Eiler Fritsch. 2008.

KWOK, A.Y.C., CHOW, A.W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 87–92, 2003.

KWOK, A.Y.C., WILSON, J.T., COULTHART, M., NG, L.K., MUTHARIA, L., CHOW, A.W. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 48, p.903–910, 2002.

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

LEE, J.H., PARK, H.S., JAMG, W.J., KOH, S.E., KIM, J.M., SHIM, S.K., PARK, M.Y., KIM, Y.M., KIM, B.J., KOOK, Y.H., PARK, K.H., LEE, S.H. Differentiation of *rickettsiae* by *groEL* gene analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 2952–2960, 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, p.2155–2161, 2002.

LOONEN, A. J., JANSZ, A. R., BERGLAND, J. N., VALKENBURG, M., WOLFFS, P. F., van den BRULE, A. J. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, p. 1437–1439, 2012.

LOZANO C, RUIZ-GARCÍA M, GÓMEZ-SANZ E, LÓPEZ-GARCÍA P, ROYO-GARCÍA G, ZARAZAGA M, TORRES C. Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.73, p. 380-382, 2012.

LUCHEIS, S. B. A Importância dos Estafilococos Coagulase-negativos na Mastite Bovina Subclínica e Resistência Antimicrobiana. **Pesquisa & Tecnologia**. v. 8, n. 22, p. 1- 6, 2011.

LÜTHJE, P., von KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M., SCHWARZ, S. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, p. 600–606, 2007.

MELLMANN, A., BECKER, K., VON EIFF, C., KECKEVOET, U., SCHUMANN, P., HARMSSEN, D., Sequencing and staphylococci identification. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, p. 333–336, 2006.

MELO, D.A. **Implicações da Utilização de Parâmetros Humanos na Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados de Mastite Bovina e seus Impactos na Predição da**

**Resistência aos Beta-Lactâmicos em Ambientes de Produção Leiteira.** 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

MIKKONEN, T.P., KÄRENLAMPI, R.I., HÄNNINEN, M.L. Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v.54, p. 753–758, 2004.

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.

MØRK, T., JØRGENSEN, H. J., SUNDE, M., KVITILE, B., SVILAND, S., WAAGE, S., TOLLERSRUD, T. Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. **Veterinary Microbiology.** v. 159, p. 171–180, 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.

ONNI, T., VIDILI, A., BANDINO, E., MAROGNA, G., SCHIANCHI, S., TOLA, S. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from caprine milk samples by PCR-RFLP of groEL gene. **Small Ruminant Research.** v. 104, p. 185– 190, 2012.

ONNI, T., SANNA, G., CUBEDDU, G. P., MAROGNA, G., LOLLAI, S., LEORI, G., TOLA, S. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and *gap* genes. **Veterinary Microbiology.** v. 144, p. 347-352, 2010.

PARADIS, M. E., BOUCHARD, E., SCHOLL, D. T., MIGLIOR, F., ROY, J. P. Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. **Journal of Dairy Science.** v. 93, p. 2989-2997, 2010.

PARK, J. Y., FOX, L. K., SEO, K. S., MCGUIRE, M. A., PARK, Y. H., RURANGIRWA, F. R., SISCHO, W. M., BOHACH, G. A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology.** v.147, p. 142-148, 2011.

PERRY, J., MIDDLETON, J.R., DUFOUR, S., SCHOLL, D., CALLOWAY, C., ANDERSON, S., DOHOO, I. Association of coagulase negative staphylococcal species and milk somatic cell count of cows from the Canadian national cohort of dairy farms. In: **NMC Annual Meeting Procedures** Madison: National Mastitis Council Inc.; Albuquerque, New Mexico, p. 204–205, 2010.

PIEPERS, S., OPSOMER, G., BARKEMA, H. W., DE KRUIF, A., DE VliegHER, S. Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of

clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than non-infected heifers. **Journal of Dairy Science.** v.93, p.2014-2024. 2010.

PIEPERS, S., DE MEULEMEESTER, L., DE KRUIF, A., OPSOMER, G., BARKEMA, H. W., DE VliegHER, S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Science.** v. 74, p. 478-483, 2007.

PIESSENS, V. **Epidemiology and characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from dairy farms** 2011. 213p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Bélgica, 2011a.

PIESSENS, V., VAN COILLIE, E., VERBIST, B., SUPRÉ, K., BRAEM, G., VAN NUFFEL, A., DE VUYST, L., HEYNDRICKX, M., DE VliegHER, S. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science.** 94:2933–2944. 2011b.

PITKALA, A., HAVERI, M., PYORALA, S., MYLLYS, V., HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science.** v. 87, p. 2433-2441, 2004.

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.

PYÖRÄLÄ, S., TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci — Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology,** v.134, p. 3–8, 2009.

RAJALA-SCHULTZ, P. J., TORRES, A. H., DEGRAVES, F. J., GEBREYES, W. A., PATCHANEE, P. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. **Veterinary Microbiology,** v.134, p.55–64, 2009.

RAJALA-SCHULTZ, P. J., SMITH, K. L., HOGAN, J. S., LOVE, B. C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology** v. 102, p. 33-42, 2004.

RENNEBERG, J., RIENECK, K., GUTSCHIK, E. Evaluation of Staph-Id-32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology.** 33:1150-1153. 1995.

RIBEIRO, M.E.R., PETRINI L.A., BARBOSA, R.S., ZANELA M.B., GOMES J.F., STUMPF, J.R.W., SCHRAMM, R. Ocorrência de mastite causada por nocardia spp. em rebanhos de unidades de produção leiteira no sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência.** v.12, p.471-473, 2006.

RIESEN, A., PERRETEN, V. *Staphylococcus rostri* sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 60, p. 2042-2047, 2010.

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.

SAINI, V.; MCCLURE, J.T.; LÉGER, D.; KEEFE, G.P.; SCHOLL, D.T.; MORCK, D.W.; BARKEMA, H.W. Antimicrobial Resistance Profiles of Common Mastitis Pathogens on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.8, p.4319 – 4332, 2012.

SALGADO, B.A.B. **Identificação Molecular e Caracterização da Resistência à Mupirocina de Cepas de *Staphylococcus* spp. de Origem Canina**. 2013. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 2012.

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.

SAMPIMON, O., BARKEMA, H. W., BERENDS, I., SOL, J., LAM, T. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 129-136, 2009.

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

SANTOS, L. L.; COSTA G.M.; PEREIRA, U.P.; SILVA, M.A. SILVA, N. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 70, p.1-7, 2011.

SANTOS, L. L.; PEDROSO, T.F.F; GUIRRO E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira. Goiânia**, v. 11, p. 860-866, 2010.

SAWANT, A.A., GILLESPIE, B.E., OLIVER, S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk **Veterinary Microbiology** 134: 73–81. 2009

SCHLEIFER, K. H., BELL, J. A. The Firmicutes: Family VIII. *Staphylococcaceae*. In: Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.H.; Whitman, W.B. (Org.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Volume 3. New York: Springer, 2009. p. 393 – 420.

SCHUKKEN, Y. H., GONZALEZ, R. N., TIKOFSKY, L. L., SCHULTE, H. F., SANTISTEBAN, C. G., WELCOME, F. L., BENNETT, G. J., ZURAKOWSKI, M. J., ZADOKS, R. N. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**. v. 134; p. 9-14, 2009.

SILVA, A.C.C. **Caracterização de *Staphylococcus* do grupo *sciuri* e análise fenogenotípica da resistência à oxacilina em isolados de roedores e equinos do Instituto de Biologia do Exército.** 2013. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

SIMOJOKI, H. **Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci: host response and bacterial factors.** 2011. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculty of Veterinary Medicine, Department of Production Animal Medicine, University of Helsinki, Finland, 2011.

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

SPERGSER, J., WIESER, M., TAUBEL, M., ROSSELLO-MORA, R. A., ROSENGARTEN, R., BUSSE, H. J. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v.53, p. 2007-2011, 2003.

SUPRÉ, K., DE VliegHER, S., CLEENWERCK, I., ENGELBEEN, K., VAN TRAPPEN, S., PIEPERS, S., SAMPIMON, O. C., ZADOKS, R. N., DE VOS, P., HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 60, p.2739-2744, 2010.

SUPRÉ, K., DE VliegHER, S., SAMPIMON, O. C., ZADOKS, R. N., VANEECHOUTTE, M., BAELE, M., DE GRAEF, E., PIEPERS, S., HAESEBROUCK, F. Technical note: Use of transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative *Staphylococcus* species originating from bovine milk and teat apices. **Journal of Dairy Science.** v. 92, p. 3204-3210, 2009.

TAKAHASHI, T., SATOH, I., KIKUCHI, N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology.** v. 49, p. 725-728, 1999.

TAPONEN, S., SUPRÉ, K., PIESSENS, V., VAN COILLIE, E., DE VliegHER, S., KOORT, J. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v.62,p.61-65, 2012.

TAPONEN, S., BJÖRKROTH, J., PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. **Journal of Dairy Science.** v.75, p. 422-429, 2008.

TAPONEN, S., KOORT, J., BJÖRKROTH, J., SALONIEMI, H., PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. **Journal of Dairy Science.** v.90, p.3301-3307. 2007.

TAPONEN, S., SIMOJOKI, H., HAVERI, M., LARSEN, H. D., PYÖRÄLÄ, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. **Veterinary Microbiology**. v. 115, p. 199-207, 2006.

TENG, L.J., HSUEH, P.R., WANG, Y.H., LIN, H.M., LUH, K.T., HO, S.W. Determination of *Enterococcus faecalis* *groESL* full-length sequence and application for species identification. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 3326–3331, 2001.

THORBERG, B. M., DANIELSSON-THAM, M. L., EMANUELSON, U., WALLER, K. P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p. 4962-4970, 2009.

THORBERG, B. M., KUHN, I., AARESTRUP, F. M., BRÄNDSTRÖM, B., JONSSON, P., DANIELSSON-THARN, M. L. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. **Veterinary Microbiology**. v. 115, p. 163-172, 2006.

THORBERG, B. M., BRÄNDSTRÖM, B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 47, p. 683-691, 2000.

TSUBAKISHITA, S., KUWAHARA-ARAI, K., SASAKI, T., HIRAMATSU, K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, p. 4352–4359. 2010.

van BELKUM, A., TASSIOS, P. T., DIJKSHOORN, L., HAEGGMAN, S., COOKSON, B., FRY, N. K., FUSSING, V., GREEN, J., FEIL, E., GERNER-SMIDT, P., BRISSE, S., STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**. v.13, p.1 – 46, 2007.

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, 2010.

VERDAYES, M. A. J., ORTEGA, B. P., RODRÍGUEZ, C. H., CABRERA, G. B., MARTÍNEZ, S. R., DIAZ, M. E. C., DIAZ, J. C. C. Identification and expression of nor efflux family genes in *Staphylococcus epidermidis* that act against gatifloxacin. **Microbial Pathogenesis**. v. 52, p. 318-325, 2012.

VERNOZY-ROZAND, C., MAZUY, C., MEUGNIER, H., BES, M., LASNE, Y., FIEDLER, F., ETIENNE, J., FRENEY, J. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 50, p. 1521-1527, 2000.

VINCZE, T., POSFAI, J., ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**. v. 31, p. 3688-3691, 2003.

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.

WALTHER, C., PERRETEN, V. Letter to the editor: Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in organic milk production. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p.5351. 2007.

WATTS, J. L., RAY, C. H., WASHBURN, P. J. A convenient method for differentiation of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**. v.74, p. 426-428, 1991.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology and Infection**. v.11, p.2 – 21, 2005.

WU, S. W., DE LENCASTRE, H. TOMASZ, A. Expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from the *Staphylococcus sciuri mecA* homologue: Role of mutation(s) in the genetic background and in the coding region of *mecA*. **Microbial Drug Resistance**. v. 11, p. 215–224. 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.

## ANEXO A

Características para identificação de *Staphylococcus* spp.coagulase-negativos e *S. hyicus* variante coagulase-negativa (KONEMAN et al., 2008).

Espécies	Novobiocina	Urease	Maltose	Frutose	Sacarose	Lactose	D-manitol	Manose	Rafinose	Trealose	Celobiose	Xilose	Ribose	Arabinose
<i>S. epidermidis</i>	S	+	+	+	+	v	-	+	-	-	-	-	v	-
<i>S. haemolyticus</i>	S	-	+	v	+	v	v	-	-	+	-	-	v	-
<i>S. hominis</i>	S	+	+	+	+	v	-	-	-	v	-	-	-	-
<i>S. capitis capitis</i>	S	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. capitis ureolyticus</i>	S	+	+	+	+	v	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	S	+	+	+	+	v	v	-	-	+	-	-	v	-
<i>S. auricularis</i>	S	-	+	+	v	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. simulans</i>	S	+	+	+	+	+	+	v	-	v	-	-	v	-
<i>S. lugdunensis</i>	S	v	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. schleiferi schleiferi</i>	S	-	-	+	-	-	-	+	-	v	-	-	-	-
<i>S. saccharolyticus</i>	S	NA	-	NA	-	-	-	+	-	-	-	-	NA	-
<i>S. hyicus</i>	S	v	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>S. chromogenes</i>	S	+	v	+	+	+	v	+	-	+	-	-	+	-
<i>S. caprae</i>	S	+	v	-	-	+	v	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. feli</i>	S	+	-	NA	v	+	+	+	-	+	-	-	v	-
<i>S. carnosus</i>	S	-	-	+	-	v	+	+	-	v	-	-	NA	-
<i>S. caseolyticus</i>	S	-	+	+	v	+	-	-	NA	v	-	-	+	-
<i>S. muscae</i>	S	-	-	NA	+	-	-	-	-	+	-	+	NA	-
<i>S. saprophyticus</i>	R	+	+	+	+	v	v	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. cohnii cohnii</i>	R	-	v	+	-	-	v	v	-	+	-	-	-	-
<i>S. cohnii urealyticum</i>	R	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	R	+	+	+	+	v	+	+	-	+	-	+	-	v
<i>S. sciuri</i>	R	-	v	+	+	v	+	v	-	+	+	v	+	v
<i>S. gallinarum</i>	R	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. lentus</i>	R	-	v	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+	v
<i>S. arlettae</i>	R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>S. kloosii</i>	R	v	v	+	+	v	+	-	-	+	-	v	+	v
<i>S. equorum</i>	R	+	v	+	+	v	+	+	-	+	v	+	+	+
<i>S. vitulus</i>	R	-	-	+	+	-	+	-	-	v	v	v	NA	-
<i>S. pulvereri</i>	R	v	+	+	+	v	v	v	-	v	-	NA	-	-

Novobiocina: (S) sensível  $\geq 12$  mm, (R) resistente  $\leq 11$ mm; (NA): não avaliada.