

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

TESE

**CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES
FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE VIRULÊNCIA E
RESISTÊNCIA À OXACILINA EM *STAPHYLOCOCCUS*
SPP. COAGULASE-NEGATIVOS ISOLADOS A PARTIR
DE MASTITE BOVINA.**

Lidiane de Castro Soares

2010



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

**CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES FENOTÍPICOS E
GENOTÍPICOS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA À
OXACILINA EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. COAGULASE-
NEGATIVOS ISOLADOS A PARTIR DE MASTITE BOVINA.**

LIDIANE DE CASTRO SOARES

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

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

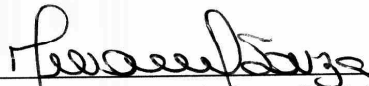
Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

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

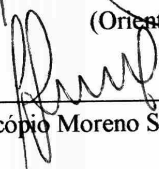
LIDIANE DE CASTRO SOARES

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

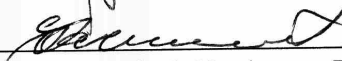
TESE APROVADA EM 22/02/2010.



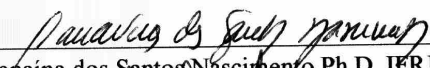
Miliane Moreira Soares de Souza. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)



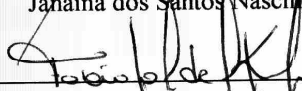
José Procópio Moreno Senna. Ph.D. FIOCRUZ



Elmiro Rosendo do Nascimento. Ph.D. UFF



Janaina dos Santos Nascimento Ph.D. IFRJ



Fabíola Cristina de Oliveira Kegele. Ph.D. IFF

**Este trabalho é dedicado
aos meus pais e esposo por
todo incentivo e
compreensão.**

AGRADECIMENTOS

*“Por tudo o que Tens feito
Por tudo o que Vais fazer
Por Tuas promessas e tudo o que És
Eu quero Te agradecer
Com todo o meu ser...
...Nas pequenas coisas posso ver Tua mão
E nas grandes lutas tens me dado Tua salvação
Por Teus livramentos
Por bênçãos que nem sei contar
Te agradeço, estou aqui pra agradecer
Por Tua misericórdia, amor e perdão
Graça, bondade e restauração
Fidelidade e provisão
Esperança e fé, consolação
Bênçãos que nem sei contar...”*

Agradeço a Deus por ter caminhado ao meu lado em todos os momentos e por ter me dado forças nos momentos de fraqueza. Obrigada Senhor por todo cuidado e amor...por nunca me desamparar e por sempre estender sua mão de misericórdia...OBRIGADA POR SIMPLEMENTE ME AMAR.

Aos meus pais, CLAIR PAULO SOARES e MARIA APARECIDA OLIVEIRA DE CASTRO SOARES que sempre me incentivaram e me deram forças para que esta longa jornada hoje chegasse ao fim.

Ao meu marido, MARCELO SANTOS DE OLIVA. Amor, obrigada por estar ao meu lado e por sempre me dizer palavras de ânimo e conforto quando ficava cansada e desanimada. Obrigada por seu incentivo! Desculpe-me pela minha ausência em alguns momentos. Você é peça fundamental na concretização desta etapa.

À minha avó, JOANNA DE CASTRO, pelo seu amor.

À minha irmã TATIANE DE CASTRO SOARES, tios e primos que sempre estiveram na torcida.

A minha orientadora e amiga, Miliane Moreira Soares de Souza que me deu oportunidade de atuar na área de Bacteriologia e apostou na minha competência. Obrigada pela paciência e por me fazer crescer não apenas profissionalmente, mas em outras áreas também.

As amigas Shana de Mattos de Oliveira Coelho e Ingrid Annes Pereira. Sei que esta amizade não se resume apenas ao convívio laboratorial e que sempre poderei contar com vocês. Obrigada por tudo. Obrigada por estarem ao meu lado quando precisei. O carinho e a amizade de vocês é muito importante à minha vida.

À Cléia Maria Monteiro da Cunha por todo carinho e incentivo.

Aos meus amigos BRUNO ROCHA PRIBUL e BRUNO GOMES DE CASTRO.

À minha grande amiga ALINE VILAS BÔAS VIANNA que mesmo estando longe se fez presente em todos os momentos.

Ao Curso e aos professores do Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias.

A todos os estagiários do Laboratório de Bacteriologia Veterinária. Essa conquista é nossa. A ajuda de vocês foi fundamental para a conclusão desta etapa.

Aos funcionários do Instituto de Veterinária, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto, em especial ao GILBERTO pela sua enorme ajuda e paciência.

Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (Cnpq), pela bolsa agraciada durante o doutorado.

A FUNDAÇÃO CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) pelo apoio em equipamentos utilizados no Laboratório de Biologia Molecular e em projetos que nos foram contemplados.

A todos aqueles que passaram pela minha vida durante esta etapa.

BIOGRAFIA

Lidiane de Castro Soares, filha de Clair Paula Soares e Maria Aparecida Oliveira de Castro Soares, nascida em 22 de março de 1982, no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário, ensino fundamental e ensino médio no Colégio Cenecista Paracambi.

No ano de 2001 ingressou no Curso de Ciências Biológicas – Licenciatura e Bacharelado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –, diplomando-se em maio de 2005.

Foi estagiária de Microbiologia onde pode desenvolver projetos na área de Bacteriologia sob a orientação da professora Dr.^a Miliane Moreira Soares de Souza no período de março de 2002 – abril 2005.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária desta Instituição em 2005, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista de pós-graduação do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2005 a fevereiro de 2007.

Em 2007, foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob orientação da Professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) durante o período de março de 2007 a fevereiro de 2010.

RESUMO

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

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) fazem parte da microbiota normal da pele e apesar de terem sido considerados saprófitas por muito tempo, o seu significado clínico como agente etiológico tem aumentado com o passar dos anos. No entanto, apesar de todo avanço nas técnicas de identificação dos ECN e do conhecimento destes como agentes etiológicos em diversos processos infecciosos, estes microrganismos muitas vezes são negligenciados na rotina laboratorial. A identificação das espécies de ECN, embora de difícil realização para a maioria dos laboratórios clínicos, é necessária para diferenciar o potencial patogênico e o perfil de resistência de cada isolado. O presente estudo foi conduzido para caracterizar fenotípica e genotipicamente o perfil de resistência aos antibióticos, especialmente à oxacilina, e fatores de virulência de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos provenientes de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. Foram identificadas as espécies *Staphylococcus xylosum*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii* e *S. hominis*. O teste de suscetibilidade antimicrobiana revelou elevada resistência à penicilina e ampicilina. Do total de 100 isolados estudados, o gene *mecA* foi detectado em apenas 4 (4%), os quais também foram *mecR1* positivos. O gene *mecI* foi detectado em 47% dos isolados. Em 2 isolados foram detectados todos os genes do sistema *mec* (*mecA-mecI-mecR1*). A produção de beta-lactamases e do gene *blaZ* foi detectada em 16% dos isolados. Em 3 isolados foram detectados todos os genes do sistema *bla* (*blaZ*, *blaI* e *blaRI*). Todos os isolados *bla* positivos foram resistentes a penicilina e ampicilina e positivos no teste do nitrocefim. O gene *femA* não foi detectado em nenhum dos isolados avaliados. Em relação aos fatores de virulência, a técnica da microplaca e o ágar contendo vermelho congo revelaram 46% e 77% de isolados produtores de “slime”, respectivamente. Os genes *icaA* e *icaD* foram detectados em 9% e 10% dos isolados, respectivamente. A hemólise foi detectada em 13% dos isolados, destes 15,4% apresentaram hemólise total e 84,6% a hemólise parcial. Os genes *hla* e *hlb* não foram detectados em nenhum isolado. O sinergismo hemolítico foi positivo em 15 isolados sendo que destes, 14 não apresentaram hemolisinas. Não foi possível estabelecer uma correlação entre os testes fenotípicos e genotípicos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos nos isolados avaliados.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp, mastite, oxacilina, fatores de virulência.

ABSTRACT

SOARES, Lidiane de Castro. **Correlation between Phenotypic and Genotypic Markers of Virulence and Oxacillin Resistance in *Staphylococcus* spp. coagulase-negative Isolates from Bovine Mastitis.** 82 p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Coagulase-negative staphylococci (SCN) take part of the normal microbiota. Although this bacteria has been considered saprophytic, nowadays there is a concern about its pathogenic potential. Nevertheless, the improvement in SCN identification assays, it continues to be neglected in laboratorial routine of infectious diseases because of the wide range of species. In spite of this, the appropriated identification of the species is necessary in order to differentiate the potential pathogenic agents and to determine its antimicrobial susceptibility pattern. The present study was performed to characterize phenotypically and genotypically the antibiotic resistance profile and virulence factors of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from milk samples of cows with subclinical mastitis. *Staphylococcus xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii* and *S. hominis* were the identified species. Antimicrobial susceptibility test yielded a high level of resistance to penicillin and ampicillin. A total of 100 isolates were studied, *mecA* gene was detected in 4% of isolates, also *mecRI* positive. The *mecI* gene was detected in 47% of isolates. All *mec* genes (*mecA-mecI-mecRI*) were detected in only 2 isolates. The production of betalactamases and *blaZ* gene were detected in 16% of the isolates. From this, only 3 isolates showed all *bla* genes (*blaZ*, *blaI* e *blaRI*). All *bla* positive isolates were penicillin and ampicillin resistant and positive to nitrocefin test. The *femA* gene was not detected in any of the isolates. Concerning to the virulence factors, microplate technique and the congo red agar presented production of slime in 46% and 77% of the isolates, respectively. The *icaA* and *icaD* genes were detected in 9% and 10% of isolates, respectively. Hemolysis was detected in 13% of the isolates, 15,4% of total hemolysis and 84,6% partial hemolysis. The *hla* and *hly* genes were not detected in any isolate. The hemolytic synergism was positive in 15 isolates, of these 14 showed no hemolysins. Unable to establish a correlation between phenotypic and genotypic resistance to beta-lactam antibiotics in isolates.

KEY WORD: *Staphylococcus* spp., mastitis, oxacillin, virulence factors

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Resistência à bacitracina.	25
Figura 2	Técnica de ágar screen.	41
Figura 3	Perfil eletroforético dos genes de resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina em gel de agarose 1,5%.	43
Figura 4	Perfil eletroforético dos genes envolvidos na resistência aos beta-lactâmicos pela produção de beta-lactamases em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina em gel de agarose 1%	47
Figura 5	Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina crescidas em ágar Vermelho Congo.	51
Figura 6	Perfis eletroforéticos da amplificação dos genes <i>icaA</i> (A) e <i>icaD</i> (B) em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5%.	52
Figura 7	Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina.	53
Figura 8	Produção de hemolisinas por <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina.	55

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.	26
Quadro 2. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência à oxacilina de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	30
Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência à beta-lactamase de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	31
Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	31

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Quantidade de amostras de leite de vacas com mastite subclínica de diferentes propriedades situadas em cidades do Estado do Rio de Janeiro.	23
Tabela 2. Distribuição das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite subclínica.	33
Tabela 3. Número de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos por diferentes propriedades nas respectivas localidades.	33
Tabela 4. Perfis de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos nos distintos testes fenotípicos.	40
Tabela 5. Prevalência dos genes envolvidos na expressão da resistência à oxacilina nos 100 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	42
Tabela 6. Perfil de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos e detecção dos genes do sistema regulatório <i>mec</i> em isolados de <i>Staphylococcus xylosus mecA</i> positivos.	45
Tabela 7. Perfil dos testes fenotípicos de detecção de resistência à oxacilina e cefoxitina e genes do sistema regulatório <i>mec</i> em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	46
Tabela 8. Perfis de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos, produção de beta-lactamases e a presença de genes reguladores da produção de beta-lactamase dos 100 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos provenientes de mastite bovina.	48
Tabela 9. Perfis de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos, produção de beta-lactamases e a presença de genes reguladores da produção de beta-lactamase e PBP2a dos 100 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos provenientes de mastite bovina.	49
Tabela 10. Presença dos genes de produção de “slime” e característica de coloração em ágar vermelho congo em 100 <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina.	52
Tabela 11. Níveis de produção de “slime” por <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina.	53

Tabela 12. Perfis de produção de “slime” através da técnica em ágar vermelho congo e microplca e presença dos genes *icaA* e *icaD*.

54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág
Gráfico 1. Disposição gráfica do percentual de sensibilidade de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	35
Gráfico 2. Gráfico apresentando o percentual de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos resistentes à oxacilina isolados de mastite bovina aos diferentes antibióticos testados através da técnica de difusão em disco.	39

LISTA DE ABREVIACÕES

BHI = Infuso Cérebro Coração

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CCS = Contagem de Células Somáticas

DNA = ácido desoxiribonucléico

ECN = Estafilococos Coagulase Negativos

h = horas

MLS_B = macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

KOH = hidróxido de potássio

MH = “Müeller-Hinton”

mL = mililitros

mm = milímetros

mM = milimolar

MVF: Agar Manitol Vermelho de Fenol

NaCl = cloreto de sódio

ORSA = *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina

pb = pares de base

PBP = “Penicillin Binding Protein” - Proteína Ligadora de Penicilina

pH = potencial hidrogeniônico

PCR = “Polymerase Chain Reaction” - reação em cadeia de polimerase

rpm = rotação por minuto

SHA = sinergismo hemolítico

U = unidades

UI = unidade internacional

UFC = unidades formadoras de colônia

V = volts

VP = “Voges Proskauer”

µg = micrograma

µL = microlitro

°C = graus Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.	Gênero <i>Staphylococcus</i>	3
2.2.	Resistência Antimicrobiana	5
2.2.1.	Beta-lactâmicos	5
2.2.1.1	Penicilinas	6
2.2.1.2.	Beta-lactâmicos em associação com inibidores de beta-lactamases	8
2.2.1.3.	Cefalosporinas	8
2.2.1.4.	Carbapenemas	9
2.2.2.	Glicopeptídeos	9
2.2.3.	Oxazolidona	10
2.2.4.	Fluoroquinolonas	10
2.2.5.	Macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas	10
2.2.6.	Aminoglicosídeos	11
2.2.7.	Tetraciclina	11
2.3.	Uso Indiscriminado de Antibióticos na Medicina Veterinária	11
2.3.1.	Uso de Antimicrobianos em Bovinos	12
2.3.2	Mastite Bovina	14
2.4.	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	17
2.4.1	Formação de biofilme	17
2.4.2.	Propriedades hemolíticas (genes <i>hla</i> e <i>hlb</i>)	20
2.4.2.1	Alfa hemolisina	20
2.4.2.2	Beta hemolisina	20
2.3.2.3	Delta hemolisina	21
2.3.2.4	Gama hemolisina	21
3.	OBJETIVOS	22
3.1.	Objetivo geral	22

3.2.	Objetivos específicos	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1.	Origem das amostras de leite	23
4.2.	Identificação das espécies	23
4.2.1.	Método de Gram, prova do hidróxido de potássio (KOH) a 3% e prova da catalase	24
4.2.2.	Prova da coagulase	24
4.2.3.	Resistência à bacitracina	24
4.2.4.	Prova de fermentação de açúcares, produção de urease e redução de nitrato	25
4.3.	Testes de suscetibilidade antimicrobiana	25
4.3.1..	Difusão em disco simples	26
4.3.1.1.	Discos de antimicrobianos	26
4.3.2.	Teste de suscetibilidade à oxacilina	27
4.3.2.1.	Difusão em disco modificada	27
4.3.2.2	Ágar “screen”	27
4.3.2.3.	Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima)	27
4.3.2.4.	Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)	27
4.4.	Produção de beta-lactamases	28
4.4.1	Teste de nitrocefim	28
4.4.2	Teste de fita para detecção da produção de beta-lactamases	28
4.5.	Detecção da resistência induzível à clindamicina	28
4.6.	Detecção Fenotípica dos Fatores de Virulência	28
4.6.1.	Produção de “slime” em microplaca	28
4.6.2.	Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo	29
4.6.3.	Produção de hemolisinas e sinergismo hemolítico (SHA)	29
4.7.	Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes de virulência e resistência	29
4.7.1.	Extração do DNA bacteriano	29
4.7.2.	Amplificação dos genes através da técnica de PCR	30

4.7.2.1.	Genes de resistência à oxacilina de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	30
4.7.2.2	Genes de resistência relacionados à produção de beta-lactamases de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	30
4.7.2.2.	Genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	31
4.8.	Análise estatística	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1.	Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	33
5.2.	Perfil de suscetibilidade dos <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos	34
5.2.1.	Resistência à oxacilina	39
5.2.1.1	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos resistentes à oxacilina	39
5.2.1.2	Resistência fenotípica à oxacilina <i>versus</i> detecção do gene <i>mecA</i>	39
5.2.1.3	Resistência à cefoxitina <i>versus mecA</i>	42
5.2.1.4	Detecção dos genes regulatórios do sistema <i>mec</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos.	42
5.2.1.5	Produção de beta-lactamases <i>versus</i> resistência à penicilina, ampicilina e ampicilina+sulbactam <i>versus</i> genes <i>blaZ</i> , <i>blaI</i> e <i>blaR1</i>	46
5.2.1.6	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos e o gene <i>femA</i>	50
5.3	Fatores de virulência	50
5.3.1	Produção de “slime” pela técnica do ágar Vermelho Congo <i>versus</i> genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	50
5.3.2	Produção de “slime” pela técnica da microplaca <i>versus</i> genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	53
5.3.3.	Produção de hemolisinas e genes <i>hla</i> e <i>hly</i>	54
6.	CONCLUSÕES	56
6.1	Considerações finais	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

8.	ANEXOS	81
8.1	Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos, segundo Koneman et al. (2008).	81
8.2	Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2) com intervalo de segurança de 95%.	82

1. INTRODUÇÃO

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) foram por muito tempo considerados microrganismos saprófitas e raramente patogênicos. No entanto, atualmente são reconhecidos como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos em humanos e animais. Em animais, a importância dos estafilococos coagulase-negativos implicados na mastite bovina tem aumentado nos últimos anos, devido ao fato de comporem a microbiota saprófita da pele e da mucosa destes animais e dos ordenhadores, como do ambiente no qual o animal está inserido.

A detecção de uma variedade de ECN presentes em amostras clínicas, e sua implicação como agentes etiológicos, está diretamente relacionada ao considerável progresso na classificação sistemática dos estafilococos através do desenvolvimento de diferentes métodos, manuais e automatizados, para identificação de características fenotípicas e genotípicas do gênero, espécies e subespécies. No entanto, de modo geral, as rotinas de identificação na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica não contemplam a diferenciação deste grupo em espécies.

Nas décadas mais recentes, o aumento no número de infecções por ECN levou à preocupação com um possível aumento de sua resistência aos antimicrobianos, em especial a classe dos beta-lactâmicos. A resistência à oxacilina constitui-se num marcador para avaliação da resistência cruzada com todos os antimicrobianos desta classe.

A resistência estafilocócica à oxacilina está associada à alteração do sítio de ação do antibiótico pela produção de uma proteína ligante de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), de baixa afinidade, que está ausente em isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis à meticilina. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, o qual está contido no determinante *mec*, portado por um elemento genético móvel designado cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec). A parte central desse segmento é composta pelo gene *mecA* e pelos genes *mecR1* e *mecI* que são os genes responsáveis pela regulação do *mecA*. Os genes *mecI* e *mecR1*, tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA*. Além disso, os estafilococos podem tornar-se resistentes através da produção da beta-lactamase, uma enzima extracelular codificada por plasmídeos, decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico após a exposição do microrganismo ao antibiótico. A síntese de beta-lactamase em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene plasmidial *blaZ* e pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaR1*.

O crescimento da resistência aos antimicrobianos é multifatorial, decorrente do aumento da pressão de seleção positiva no meio através do uso indiscriminado destes tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária e, também, por práticas usadas na agricultura. Além das dificuldades no estabelecimento de medidas de controle do uso indiscriminado de antibióticos, as células bacterianas podem trocar seu material genético, ampliando a gama de bactérias resistentes.

Outro importante fator de patogenicidade de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos inclui a produção de uma variedade de fatores de virulência que contribuem na invasão das defesas fagocíticas do hospedeiro, facilitando a sua aderência às células epiteliais e a colonização dos tecidos e persistência extracelular. A adesão de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos ao epitélio da glândula mamária é considerada o primeiro ponto crítico na patogênese. A maioria dos ECN pode expressar uma camada de mucopolissacarídeo, denominada, "slime", que parece ajudar na aderência e colonização do microrganismo ao epitélio e a materiais diversos, como por exemplo, as teteiras da ordenhadeira mecânica. A habilidade em formar estes biofilmes ("slimes") também auxilia no processo de sobrevivência bacteriana em ambientes hostis dentro do hospedeiro e é considerado um fator responsável pelas infecções crônicas e persistentes. O

lócus de adesão intercelular é denominado *ica* e consiste nos genes *icaADBC* responsáveis pela produção desse polissacarídeo. Os genes *icaA* e o *icaD* vêm sendo relatados como os principais responsáveis pela formação do biofilme. Além disto, algumas espécies produzem hemolisinas que são diferentes entre si de acordo com ação lítica sobre os eritrócitos (alfa, beta, gama e delta hemolisinas). As do tipo beta e alfa são as mais importantes na patogênese das infecções intramamárias sendo que a beta toxina é uma esfingomielase Mg^{2+} - dependente que degrada a esfingomielina presente na membrana celular. Elas podem apresentar um efeito hemolítico sinérgico (SHA), no qual as cepas podem ter uma ação sinérgica com outros microrganismos, aumentando o potencial patogênico. Estas hemolisinas são codificadas pelos genes *hla* e *hla* e estão associadas às principais espécies patogênicas de *Staphylococcus*.

Considerando-se a ocorrência de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina na medicina veterinária, e sabendo-se que esta substância é o fármaco de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas graves, a possibilidade de transmissão zoonótica de cepas de *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina indica a necessidade de monitorar os perfis de isolamento e suscetibilidade aos antimicrobianos na prática veterinária. Frente a estes dados, o presente estudo teve como o objetivo avaliar a presença de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos em amostras de leite positivas para o CMT em bovinos de rebanhos leiteiros, assim como seus fatores de virulência e perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* está amplamente distribuído na natureza e faz parte da microbiota normal da mucosa e da pele de mamíferos e aves. Atualmente abrange cerca de 42 espécies e 24 sub-espécies registradas no banco de dados *Taxonomy Browser* (NCBI, 2006), sendo 20 espécies associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, comumente isoladas de amostras biológicas em seres humanos e animais. De acordo com a edição de 1986 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (KLOOS; SCHLEIFER, 1994) são membros da família Micrococcaceae a qual é constituída também pelos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*.

Os estafilococos são classificados como cocos Gram-positivos em forma de cachos de uva ou agrupados aos pares, em tétrades ou em massas irregulares. São imóveis, não esporulados e produtores da enzima catalase. Os membros da família Micrococcaceae são diferenciados da família Streptococcaceae pela prova da catalase. Esta prova detecta a presença de citocromo oxidase nas Micrococcaceae. O teste é realizado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na concentração de 3% em lâmina. A imediata produção de efervescência indica a conversão de H₂O₂ em água e oxigênio gasoso. A prova da catalase deve ser realizada a partir de um meio de crescimento sem sangue, porque os eritrócitos por si só podem produzir uma reação de catalase fraca (KONEMAN et al., 2008).

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

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

O gênero *Staphylococcus* está dividido em dois grupos com base na produção da enzima coagulase: - *Staphylococcus* coagulase-positivos, representados por *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus*, sendo *S. aureus* a espécie mais patogênica do gênero e associada a um amplo espectro de doenças, desde lesões cutâneas superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em animais (SAKAI, 2004); - O grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECNs) pode ser dividido em dois grupos dependendo da sensibilidade ou resistência a novobiocina. Os *Staphylococcus* sensíveis a novobiocina incluem os *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis* e os resistentes a novobiocina são as espécies *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus xylosus* (HEILMANN; PETERS, 2000; von EIFF et al., 2004). Dentre estes microrganismos, *S. epidermidis* tem sido o isolado com mais frequência associado a

infecções de caráter oportunista, seguido de *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* (von EIFF et al., 2004). No período entre 1950 e 1975, os *Staphylococcus* coagulase-negativos eram agrupados junto com a espécie *Staphylococcus albus* e a espécie *Staphylococcus epidermidis* era considerada distinta da espécie *Staphylococcus aureus* por sua inabilidade em coagular o plasma. A capacidade de coagular o plasma é o critério de identificação mais usado e geralmente aceito para a identificação de estafilococos. Acredita-se que o papel da enzima coagulase na patogênese das doenças estafilocócicas pode levar à formação de uma camada de fibrina formando o abscesso, localizando assim a infecção e, provavelmente, protegendo o microrganismo da fagocitose (efeito anti-fagocítico) e da ação de agentes antimicrobianos (ARCHER 2000; KONEMAN et al., 2008).

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos diferem-se das espécies do gênero *Micrococcus* por serem oxidase negativas, resistentes à bacitracina, sensíveis à lisostafina, fermentarem a glicose em anaerobiose e por possuírem um conteúdo bastante reduzido de GC (30 a 39%) (KONEMAN et al., 2008).

Em geral, os *Staphylococcus* spp. apresentam uma relação benigna com o hospedeiro, no entanto adquirem potencial patogênico se tiverem acesso aos tecidos por meio de traumatismos da barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implantação direta por próteses médicas como cateter, válvula cardíaca e marcapasso (HEIKENS, 2005).

Os ECN fazem parte da microbiota normal da pele e de mucosas em humanos, no entanto em condições apropriadas podem causar infecções oportunistas hospitalares e comunitárias. Estes microrganismos podem ser isolados de várias áreas da superfície cutânea, incluindo canais foliculares, aberturas das glândulas sudoríparas e o lúmen dos folículos sebáceos. Além destas áreas, podem ser isolados das mucosas da faringe, conjuntivas, boca, glândulas mamárias e tratos intestinal, geniturinário e respiratório, áreas nas quais estas bactérias são consideradas habitantes secundários (KLOOS, 1999).

O considerável progresso na classificação sistemática dos estafilococos e no desenvolvimento de métodos para a identificação do gênero, espécies e subespécies, tem permitido aos clínicos se inteirarem da variedade de ECN presentes em amostras clínicas e, assim, os considerarem como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos. São, portanto reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas, que se prevaecem de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções (CUNHA et al., 2002). Estes microrganismos apresentam elevado risco potencial de bacteremia em seres humanos e animais imunocomprometidos (HUDOME; FISHER, 2001; CUNHA et al., 2002). No entanto, embora a capacidade dos ECN de causar infecções seja bem documentada, esses microrganismos ainda têm sido em alguns casos negligenciados quanto à sua importância clínica (CUNHA et al., 2002).

Atualmente, os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos igualam-se aos *Staphylococcus aureus* em relatos de doenças infecciosas hospitalares ou como causa primária das infecções de feridas externas. Dados do “National Nosocomial Infection Surveillance System” mostraram que de janeiro de 1990 a maio de 1999 os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foram os patógenos mais comuns descritos isolados de bacteremias e em pacientes hospitalizados (COSTA et al., 2004; von EIFF et al., 2004). Na medicina veterinária, os ECN têm sido associados com frequência a quadros de mastite bovina subclínica (AMARAL et al., 2003).

S. epidermidis é o principal patógeno oportunista entre os ECN, sendo o microrganismo recuperado com maior frequência representado entre 50 a 80% dos isolados clínicos (MICHELIM et al., 2005). Segundo Langoni e colaboradores (2000) esta espécie tem sido associada a quadros de mastite bovina.

S. haemolyticus é a segunda espécie isolada e freqüentemente associado à resistência antimicrobiana (CHANG et al., 2003a) e também tem sido associado a mastite bovina (STAMFORD et al., 2006).

As infecções causadas por *S. lugdunensis* tem o mesmo curso clínico em termos de virulência e destruição tecidual que *S. aureus*. Estão freqüentemente associadas a quadros de endocardite de válvula natural (HAILE et al., 2002; JONES et al., 2002).

S. saprophyticus estão associados a infecções do trato urinário em pacientes jovens e também em infecções hospitalares (ARCHER, 2000).

Além destas espécies, outras como *S. warneri* e *S. xylosus* também estão associadas com infecções oportunistas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, no entanto, são menos freqüentes. Estas espécies produzem uma variedade de produtos extracelulares como DNase, lipase, protease e hemolisinas (CENTER et al., 2003; ASO et al., 2004). Segundo Dordet-Frisoni e colaboradores (2007) *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria ubíqua, comensal da pele e membranas mucosas de mamíferos e aves (NAGASE et al., 2002). Pode ser encontrada em diferentes ambientes (SHALE et al., 2005; NIMRAT et al., 2006) sendo usualmente isolada de amostras de leite e carne crua. Esta espécie é normalmente definida como não patogênica, no entanto, algumas cepas de *S. xylosus* são relatadas como causadoras de infecções oportunistas em animais e humanos (SIQUEIRA et al., 2002; WON et al., 2002; TOMPKINS et al., 2004).

Os ECN podem ser facilmente diferenciados em espécies através de suas características bioquímicas, contudo, na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica, tal identificação não é feita de rotina. A identificação dos ECN é de grande importância para a associação de certas espécies com infecções específicas, tendo em vista que alguns dados sugerem que além de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, que têm sido considerados patogênicos, algumas espécies como o *S. haemolyticus* e *S. lugdunensis*, estão mais associados às infecções do que outras espécies (ARCHER, 1995; CUNHA et al., 2002).

Além de sua importância como patógeno em diversos quadros de infecções os estafilococos apresentam elevada resistência aos antimicrobianos. Isolados de ECN são freqüentemente resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo à oxacilina, limitando, portanto a escolha do antibiótico para o tratamento das infecções (De GIUSTI, 1999).

2.2 Resistência Antimicrobiana

Nas décadas mais recentes, o aumento no número de infecções por ECN levou à preocupação com um possível aumento de sua resistência aos antimicrobianos, em especial a classe dos beta-lactâmicos. A resistência à oxacilina constitui-se num marcador para avaliação da resistência cruzada com todos os antimicrobianos desta classe.

2.2.1 Beta-lactâmicos

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

2.2.1.1 Penicilinas

Estes agentes atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana através da ligação com proteínas específicas associadas à síntese de peptidoglicano (“PBP” – Proteína Ligante de Penicilina), assim denominadas por se ligarem aos antibióticos beta-lactâmicos. As “PBPs” são proteínas de membrana que estão envolvidas na biossíntese da parede celular e que possuem função de transpeptidase (WALKER et al., 1999; WITTE et al., 1999; BLACK, 2002; LOWY, 2003). Estas proteínas catalisam a reação de transpeptidação que faz a ligação cruzada dos peptidoglicanos da parede celular. As cinco principais “PBPs” são PBP 1, 2, 2b, 3 e 4 e são produzidas tanto por isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis como resistentes (CHAMBERS, 1997; IZDEBSKI et al., 2008). Promovem a formação das pontes transversas de pentaglicinas do peptidoglicano, através da ligação da D-alanina de uma cadeia peptídica com a L-lisina da cadeia subsequente. Os antibióticos beta-lactâmicos, ao inibirem as “PBPs”, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que parece desencadear a morte bacteriana devido ao enfraquecimento desta camada (WAXMAN; STROMINGER, 1983; TOMASZ et al., 1991; DOMINGUEZ et al., 1997; De GIUSTI, 1999; PINHO et al., 2004).

Os estafilococos resistentes à penicilina foram detectados por Izdebski a partir de 1950 e atualmente cerca de 90% das cepas são resistentes a este antibiótico (LOWY, 2003).

Embora a maioria dos isolados de estafilococos coagulase-negativos clinicamente significativos apresente resistência a penicilina, esses fármacos oferecem vantagens devido ao baixo custo, sendo, portanto recomendados para o tratamento de isolados sensíveis (GRAHAN, 2000). No entanto, o aumento no número de infecções causadas por ECN nos últimos anos e sua frequente resistência à meticilina e oxacilina, penicilinas resistentes às penicilinas, têm sido fonte de estudo de muitos pesquisadores em todo o mundo (De GIUSTI, 1999).

A resistência estafilocócica aos antibióticos beta-lactâmicos deve-se a dois mecanismos distintos: a produção da enzima beta-lactamase codificada na maioria das vezes por plasmídeos e a produção de PBP2a. O mecanismo de resistência à penicilina associada à produção da beta-lactamase, uma enzima extracelular, é decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico após a exposição do microrganismo ao antibiótico (STAPLETON; TAYLOR, 2002; LOWY, 2003). A síntese de beta-lactamase em *Staphylococcus* spp. é codificada pelo gene *blaZ* que pode ser plasmidial ou cromossomal, podendo a resistência ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaR1* (HACKBARTH; CHAMBERS, 1993; LOWY, 2003). O primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor. Quando não existe penicilina no meio, BlaI se liga ao promotor de *blaZ*, inibindo a transcrição do gene. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima BlaR1, presente na membrana celular, que por sua vez cliva a enzima BlaI, ativando o promotor de *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de beta-lactamase (GREGORY et al., 1997; LEWIS et al., 1999; CLARKE; DYKE, 2001). A ativação de *blaZ* inicia-se com a acilação irreversível concomitante à abertura do anel betalactâmico. A acilação é o primeiro evento na transdução do sinal (GOLEMI-KOTRA et al., 2003; WILKE et al., 2005).

O antibiótico liga-se à parte extracelular (terminal carboxil) de BlaR1 e causa uma mudança conformacional que leva à ativação proteolítica intracelular de BlaR1. O segundo evento na transdução de sinal é uma discreta clivagem proteolítica do domínio intracitoplasmático de BlaR1. A autoclivagem é seguida pela propagação citoplasmática do sinal e posteriormente pela proteólise da proteína repressora. O repressor BlaI após clivado pela protease BlaR1 libera *blaZ* do controle transcricional negativo, permitindo a transcrição de *blaZ* e síntese da beta-lactamase (FUDA et al., 2004). Atualmente são reconhecidos quatro produtos do gene *blaZ* (A, B, C e D) os quais têm sido distinguidos pela sorotipagem e diferenças na

hidrólise do substrato beta-lactâmico. Os tipos A, C e D são geralmente localizados em plasmídeos, enquanto que o tipo B é encontrado no cromossomo (GOLEMI-KOTRA et al., 2003; WILKE et al., 2005).

O segundo mecanismo de resistência está associado à alteração do sítio de ação do antibiótico pela produção de uma proteína ligante de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), de baixa afinidade, que está ausente em isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis a meticilina. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, (KATAYAMA et al., 2001; KURODA et al., 2001) o qual está contido no determinante *mec* ou segmento *mec*, portado por um elemento genético móvel designado cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*). A parte central desse segmento é composta pelo gene *mecA* e pelos genes *mecR1* e *mecI* que são os genes responsáveis pela regulação do *mecA*. Os genes *mecI* e *mecR1*, tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA* (ARCHER et al., 1995). A regulação da expressão de resistência ocorre por ligação de um betalactâmico com a proteína MecR1 (produto de *mecR1* = anti-repressor de *mecA*), que ativada, cliva a MecI (produto do gene repressor *mecI*) e permite a transcrição de *mecA* com produção de PBP2a. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibiótico betalactâmico, como a oxacilina e meticilina (ARCHER et al., 1995; LOWY, 2003).

A produção de PBP2a com baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, substitui as funções das PBPs de alta afinidade, permitindo que a célula se desenvolva em concentrações do antibiótico que em outras condições seriam letais. E é, sem dúvida, o principal mecanismo responsável pela resistência à oxacilina, embora outros mecanismos tenham sido descritos, como alteração de outras "PBPs" e a hiperprodução de beta-lactamases (De GIUSTI, 1999; PETERSSON et al., 1999; PETINAKI et al., 2001; SWENSON et al., 2005).

Alguns genes independentes do locus *mec* parecem contribuir para a expressão da resistência aos beta-lactâmicos. Estes genes são designados de *fem* (*femA*, *femB*, *femC*, *femD* e *femE* - fatores essenciais para a expressão da resistência) e estão presentes no cromossoma de *S. aureus* resistentes a meticilina. Estes genes regulam a síntese e degradação do peptidoglicano e podem ter participação indireta na resistência à meticilina/oxacilina em função de diminuição de transcrição ou modificações estruturais de seus produtos que são as proteínas denominadas Fem (VANNUFFEL et al., 1995). No entanto, a presença destes genes em ECN ainda é controversa.

A literatura também relata que os genes *blaI* e *blaR1* podem modular a expressão transcricional do gene *mecA* e regular a produção da PBP2a devido ao alto grau de homologia encontrada nos sistemas *mec* e *bla* (ROSATO et al., 2003; WILKE et al., 2005). O gene *blaR1* é relatado como um forte indutor do gene *mecA* e *blaI* um fraco repressor. Além disso, há relatos que a regulação em isolados clínicos seja feita pelos genes *bla* devido a deleções ou mutações no gene *mecI* que exerce atividade repressora (GROOM, 2001). A expressão gênica do *mecA* pode apresentar dois fenótipos de resistência, resultando em fenótipo induzível ou constitutivo. A PBP2a é induzida pela presença dos antibióticos beta-lactâmicos, no entanto, esta proteína também pode ser produzida constitutivamente. O fenótipo induzível está associado à presença de plasmídeos contendo o operon *bla*, responsável pela produção de beta-lactamases, regulado pelos genes *blaI* e *blaZ*. O fenótipo constitutivo ocorre quando há eliminação ou perda do plasmídeo ou da beta-lactamase plasmidial convertendo a cepa de um fenótipo induzível para constitutivo. (KATAYAMA et al., 2005).

Nos últimos anos, o CLSI padronizou o uso do disco de cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração, para detecção do gene *mecA* por ser um forte indutor de seu sistema regulatório. Estudos têm relatado maior eficácia em testes de difusão em disco com cefoxitina correlacionado com a presença do gene *mecA*, em relação ao uso da oxacilina (SWENSON et al., 2005). A

cefotaxima induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica (DANCER, 2001).

2.2.1.2 Beta-lactâmicos em associação com inibidores de beta-lactamases

O ácido clavulânico, sulbactam e o tazobactam são inibidores das beta-lactamases. Possuem fraca atividade antibacteriana, no entanto protegem o antimicrobiano contra a degradação por enzimas beta-lactamases e estende de forma efetiva seu espectro de ação antimicrobiana. São comumente utilizados em cepas resistentes à ampicilina e amoxicilina. (MOTTI, 1990; SCHECHTER; MARANGONI, 1998).

2.2.1.3 Cefalosporinas

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

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

A estrutura das cefalosporinas é baseada no ácido aminocefalosporânico, enquanto que as penicilinas são baseadas no ácido penicilínico. Esta diferença estrutural, embora pequena, é suficiente para impedir a ação das penicilinas sobre as cefalosporinas. As diferenças em cadeias laterais “R” deram origem às diferentes cefalosporinas e causam variações no espectro de ação destes antibióticos (KOROIKOVAS; BURCKHALTER, 1998).

A resistência bacteriana às cefalosporinas pode ocorrer devido a diferenças estruturais intrínsecas nas “PBPs” que são alvos deste fármaco. Outros mecanismos de resistência estão associados como desenvolvimento de “PBPs” com menor afinidade pelo antimicrobiano e destruição enzimática do anel beta-lactâmico por enzimas beta-lactamases (ADAMS, 2003).

Segundo Spinosa e colaboradores (1999) as cefalosporinas são classificadas por gerações de acordo com a atividade antimicrobiana. As cefalosporinas de primeira geração são caracterizadas por espectro de ação antimicrobiano mais estreito, atuando predominantemente sobre bactérias Gram-positivas; são ativas também contra estafilococos produtores de penicilinase. As cefalosporinas de segunda geração são menos ativas que as de primeira geração contra bactérias Gram-positivas, porém tem maior atividade contra bactérias entéricas Gram-negativas. As cefalosporinas de terceira geração possuem o maior espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, e possuem certa estabilidade na presença de beta-lactamases, porém são menos ativas em bactérias Gram-positivas. Já as cefalosporinas de 4ª geração reúnem as vantagens da 1ª e 3ª geração e apresentam boa atividade tanto sobre microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos (ADAMS, 2003).

Na mastite bovina, as cefalosporinas de primeira geração são as mais indicadas, especialmente em mastite subclínica e no tratamento de vacas secas. Sua melhor atuação sobre bactérias Gram-positivas, causadoras da maior parte das mastites subclínicas, garante-lhes um lugar de destaque nestes casos. Associado a isto, as cefalosporinas são atóxicas e não irritantes,

persistindo em concentrações úteis por no mínimo 48 horas após sua aplicação e são resistentes às beta-lactamases produzidas por estafilococos (LÓPEZ, 1996).

2.2.1.4 Carbapenemas

Os carbapenemas, meropenem e imipenem, representam os beta-lactâmicos com grande espectro e potência antimicrobiana, e são os únicos carbapenêmicos disponíveis para uso clínico no Brasil, nos Estados Unidos e na Europa (EDWARDS; BETTS, 2000; PAI, 2001). O meropenem apresenta atividade *in vitro* superior contra Gram-negativos enquanto que o imipenem é discretamente mais ativo contra Gram-positivos (EDWARDS; BETTS, 2000). Estes antimicrobianos inibem a síntese da parede celular bacteriana, após fixação às proteínas de ligação à penicilina. É estável a hidrólise pela maioria das classes de beta-lactamases, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e beta-lactamases. Os estafilococos resistentes à meticilina e os enterococos são resistentes aos carbapenemas, *in vitro*, devido à insensibilidade para o alvo das PBP's (SADER; GALES, 2001).

Até o presente momento não foi relatado resistência cruzada com outras classes de antimicrobianos. No entanto, os microrganismos podem apresentar resistência a mais do que uma classe de agentes antibacterianos, quando o mecanismo é impermeabilidade a alguns compostos e/ou uma bomba de efluxo (PAI, 2001; SADER; GALES, 2001).

2.2.2 Glicopeptídeos

A vancomicina é um glicopeptídeo produzido por *Streptococcus orientalis* que foi introduzida em 1958 para o tratamento clínico de infecções estafilocócicas resistentes a oxacilina. A partir do final de 1986, na Europa, e 1988, nos Estados Unidos, a resistência clinicamente significativa à vancomicina passou a ser identificada entre os enterococos. Neste momento, infecções causadas por estafilococos com sensibilidade diminuída à vancomicina também foram descritas.

Seu mecanismo de ação é a inibição da síntese da parede celular bacteriana através da ligação com elevada afinidade ao terminal D-alanil-D-alanina das unidades precursoras da parede celular. Ocorre bloqueio da transglicosilação, mecanismo diferente do empregado pelos fármacos beta-lactâmicos, não sendo degradadas, portanto por beta-lactamases. Além disso, alteram a permeabilidade da membrana celular bacteriana, além de serem capazes de inibir a síntese de RNA (SCHECHTER; MARANGONI, 1998; HEIJENOORT, 2001).

O primeiro relato de *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina ocorreu em 1997, no Japão (HIRAMATSU et al., 1997). Posteriormente, novos casos de resistência foram relatados em outros países, inclusive no Brasil após pacientes serem submetidos à terapia com este antimicrobiano (SMITH et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001; LOWY et al., 2003).

Até o momento foram identificadas duas formas de resistência a vancomicina em *Staphylococcus aureus*: VISA (*S. aureus* com sensibilidade intermediária a vancomicina) e VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina). Os isolados VISA apresentam CIM entre 8 a 16 µg/mL e podem apresentar heteroresistência. Acredita-se que este fenótipo esteja associado à exposição ao agente antimicrobiano (WALSH; HOWE, 2002; COSGROVE et al., 2005) e com mudanças na biossíntese do peptidoglicano, onde nestes isolados a parede celular é mais espessa (LOWY, 2003), o que leva a exposição de maior quantidade de resíduos D-alanil-D-alanina para se ligar ao antimicrobiano. Desta forma a ligação da vancomicina na cadeia de peptidoglicano atua impedindo que moléculas do antimicrobiano alcancem seu alvo na superfície da membrana plasmática para exercer sua inibição da síntese do peptidoglicano (CUI et al., 2006).

Já o segundo fenótipo de resistência foi atualmente reportado com CIM superior a 32 µg/mL (TENOVER et al., 2004) decorrente da substituição do peptídeo final do terminal D-alanil-D-alanina para ao terminal D-alanil-D-lactato (LOWY, 2003). Desta forma, este novo peptídeo apresenta reduzida afinidade pela vancomicina. O mecanismo aparente deste fenótipo de resistência está relacionado à transferência do gene *vanA* de *Enterococcus faecalis* para *S. aureus* (LOWY, 2003).

2.2.3 Oxazolidona

A linezolida é um fármaco promissor no tratamento de infecções por microrganismos Gram-positivos multirresistentes. É uma oxazolidona que inibe a síntese protéica ao bloquear a formação do complexo de iniciação, se ligando na porção 50S do ribossoma bacteriano (PERRY et al., 2001). Segundo Jones e colaboradores (2006) a linezolida apresenta sensibilidade em quase 100% dos estafilococos, 99,4% dos estreptococos e em 96% dos enterococos.

2.2.4 Fluoroquinolonas

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

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

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

2.2.5 Macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas

Apesar dos macrolídeos (azitromicina, eritromicina e claritromicina), lincosaminas (clindamicina e lincomicina) e estreptograminas (dalfopristina e pristinamicina) (MLS) pertencerem a diferentes classes de antimicrobianos, estes atuam na inibição da síntese protéica bacteriana devido à ligação a subunidade 50S dos ribossomas (MARIMOM et al., 2005). Estes antimicrobianos são utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas. No entanto, nos últimos anos, tem se avaliado que algumas cepas de *Stapylococcus* spp. resistentes aos macrolídeos apresentam resistência cruzada com as lincosamidas e estreptograminas (JORGENSEN et al., 2004).

A resistência a estes antimicrobianos geralmente envolve a expressão de proteínas específicas, que atuam como metilases do RNAr, subunidade 50S, ou parte do mecanismo, próton dependente de efluxo do antibiótico através de membranas. Nessas circunstâncias, as metilases protegem os ribossomos bacterianos opondo-se diretamente, a ação dos fármacos, enquanto que as bombas de efluxo afastam o antimicrobiano da fisiologia microbiana (MARIMOM et al., 2005), sendo denominada fenótipo MLS_B. A expressão deste fenótipo pode ser induzível ou constitutiva e está associada à presença do gene *erm*. Na resistência induzível os isolados são resistentes somente aos macrolídeos (FLUIT et al., 2001; LECLERQ; COURVALIN, 2003) e a

resistência a clindamicina é expressa após a indução com a eritromicina. Neste fenótipo observa-se um achatamento do halo de inibição da clindamicina após a adição dos discos de antibióticos colocados a uma distância de 18 mm. Já na resistência constitutiva os isolados são resistentes aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas. De acordo com o CLSI (2008), isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência indutiva a clindamicina devem ser reportados como resistentes.

2.2.6 Aminoglicosídeos

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

2.2.7 Tetraciclina

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

Os determinantes de resistência mais comuns dos estafilococos são as proteínas codificadas pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* que protegem os sítios de ligação das tetraciclinas aos ribossomos bacterianos protegendo-os contra a ação antimicrobiana deste fármaco. De forma menos freqüente, porém usual, um outro mecanismo de resistência às tetraciclinas pode ser determinado pela expressão de proteínas codificadas pelos genes *tet(K)* ou *tet(L)* que promovem o bombeamento do antibiótico para fora das células (CHOPRA; ROBERTS, 2001; CULEBRAS et al., 2002; ZENG et al., 2006). O gene de resistência *tet(M)* é freqüentemente disseminado por transposons conjugativos da família Tn916, que também estão envolvidos na disseminação de genes do tipo *erm* que promovem a resistência à eritromicina (SALYERS et al., 1995; CHOPRA; ROBERTS, 2001; CULEBRAS et al., 2002; ZENG et al., 2006).

2.3. Uso Indiscriminado de Antibióticos na Medicina Veterinária

A descoberta dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária, sendo importantes na redução da morbidade e mortalidade por doenças infecciosas. No entanto, logo após a introdução dos antibióticos no tratamento médico em 1940, estes foram introduzidos em criações animais como profiláticos e promotores de crescimento para melhorar a eficiência ou utilização alimentar, sincronizar ou controlar o ciclo reprodutivo, o desempenho no cruzamento e aumentar a aceitação do consumidor ao produto final (OLIVEIRA, 2008). Os promotores de crescimento são substâncias, naturais ou sintéticas, ou organismos vivos, adicionados às rações animais com os objetivos de aumentar o ganho de peso, melhorar a eficiência alimentar e reprodutiva, bem como diminuir a mortalidade (NICODEMO, 2001). Uma das possíveis razões para explicar os efeitos de agentes antimicrobianos sobre o desempenho animal seria tanto a redução dos efeitos de infecções subclínicas sobre o crescimento. Outra possibilidade é que os promotores de crescimento tenham

um impacto positivo sobre o sistema imune do hospedeiro, afetando hormônios, citocinas e outros fatores relacionados à resposta imune (McEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002).

O uso de antibióticos na produção animal é considerado pela Organização Mundial de Saúde um risco crescente para a saúde humana, devido ao aumento da resistência antimicrobiana. No entanto, a restrição do uso de antimicrobianos pode resultar em um aumento do aparecimento de doenças infecciosas nos rebanhos, e como consequência, produtos de qualidade sanitária inferior.

Na avicultura, a administração de certos antibióticos em pequenas concentrações e de forma contínua à ração, proporciona aumento significativo do ganho de peso e melhor conversão alimentar (MOTA et al., 2005). Segundo Young (1994), a adoção desse manejo é relatada como subterapêutico, pois a quantidade utilizada destes fármacos é inferior àquela usada no tratamento de doenças específicas, favorecendo o aparecimento de resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas e diminuindo assim a capacidade destes fármacos no tratamento de infecções em humanos e animais (MANIE, 1997).

Moreno e colaboradores (1990), avaliaram a presença de resíduos de antibióticos e bactérias resistentes à antimicrobianos isolados de carne bovina e de frango e verificaram que a tetraciclina estava presente em 23% das amostras. A estreptomicina, cloranfenicol e gentamicina estavam presentes em 93%, 67% e 97%, das amostras de frango, respectivamente.

A resistência bacteriana pode ser transferida por diversos mecanismos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (AARESTRUP et al., 2001). O uso de agentes antimicrobianos tanto em animais quanto no homem, determina o aumento da resistência antimicrobiana nos microrganismos de sua microbiota normal e bactérias patogênicas. Segundo Hardy (2002) existem três rotas possíveis para o desenvolvimento da resistência a antibióticos: as bactérias se tornam resistentes no animal e são transferidas a humanos que consomem alimentos crus ou parcialmente cozidos ou por meio de manipulação e preparo inadequado dos alimentos; a resistência microbiana a antibióticos se desenvolve na população bacteriana animal, que pode não ser patogênica ao homem, mas pode transferir essa resistência a bactérias humanas e resíduos de antibióticos no alimento dão oportunidade para bactérias humanas desenvolverem resistência.

2.3.1 Uso de Antimicrobianos em Bovinos

Em ruminantes, de modo geral, os antibióticos que não atuam predominantemente sobre o rúmen, reduzem as infecções bacterianas intestinais preservando a integridade da mucosa intestinal e permitindo melhor absorção dos nutrientes, o que resulta em melhor desempenho. O conceito de promotor de crescimento, neste caso, se confunde com o uso profilático de antibióticos, prevenindo a instalação de patógenos (GEWEHR; LAWISCH, 2003).

No gado leiteiro, os antibióticos são usados para o tratamento principalmente de doenças de bezerros e de vacas adultas. As principais doenças de bezerros que necessitam da prescrição de antibióticos são diarreias e pneumonias enquanto que na vaca adulta, os principais usos de antibacterianos são para tratamento de mastite, metrite, problemas de casco e lavagens uterinas após o parto. Segundo Brito e colaboradores (2000) e Costa e colaboradores (2000) a mastite é considerada a doença mais dispendiosa nas fazendas de gado leiteiro devido a enormes gastos com veterinários, descarte precoce dos animais, descarte de leite, redução na quantidade e qualidade do leite e significa um risco potencial à saúde pública, já que promove a eliminação de patógenos causadores de zoonoses e toxinas produzidas pelos microrganismos no leite.

O uso profilático de antimicrobianos no final do período de lactação é um componente importante dos programas de controle de mastite. O antibiótico é aplicado por via intramamária

no final do período de lactação, geralmente dois meses antes do parto, quando se interrompe o processo de ordenha e se inicia a involução do úbere. Apesar do amplo uso da antibioticoterapia na secagem de vaca leiteira, não há evidências de resistência associada ao tratamento (ERSKINE et al., 2002).

Uma das maiores preocupações da comunidade científica é que estes produtos utilizados podem ser eliminados pelo leite e causar reações alérgicas, afetar culturas lácteas ou criar um ambiente favorável para a seleção de bactérias resistentes (NUNES; D'ANGELINO, 2007). Além disso, o uso de medicamentos veterinários no rebanho pode afetar o comércio internacional de alimentos, pela presença de resíduos de medicamentos ou de seus metabólitos em produtos cárneos e leite (AERTS et al., 1995).

Países desenvolvidos como os membros da União Européia, Estados Unidos e Canadá foram os países que mais notificaram na Organização Mundial do Comércio, as restrições na compra de determinados produtos que continham um nível acima dos limites máximos de resíduos impostos pelos mesmos. A maioria dessas imposições muitas vezes torna o comércio inviável ou até restringe o acesso dos países em desenvolvimento ao comércio internacional (RIMAL et al., 2001).

A persistência de resíduos antimicrobianos no leite varia com o produto e depende de uma série de variáveis, tais como a dose, a via de administração, a solubilidade e o estado de saúde do animal (COSTA, 2002). A presença de antibióticos no leite pode ser devido à adição fraudulenta, inibindo o crescimento bacteriano indesejável ou da aplicação de diferentes substâncias antimicrobianas no rebanho leiteiro, para prevenção ou tratamento de doenças, como infecções da glândula mamária e doenças do trato reprodutivo (FONSECA; SANTOS, 2000). Este fato tem sido um dos maiores desafios para os órgãos responsáveis pela saúde pública e para a indústria de alimentos. Antibióticos como a penicilina, aureomicina, terramicina, cloranfenicol e estreptomicinas têm sua presença no leite principalmente em consequência dos tratamentos por infusão intramamária para mastite e ainda, por adições com propósitos fraudulentos (OLIVEIRA, 2008), sendo o grupo dos beta-lactâmicos os antibióticos mais administrados. Considerando-se a alta porcentagem de pessoas alérgicas à penicilina e seu amplo uso em fazendas produtoras de leite, os resíduos de penicilina constituem a maior preocupação com relação aos riscos oferecidos aos humanos (FONSECA; SANTOS, 2000).

Antibióticos como cloranfenicol, à sulfometazina e os nitrofuranos possuem ação carcinogênica (COSTA, 2002). Em humanos, o cloranfenicol pode causar efeitos colaterais adversos como anemia aplásica e hipoplásica, granulocitopenias devido à sua ação sobre células da medula óssea após o uso de níveis terapêuticos ou profiláticos (BOOTH, 1992).

A tetraciclina, fármaco utilizada na água do rebanho, ao se ligar ao cálcio pode resultar na inibição do desenvolvimento dos dentes e do crescimento ósseo, podendo os dentes tornar-se descolorados (BOOTH, 1992).

Diante deste quadro é necessário que o abuso de medicamentos veterinários, seus resíduos e derivados metabólicos do leite, sejam monitorados frequentemente, especialmente nos países onde seu emprego não é controlado rigorosamente. Deste modo, a produção de leite de alta qualidade e seus derivados, sem resíduos de antibióticos, é de grande importância para os produtores, levando em conta diversos prejuízos e penalidades por causa da rejeição deste alimento contaminado que ultrapassa os valores acima dos níveis de tolerância (CORASSIN; OLIVEIRA, 2000; NASCIMENTO et al., 2001).

Brito (2003) relata o isolamento de *Staphylococcus aureus* e espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo resistentes aos antibióticos a partir de diferentes tipos de queijos preparados

de leite cru e de produtos preparados de carne crua. As resistências mais frequentes e caracterizadas foram para cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina e lincomicina.

2.3.2 Mastite Bovina

A mastite bovina é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, ou até mesmo pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Caracteriza-se por uma inflamação da glândula mamária cuja etiologia pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo esta última a mais frequente, podendo ser classificada como clínica ou subclínica. A mastite clínica apresenta sinais evidentes de inflamação como edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor e pus, além de alteração das características do leite como a presença de grumos (FONSECA; SANTOS, 2000). Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas de inflamação do úbere e sim alterações na composição do leite, tais como aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura. A redução na produção do leite é decorrente as alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade do alvéolo secretor durante a infecção (FONSECA; SANTOS, 2000; COSTA et al., 2000).

Os patógenos causadores da mastite têm sido classificados em 2 grupos diferentes: contagiosos e ambientais. Os chamados contagiosos necessitam do animal para a sobrevivência na glândula mamária e são transmitidos de uma vaca infectada ou quarto mamário infectado para uma vaca sadia ou quarto sadio, principalmente durante a ordenha. Os patógenos ambientais são oportunistas, estão presentes no ambiente em que o animal vive e a infecção pode ocorrer no período de lactação ou no período seco (COSTA, 1998; SOMMERHÄUSER et al., 2003).

As infecções intramamárias são frequentes em bovinos leiteiros, sendo responsáveis por grandes prejuízos à pecuária leiteira, pois além da redução na produção de leite há gastos com medicamentos e assistência veterinária, descarte de leite contaminado após tratamento e descarte precoce de animais doentes (COSTA et al., 1998; FONSECA; SANTOS, 2000; REIS, 2005). Além disso, as mastites adquirem importância para a saúde pública pela possibilidade de veiculação de microrganismos, toxinas e resíduos de antimicrobianos no leite (COSTA, 1998).

Dentre os patógenos contagiosos, *Staphylococcus* spp. é o mais frequente nos casos de mastite bovina (TOLLERSRUD et al., 2000; ZSCHÖCK et al., 2000). Possui vários fatores de virulência que contribuem para sua persistência no tecido mamário e, embora medidas preventivas que visam o controle das mastites sejam amplamente praticadas, as mastites causadas por este patógeno ainda são bastante comuns (SANTOS et al., 2006). Este microrganismo além de ser responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira apresenta resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento desta doença, sendo desta forma, de grande importância o isolamento e identificação desse agente em laboratórios e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana para um melhor controle através de terapêutica adequada. Os estafilococos são disseminados principalmente pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha, geralmente contaminados a partir do leite de animais infectados. Este microrganismo é dificilmente eliminado dos rebanhos, no entanto pode ser controlado através da adoção de procedimentos higiênicos como a desinfecção das tetas após a ordenha e o tratamento da vaca ao final da lactação com antibióticos adequados para o período seco (ZECCONI; HAHN, 2000).

No Brasil, estima-se que em função do alto índice de mastite nos rebanhos (20 a 38%), possa ocorrer perda de produção entre 12 e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 20 bilhões de litros (FONSECA; SANTOS, 2000).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado a partir da observação dos sinais de inflamação e das alterações macroscópicas no leite, através do uso da caneca de fundo preto ou telada (BRITO et al., 2002a).

A mastite subclínica pode ser diagnosticada pelo "California Mastitis Test" (CMT), o qual detecta a "Contagem de Células Somáticas" (CCS) no leite, uma vez que tanto o úbere quanto o leite estarão aparentemente normais. As células somáticas são, normalmente, células de defesa (leucócitos) do organismo que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater agentes agressores (SHALLIBAUM, 2001). O CMT é usado mundialmente para o diagnóstico da mastite subclínica, tendo a vantagem de poder ser empregado no próprio rebanho, no momento em que os animais são ordenhados além de ser um método de fácil aplicação e baixo custo (BRITO et al., 2002a). Consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, adicionando-se um detergente aniônico neutro, o qual atua rompendo a membrana dos leucócitos e liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade. De acordo com a intensidade da reação classifica-se em: negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (FONSECA; SANTOS, 2000; BRITO et al., 2002a).

Após a realização do CMT o diagnóstico da mastite subclínica deve ser confirmada através do crescimento microbiano. O exame bacteriológico do leite, obtido em um único quarto ou em todos os quartos mamários é o procedimento para estabelecer se o úbere está infectado. Trata-se de um teste decisivo, porém caro e demorado, sendo pouco aplicável a rebanhos com grande número de animais. No entanto, é considerado o método padrão para a determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite bovina, sendo que o seu principal objetivo é oferecer um resultado seguro ao veterinário, para que ele possa identificar os problemas do rebanho. Deste modo, medidas específicas de controle direcionadas para o ambiente ou para uma melhor higienização da ordenha, podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado (BRITO et al., 2002b) uma vez que a mastite subclínica apresenta grande importância epidemiológica, pois pode disseminar-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas do úbere e do leite. O conhecimento da cadeia epidemiológica de qualquer enfermidade é passo fundamental para que sejam aplicadas medidas ideais de profilaxia e controle de uma doença (AMARAL, 2003).

Segundo Brito (2003) a mastite ainda é uma doença não passível de erradicação, e deste modo, medidas profiláticas devem ser realizadas para manter a prevalência da mastite o mais baixo possível. Magalhães (2006) ressalta que a mastite é o resultado final da interação entre diferentes fatores como a higiene do ambiente, responsável pela concentração de microrganismos ao qual a vaca está exposta, o estresse que o animal é submetido, as diferentes espécies de microrganismos e seus fatores de virulência, as estratégias de manejo, incluindo a alimentação e funcionamento dos equipamentos de ordenha, além dos procedimentos da ordenha com ênfase na higienização associado à conscientização dos funcionários.

Os programas de controle e prevenção da mastite têm por objetivo limitar a prevalência das infecções e por consequência diminuir os impactos econômicos na atividade leiteira. Um bom programa de controle deve ter como metas erradicar a mastite contagiosa, manter baixos os índices de mastite ambiental, manter CCS abaixo de 200.000/mL/leite e possuir 85% das vacas livres da mastite subclínica. Para alcançar estas metas é necessário atuar sobre a fonte da infecção, detectando corretamente as vacas com mastite clínica e subclínica, tratando-as corretamente, e eliminar os animais com infecções crônicas (RUPP, 2000; BRITO et al., 2002a).

Em qualquer programa de controle uma atenção especial deve ser dada ao treinamento e capacitação da mão-de-obra. As recomendações contidas nos programas são geralmente reunidas

sob títulos como “procedimentos adequados de ordenha” ou “boas práticas agropecuárias”, que abrangem cuidados que vão além dos procedimentos comuns de ordenha (BRITO et al., 2002a). Seguem-se abaixo pontos importantes que devem ser enfatizados em um bom programa de controle e prevenção da mastite:

- Mão de obra especializada: para o estabelecimento de um programa de controle eficiente da mastite é essencial o treinamento dos ordenhadores sobre os princípios de higiene, fisiologia da lactação, funcionamento e manutenção dos equipamentos de ordenha (BRITO et al., 2002a).
- Adequação do ambiente: a manutenção dos animais em ambiente higiênico, seco e confortável visa em primeiro plano minimizar os problemas relativos às mastites ambientais, porém indiretamente tem reflexos na mastite contagiosa (AMARAL et al., 2003).
- Preparação do úbere para a ordenha: este procedimento visa à lavagem dos tetos para posterior realização do “pré-dipping”. Este procedimento consiste em lavar as tetas com água e usar desinfetante sanitizante aprovado. Um contato de 30 segundos do desinfetante com as tetas deve ser realizado para permitir sua atuação. Em seguida as tetas são secadas cuidadosamente com papel toalha descartáveis para evitar a contaminação do leite com resíduos do desinfetante (OLIVEIRA et al., 1999; BRITO et al., 2002a; MAGALHÃES, 2006).
- Desinfecção do úbere pós-ordenha: permite evitar a disseminação dos microrganismos no rebanho e prevenir a mastite subclínica. O desinfetante deve ser aplicado imediatamente após a retirada dos insufladores. A imersão dos tetos deve ser total, utilizando-se frascos de imersão, não permitindo o retorno do produto (BRITO et al., 2002a; DIAS, 2007).
- Higienização e manutenção dos equipamentos de ordenha: a limpeza do equipamento é tão importante quanto o manejo e higiene da ordenha, sendo fundamental para a qualidade do leite (BRITO et al., 2002a; DIAS, 2007).
- Terapia da vaca seca: o tratamento de todas as vacas ao final da lactação é um dos procedimentos eficientes para controle da mastite subclínica e tem os objetivos de eliminar as infecções subclínicas existentes e prevenir as infecções de ocorrência comum ao início do período seco (OLIVEIRA et al., 1999; RUPP, 2000).

Apesar do controle da mastite ser fundamentado na adoção de medidas higiênico-sanitárias, a antibioticoterapia pode exercer um importante papel especialmente se considerada a possibilidade da redução das infecções intramamárias e, a conseqüente eliminação das prováveis fontes de infecção (ERSKINE et al., 1993).

A eficácia clínica de um antimicrobiano no tratamento da mastite depende de fatores como variações na resposta individual e do rebanho, o tipo de microrganismo envolvido, a localização dos sítios infectados, o grau de endurecimento da glândula mamária e a duração da infecção. No entanto, as falhas terapêuticas podem ocorrer em decorrência da distribuição inadequada do fármaco pelos fluidos e tecidos do organismo, o baixo grau de ionização no leite com pH normal ou alterado, o efeito negativo de sua ação nos mecanismos de defesa do organismo, a localização do foco infeccioso e a baixa sensibilidade do microrganismo frente ao fármaco (AMARAL et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2006), sendo, a resistência microbiana o principal motivo da ineficiência terapêutica na mastite.

Tradicionalmente utiliza-se a via de administração intramamária de agentes antimicrobianos para o tratamento de mastite clínica ou subclínica, a qual permite aplicações de pequenas quantidades de agentes antimicrobianos diretamente no local da infecção. Os produtos usados em vacas lactantes são geralmente projetados para a rápida eliminação e para a redução das restrições de suspensão do uso do leite (RADOSTITS et al., 2000). Antibióticos como gentamicina, tetraciclina e enrofloxacinina têm sido amplamente utilizados no tratamento da mastite bovina, sendo este último fármaco de uso exclusivo na Medicina Veterinária.

Um aspecto importante da terapia é a exata identificação positiva do animal que esta sendo tratado e o registro de informações de relevância clínica e laboratorial como a identificação da vaca, quartos acometidos, data do evento da mastite, número de lactações, identificação do patógeno, tratamento empregado, incluindo dose, via e duração (BRITO e al., 2002a).

2.4. Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

Segundo Oliveira et al. (2006) o gênero *Staphylococcus* apresenta grande versatilidade de estratégias de patogenicidade, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência e multiplicação em uma diversidade de ambientes. O repertório genético desta bactéria para adaptação a mudanças e ambientes hostis, foi demonstrado pelo surgimento de cepas que manifestaram mecanismos de resistência a todos os antimicrobianos logo após a introdução destes fármacos na prática clínica. Algumas espécies produzem enzimas e toxinas como a coagulase, hialuronidase, enterotoxinas, toxinas, hemolisinas e leucocidinas.

2.4.1 Formação de biofilme

Os primeiros relatos sobre a formação de biofilme datam do século XVII, quando Antoine van Leeuwenhoek observou, ao microscópio, minúsculas partículas aderidas ao dente (MAESTRE; VERA, 2004). No entanto, o estudo da produção do biofilme (“slime”) iniciou-se quando Baird-Parker notou a produção de um material mucóide por vários isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (CHRISTENSEN et al., 1994) e o termo “slime” foi descrito por Jones em 1963. Somente em 1978, Costerton et al. (1995) lançaram a teoria da produção de “slime”, explicando os mecanismos pelos quais os organismos se aderem a materiais vivos e inanimados e os benefícios que resultam deste nicho ecológico. Hoje, o termo “slime”, por alguns autores, é descrito como biofilme, composto por produtos bacterianos e do hospedeiro, de diferente composição química (ARCIOLA et al., 2001; GELOSIA et al., 2001).

A presença desta substância mucóide foi observada por Bayston; Penny (1972) em *Staphylococcus epidermidis* isolado de válvulas infectadas utilizadas para o tratamento de hidrocefalia, demonstrando a importância deste material na patogênese das infecções (CHRISTENSEN et al., 1994; FREEMAN et al., 1989; HEINZELMANN et al., 1997).

Embora os ECN sejam relatados como patógenos oportunistas, a patogenia das infecções causadas por estas bactérias é complexa e multifatorial, sendo vários os fatores de virulência envolvidos nas infecções por estes microrganismos. O grande sucesso deste grupo bacteriano está relacionado à sua habilidade em se aderir e permanecer em superfícies inertes ou vivas, sob uma cobertura protetora de um material extracelular que forma, junto ao aglomerado de células bacterianas, o biofilme.

Os *Staphylococcus* spp. são importantes agentes etiológicos que causam infecções intramamárias no rebanho leiteiro e estão associados a várias formas de mastite clínica e subclínica. A aderência destes microrganismos ao epitélio da glândula mamária é considerada o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite. A maioria dos *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos associados ao quadro de mastite é produtora de “slime” o que auxilia na aderência e colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária (BASELGA et al., 1993; AGUILAR et al., 2001). Algumas cepas produtoras de “slime” apresentam significativa capacidade de colonização quando comparadas às cepas não produtoras (AGUILAR et al., 2001). A habilidade de *Staphylococcus* spp. em formar “slime” auxilia no processo de sobrevivência bacteriana em ambientes hostis dentro do hospedeiro e é considerado um fator responsável pelas infecções crônicas e persistentes. Associado a isto, outro fator importante da produção do

“slime” é a aderência dos estafilococos aos bocais das ordenhadeiras, o que favorece sua colonização nas superfícies plásticas, que é controlada por interações hidrofóbicas entre as bactérias e estas superfícies.

Além da habilidade dos *Staphylococcus* spp. produzirem biofilmes ser um dos fatores de virulência para a mastite, os biofilmes também são uns dos problemas em relação ao tratamento das infecções por permitir que microrganismos fiquem protegidos da ação de antimicrobianos e da fagocitose pelo sistema imune, o que torna a mastite subclínica persistente (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; AGUILAR et al., 2001).

A produção do biofilme é regulado pelo *quorum sensing*, nome dado ao mecanismo de comunicação bacteriana sobre a densidade populacional de células no meio em que se encontra. O efeito *quorum sensing* é conseguido pela bactéria através da comunicação entre células presentes no mesmo ambiente, por meio de moléculas secretadas por uma célula e detectadas por outras. A expressão deste agrupamento bacteriano é regulado por fatores do meio ambiente e tem sido demonstrado *in vitro* por *S. epidermidis* e *in vivo* por *S. aureus*. Em *Staphylococcus* spp. o sistema *quorum-sensing* permite a comunicação célula-a-célula e a regulação de numerosos fatores de virulência e colonização (JEFFERSON et al., 2004). O sistema regulador do gene acessório (*agr*) de *Staphylococcus* spp. tem designado um papel central na patogenicidade de *Staphylococcus*, particularmente de *S. aureus*. Este sistema diminui a expressão de diversas proteínas de superfície celular e aumenta a expressão de muitos fatores de virulência secretados na transmissão do crescimento exponencial tardio para a fase estacionária *in vitro*. A literatura relata que o fenótipo *agr* e os modelos de expressão podem influenciar em diversos aspectos o comportamento do biofilme, incluindo aderência de células a superfícies, distribuição do biofilme e ainda a natureza crônica de muitas infecções associadas aos biofilmes (MORALES et al., 2004).

A habilidade dos *Staphylococcus* spp. se aderirem à superfície do epitélio tem sido associada à produção de biofilmes, composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz. Os biofilmes são agregados de microrganismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre micro colônias. Este tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de microrganismos por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (AGUILAR et al., 2001; COSTERTON et al., 2003).

O processo da formação do biofilme depende também do tipo de microrganismo, da composição da superfície e das influências do meio ambiente. A adesão inicial da bactéria depende das interações da bactéria com a superfície do material, incluindo as forças de van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. O primeiro estágio da colonização, a exposição ou fase de chegada é importante na determinação da infecção por microrganismos e é reversível (CHRISTENSEN et al., 1994; MORALES et al., 2004). A aderência inicial é promovida pela presença de sítios únicos existentes na superfície do material e variações hidrofóbicas, irregularidades superficiais e a presença de proteínas plasmáticas adsorvidas na superfície do material (camada condicionante) e o acúmulo deste material formam camadas dando origem ao biofilme. Uma vez as células bacterianas aderidas à superfície do material de implante, servem de sinal ou de alvo para receptores bacterianos específicos se ligarem (CHRISTENSEN et al., 1994; GELOSIA et al., 2001). O segundo estágio ou fase de imobilização é acompanhado pela multiplicação local dos *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos com a formação de um crescimento superficial aderente protegido por uma camada de

polissacarídeo extracelular denominada de “slime” (GELOSIA et al., 2001; HUSSAIN et al., 2001; ALCARÁZ et al., 2003; MORALES et al., 2004).

A composição dos biofilmes é heterogênea, devido à presença do grande número de diferentes microrganismos com várias propriedades fisiológicas e metabólicas (MARQUES, 2005).

A proliferação das células para aderir e formar o biofilme é mediada pela produção do adesina intercelular polissacarídica (PIA) ou poli-N-succinil-1,6-glucosamina. O PIA é localizado na superfície celular mediado por produtos do gene cromossômico *ica* (adesão intercelular) e corresponde a quatro genes de adesão intercelular, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, e um gene regulador, *icaR* organizados em uma estrutura de operon, envolvidos na produção deste polissacarídeo e codificam quatro proteínas que são necessárias para a síntese do PIA que são, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* (ARCIOLA et al., 2001; JOHANNES et al., 2001; CONLON et al., 2002; CAFISO et al., 2004; FITZGERALD et al., 2005).

O gene *icaA* representa atividade catalítica N-acetilglicosaminatransferase e que sozinho tem baixa atividade de transferase mas, quando é co-expresso com o gene *icaD* apresenta atividade total sintetizando resíduos longos de 10-20 oligômeros de 1,6-N-acetil glicosamina (GALDBART et al., 2000; DOBINSKY et al., 2002; GOTZ, 2002). O gene *icaB* codifica uma proteína que catalisa reações de diacetilação durante a biossíntese do PIA. O *icaC* sintetiza longos oligômeros, no entanto, não possui atividade bem definida, sua função provavelmente está associada ao transporte transmembrana, não tendo atividade essencial para a síntese do PIA (DOBINSKY et al., 2002; GOTZ, 2002).

Além do polissacarídeo intercelular, um polissacarídeo específico de alto peso molecular que apresenta a mesma função da cápsula bacteriana e intervém na aderência inicial da bactéria na superfície do polímero é chamado de polissacarídeo capsular/adesina (PS/A) (ARCIOLA et al., 2001; GOTZ, 2002). Este polissacarídeo é descrito como componente da superfície celular e da camada do biofilme protegendo a bactéria das defesas do hospedeiro e da fagocitose e está envolvido no primeiro passo da adesão primária, acompanhada da proliferação das células em grupamentos multicamadas (ARCIOLA et al., 2001; GERKE et al., 1998).

O “slime” potencializa a patogenicidade dos estafilococos permitindo-lhes resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro ou fazendo-os menos sensíveis aos agentes antimicrobianos (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000). Entre os mecanismos responsáveis por essa resistência estão a barreira de difusão física e química formada pela matriz exopolissacarídica que dificulta a penetração dos antimicrobianos, a existência de microambientes que antagonizem a ação do antibiótico, a ativação de respostas de estresse que provocam mudanças na fisiologia bacteriana e o crescimento estável e mais lento desses microrganismos devido à limitação de nutrientes. Além disso, as bactérias que formam o biofilme estão em estágio de latência, onde a atividade metabólica e multiplicação são baixas. Desta forma, a célula bacteriana perde os alvos para ligação com antibióticos, tornando-se, portanto, resistentes a estes (MAH; O'TOOLE, 2001).

Ao avaliar quadros de sepse associada ao uso de cateter, Christensen et al. (1982; 1985) observaram que cepas de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isoladas de casos clínicos, quando inoculadas em tubos de plásticos contendo caldo tripticase de soja, cobriam a parede do tubo com uma espessa camada viscosa observada após coloração, formando um filme residual de bactéria denominada de “slime”. Com o intuito de quantificar esta aderência, o método foi substituído por placas de poliestireno de micro-poços em U e a leitura medida por densidade óptica com um espectrofotômetro automático do filme aderente corado.

Outros métodos de detecção, como a detecção qualitativa desta formação foi descrita por Freeman et al. (1989), utilizando o ágar vermelho Congo, onde os isolados “slime” positivos

formam colônias negras e os “slime” negativos formam colônias vermelhas (ARCIOLA et al., 2001; GOTZ, 2002).

2.4.2. Propriedades hemolíticas (genes *hla* e *hlb*)

Os *Staphylococcus* spp. produzem quatro classes de hemolisinas, também chamadas de citotoxinas, que incluem α - hemolisina, β -hemolisina, γ - hemolisina e δ - hemolisina (PREVOST et al., 1995; CUNHA et al., 1998; NISHIYAMA et al., 2002; LIASSINE et al., 2004). A ação destas hemolisinas pode auxiliar no poder invasivo das bactérias (SAKO; TSUCHIDA, et al., 1983).

2.4.2.1 Alfa hemolisina

A α - hemolisina é uma toxina citolítica cuja função está relacionada com a formação de poros em membranas celulares. É tóxica a várias células de mamíferos, sendo hemolítica para eritrócitos de carneiro, dermonecrotica e neurotóxica. Os monômeros da α -toxina atacam as membranas celulares e formam hexâmeros ou heptâmeros, originando a formação do poro (BHAKDI et al., 1991). Estes poros induzem a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais causando apoptose em linfócitos (JONAS et al., 1994). Além deste fator, a formação de poros leva à célula ao desequilíbrio osmótico devido à perda de íons (BHAKDI et al., 1991). Sua capacidade em lisar eritrócitos é variável de acordo com o tipo de hospedeiro. No entanto, em células humanas o efeito citopatogênico não está associado à hemólise. O principal efeito da α -toxina é o dano celular endotelial e a ativação de plaquetas, levando ao comprometimento da microcirculação. A toxina age também nas membranas, induzindo a produção de prostaglandinas que resulta em vasoconstrição, em aumento de permeabilidade capilar e em edema. Além disso, esta hemolisina pode também ativar endonucleases celulares, precipitando a morte da célula (LIASSINE et al., 2004).

O gene codificador para a α -toxina é o gene *hla*, que foi clonado e seqüenciado em 1983 (SAKO; TSUCHIDA, et al., 1983) e está sob controle do gene regulador *agr*, sendo produzida na fase estacionária do crescimento bacteriano. Encontrada principalmente em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus warneri* (CUNHA et al., 1998).

2.4.2.2 Beta hemolisina

A beta-toxina ou esfingomielinase C foi identificada em 1935, a partir de linhagens de *Staphylococcus aureus* e clonada e seqüenciada por Projan em 1989 (PROJAN et al., 1997). Atualmente já foi isolada e seqüenciada em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus lugdunensis* (LIASSINE et al., 2005). Esta toxina está localizada no fragmento de DNA cromossômico *Cla* I de 4Kb e é codificada pelo gene *hlb*. Sua síntese ocorre na fase exponencial do crescimento bacteriano.

A beta-hemolisina, diferentemente de outras toxinas citolíticas, é uma enzima que apresenta atividade de esfingomielinase e destrói membranas celulares ricas em esfingomielina, sendo tóxica para vários tipos celulares tais como hemácias, leucócitos, plaquetas, fibroblastos e macrófagos. As diferenças na suscetibilidade dos eritrócitos à beta-hemolisina podem ser explicadas pela quantidade de esfingomielina presente nos diferentes eritrócitos. No entanto, seu papel patogênico em infecções humanas é desconhecido (NISHIYAMA et al., 2002).

2.4.2.3 Delta hemolisina

A δ -toxina é um peptídeo contendo 26 aminoácidos que potencializa a ação da beta-hemolisina *in vitro*, aumentando suas propriedades hemolíticas (RUZIKOVA, 2008). Segundo Christie e Graydon (1941) (*apud* WILLIAMS; HARPER, 2005) algumas cepas estafilocócicas são capazes de produzir uma área definida de hemólise completa quando inoculados dentro da zona de efeito beta hemolítico produzido por outros estafilococos. Este método foi denominado ensaio sinérgico hemolítico (SHA) e é devido à ação combinada da beta e delta citolisina que pode ser avaliada em meios de ágar contendo eritrócitos ovinos, bovinos, humanos e eqüinos. Como a alfa citolisina não tem efeito sobre eritrócitos humanos e eqüinos, e a beta e gama citolisina apresentam pouco ou nenhum efeito sobre eritrócitos de eqüinos se deduz que o SHA observado é devido a delta toxina e deve ser observado principalmente em sangue de ovino (HEBERT; HANCOCK, 1985).

A δ -toxina atua em membranas celulares formando poros em células de mamíferos. É codificada pelo gene *hld* que está sob o controle de um sistema de genes reguladores denominado de *agr*. A função precisa da δ -toxina em doença humana ainda não é clara tendo, porém, uma grande variedade de efeitos citolíticos em vários tipos celulares, como os eritrócitos, pela formação de poros na membrana citoplasmática (BOHACH et al., 1997; CUNHA, 1998).

Esta toxina também está associada na estimulação da linfocitose e a produção de imunoglobulinas. Em recém-nascidos tem sido implicada na etiologia de enterocolite necrozante em associação com ECN. A δ -toxina tem sido detectada em isolados de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus warneri* (BOHACH et al., 1997; CUNHA, 1998).

2.4.2.4 Gama hemolisina

Esta toxina, também chamadas de leucotoxina, é tóxica para neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos (LIASSINE et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar a presença de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos em amostras de leite positivas para o CMT em bovinos de rebanhos leiteiros, assim como seus fatores de virulência e perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

3.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar fenotipicamente as espécies de estafilococos coagulase-negativos isoladas de leite de vacas que apresentaram quadros de mastite clínica/subclínica através de testes de campo;
- Avaliar a suscetibilidade fenotípica dos estafilococos coagulase-negativos aos antibióticos de eleição;
- Detectar a sua resistência à oxacilina através de diferentes provas e através da produção de beta-lactamases;
- Amplificar os genes de resistência à oxacilina: *mecA*, *mecRI* e *mecI* em todos os isolados;
- Amplificar os genes de resistência aos beta-lactâmicos pela produção de beta-lactamases: *blaZ*, *blaI* e *blaRI*.
- Detectar através de provas fenotípicas os fatores de virulência: “slime”, hemolisinas e sinergismo hemolítico em todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos;
- Amplificar os genes de virulência *hla* e *hly* (alfa e beta hemolisinas, respectivamente) e *icaA* e *icaD* (“slime”) em todos os isolados;
- Estabelecer perfis bacterianos utilizando como base os parâmetros avaliados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das amostras de leite

Foram avaliadas 150 amostras de leite de vacas, pertencentes a 10 propriedades situadas em cidades pertencentes ou adjacentes à região Sul Fluminense do Rio de Janeiro (tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de amostras de leite de vacas com mastite subclínica de diferentes propriedades situadas em cidades do Estado do Rio de Janeiro.

Identificação da propriedade	Cidade	Número de amostras
1	Seropédica	50
2	Resende	15
3	Barra Mansa	14
4	Resende	12
5	Resende	11
6	Barra Mansa	10
7	Barra Mansa	10
8	Barra Mansa	10
9	Barra Mansa	10
10	Resende	8
Total		150

Após a coleta por veterinários colaboradores que atuam na assistência aos produtores, as amostras de leite foram enviadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária, situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os veterinários foram instruídos a realizar o “California Mastitis Test” imediatamente antes da ordenha. O resultado, relacionado à contagem de células somáticas, foi avaliado de acordo com o grau de gelatinização da mistura em partes iguais de leite e reagente (FONSECA; SANTOS, 2000). Os animais considerados positivos foram selecionados, tiveram os tetos higienizados com água e sabão neutro e secagem com papel toalha e, então foi coletado um volume de aproximadamente 10 mL de leite por ordenha manual em tubo de ensaio estéril. As amostras foram imediatamente transportadas sob condições adequadas de refrigeração e posteriormente congeladas. Para a realização do isolamento a partir das amostras obtidas, estas foram incubadas por 6 h a 37°C.

Após a etapa de identificação bioquímica e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, os isolados avaliados foram mantidos congelados em caldo MH acrescido de glicerol à 4% para posterior realização das análises genéticas.

4.2. Identificação das espécies

As amostras de leite foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento ágar Müeller Hinton (MH) - Micromed - contendo 5% sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente repicadas em ágar

seletivo Manitol Vermelho de Fenol (Britania), para observação das características das colônias e fermentação, ou não, do manitol (KONEMAN et al., 2008).

4.2.1 Método de Gram, prova do hidróxido de potássio (KOH) a 3% e prova da catalase

Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintoriais. O teste da catalase foi realizado através de teste em lâmina, onde um fragmento de colônia bacteriana foi adicionada a solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de bolhas de O₂ indicou teste positivo. A prova do hidróxido de potássio foi efetuada através da adição de uma gota de KOH (3%) a um fragmento de colônia bacteriana. A não formação de um gel viscoso indicou um resultado negativo confirmando a prova do Gram, uma vez que todas as bactérias Gram positivas são negativas na prova do KOH a 3% (KONEMAN et al., 2008).

4.2.2 Prova da coagulase

O teste para a detecção da presença da coagulase foi realizado utilizando o crescimento bacteriano obtido em caldo BHI (infuso de cérebro e coração - Britania), incubado a 35°C, por 24 horas. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada a 0,5 mL de plasma de coelho (Larboclin) e, incubados a 37°C por 6 horas a fim de obter a visualização do coágulo. As amostras coagulase-negativas foram avaliadas quanto ao seu perfil de resistência à bacitracina (KONEMAN et al., 2008).

4.2.3 Resistência à bacitracina

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



Figura 1. Resistência à bacitracina - o crescimento bacteriano ao redor do disco de antibiótico indica resistência.

4.2.4 Prova de fermentação de açúcares, produção de urease e redução de nitrato

A fermentação de açúcares foi testada utilizando o caldo Vermelho de Fenol (Micromed) acrescido de 1% do açúcar. A produção de ácido, indicado pela diminuição do pH e conseqüente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas na temperatura de 37°C. Os açúcares avaliados foram: xilose, sacarose, trealose, maltose, lactose, frutose e manose (KONEMAN et al., 2008).

A prova da uréia foi realizada com uma suspensão densa do microrganismo preparada em uma solução balanceada de sais (KH_2PO_4 a 0,1%, K_2HPO_4 a 0,1%, NaCl a 0,5% e 0,5 mL de uma solução de vermelho-de-fenol a 2% e uréia). O desenvolvimento de cor rosa no meio após 4 horas de incubação representa resultado positivo da prova; as provas negativas foram reincubadas durante 18h (KONEMAN et al, 2008).

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO_3). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada em lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 37°C e, uma gota de cada reativo (A e B) de Griess Ilosway. A coloração rosa indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva (KONEMAN et al., 2008). O anexo 1 apresenta o padrão de identificação das espécies de estafilococos coagulase-negativos utilizado, segundo os testes acima citados.

4.3. Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foram submetidos aos testes de suscetibilidade segundo os padrões do Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI, 2008).

Os isolados foram suspensos em caldo BHI, incubados durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e diluídos na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL.

Para comparação e controle dos testes avaliados foram utilizadas as cepas padrão ATCC de *S. aureus* 25923 e ATCC de *S. aureus* 29213 obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

4.3.1. Difusão em disco simples

Uma suspensão bacteriana (0,1 mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar MH (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37⁰C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (KOHNER et al., 1999).

4.3.1.1. Discos de antimicrobianos

A eficácia comparativa da penicilina (10UI), ampicilina (10µg), oxacilina (1µg), cefoxitina (30µg), ampicilina-sulbactam (10/10µg), ceftriaxona (30µg), cefalotina (30µg), imipenem (10µg), vancomicina (30µg), gentamicina (10µg), azitromicina (15µg), eritromicina (15µg), tetraciclina (30µg), ciprofloxacina (5µg), norfloxacina (10µg), enrofloxacina (10µg), clindamicina (2µg), linezolida (30µg), e sulfametoxazol-trimetropim (1,25/23,75µg), (SENSIFAR-CEFAR[®]) foram analisadas para todos os isolados. O quadro 1 especifica as zonas de inibição do diâmetro avaliado em milímetros dos antimicrobianos utilizados.

Quadro 1. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados segundo o CLSI (2008):

Antimicrobianos	Zonas de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Penicilina (10UI)	≤28	-	≥29
Ampicilina (10µg)	≤28	-	≥29
Oxacilina (1µg)	≤17	-	≥18
Cefoxitina (30µg)	≤24	-	≥25
Ampicilina-sulbactam (10/10µg)	≤11	12-14	≥15
Ceftriaxona (30µg)	≤13	14-20	≥21
Cefalotina (30µg)	≤14	15-17	≥18
Imipenem (10µg)	≤13	14-15	≥16
Vancomicina (30µg)	-	-	≥15
Gentamicina (10µg)	≤12	13-14	≥15
Tobramicina (10µg)	≤12	13-14	≥15
Azitromicina (15µg)	≤13	14-17	≥18
Eritromicina (15µg)	≤13	14-22	≥23
Tetraciclina (30µg)	≤14	15-16	≥19
Ciprofloxacina (5µg)	≤15	16-20	≥21
Norfloxacina (10µg)	≤12	13-16	≥17
Enrofloxacina (10µg)	≤14	15-17	≥18
Clindamicina (2µg)	≤14	15-20	≥21
Linezolida (30µg)	-	-	≥21
Sulfametoxazol-trimetropim (1,25/23,75µg)	≤10	11-15	≥16

4.3.2. Teste de suscetibilidade à oxacilina

Para a realização dos testes de suscetibilidade à oxacilina, o antibiótico foi diluído a uma concentração estoque de 1,0 mg/mL, em água destilada estéril e foram realizados os testes de difusão em disco modificada, ágar “screen”, microdiluição em caldo e em placa.

4.3.2.1. Difusão em disco modificada

Nesta técnica de difusão em disco, o meio utilizado - ágar MH - foi suplementado com 4% de NaCl. A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar MH) com o auxílio da alça de Drigalski. Após incubação por 24 horas a 37⁰C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos em milímetros. Os diâmetros acima de 13 mm indicavam a sensibilidade da amostra ao antibiótico (CLSI, 2008).

4.3.2.2. Ágar “screen”

O desenvolvimento desta técnica se fez através da diluição da oxacilina (1,0 mg/mL) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de meio de cultura (MH), suplementado com 4% de NaCl. Os isolados foram semeados com o auxílio da alça de platina em 4 estrias por placa. Após 24 horas de incubação a 37°C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (CLSI, 2008).

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

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0 mg/mL) foi diluída nas seguintes concentrações: 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1,0µg/mL; 2,0µg/mL; 4,0µg/mL, 8,0µg/mL, 16,0µg/mL, 32,0µg/mL, 64,0µg/mL, 128,0µg/mL e 256,0µg/mL em caldo MH suplementado com 2% de NaCl.

Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana, crescida nas mesmas condições descritas anteriormente, foi adicionada a 0,9 mL de caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico e incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos tubos, através da leitura visual. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração do fármaco presente no caldo MH. Logo, o valor da concentração do caldo posterior ao último que apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (CLSI, 2008).

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

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

Os isolados foram repicados no ágar MH contendo as distintas concentrações de oxacilina e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi avaliado através do crescimento da colônia no ágar. Logo, o valor da concentração do ágar posterior ao que apresentou o último crescimento bacteriano, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (CLSI, 2008).

4.4. Testes de detecção de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp.

4.4.1 Teste de nitrocefim

Trata-se de um teste cromogênico que detecta a capacidade da beta-lactamase hidrolisar o anel beta-lactâmico através de uma cefalosporina cromogênica, ocorrendo uma mudança de cor quando houver ruptura do anel beta-lactâmico (BERNARDO et al., 2005).

A produção de beta-lactamase foi detectada pelo uso de discos impregnados com Nitrocefina (Oxoid®), uma cefalosporina cromogênica. Todos os isolados foram semeados em ágar TSA (ágar tripticase de soja) acrescido de 1 µg/mL de penicilina e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, o teste de nitrocefim foi realizado segundo metodologia proposta pelo CLSI (2008). O disco constituído de uma cefalosporina cromogênica foi umedecido com água destilada estéril e em seguida foi aplicada sobre a superfície de algumas colônias de cada isolado em ágar TSA, empregando ponteiros estéreis. A reação positiva foi evidenciada pelo desenvolvimento de uma coloração rosa, no local onde foi aplicado o microrganismo e a negativa, pela não alteração de cor. Para isolados beta-lactamase negativos, a reação foi reexaminada após uma hora, conforme recomendações do fabricante.

4.4.2 Teste de fita para detecção da produção de beta-lactamases

É um teste cromogênico que detecta a capacidade da beta-lactamase hidrolisar o anel beta-lactâmico através de uma cefalosporina cromogênica, ocorrendo uma mudança de cor quando houver ruptura do anel beta-lactâmico (BERNARDO et al., 2005). A metodologia foi realizada segundo as recomendações técnicas do fabricante, na qual um fragmento de cada colônia crescida em ágar TSA foi colocado na superfície da fita e a coloração branca indicou prova positiva e conseqüente produção de beta-lactamase (Probac do Brasil).

4.5. Detecção da resistência induzível à clindamicina

A resistência induzível à clindamicina foi detectada pela colocação do disco de clindamicina (2 µg) a uma distância de 15 a 26 mm do disco de eritromicina (15 µg) em ágar MH. Após o período de incubação de 24 h a 35°C os microrganismos que não apresentaram achatamento do halo de inibição da clindamicina foram considerados sensíveis à clindamicina. Organismos que apresentarem achatamento do halo da clindamicina adjacente ao disco de eritromicina indicam resistência induzível à clindamicina e devem ser reportados como resistentes (CLSI, 2008).

4.6. Detecção Fenotípica dos Fatores de Virulência

4.6.1. Produção de “slime” em microplaca

Os isolados foram semeados em ágar sangue por 24h a 37°C e as colônias foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo caldo tripticase soja (Britania) a 0,24% de glicose, e novamente incubadas por 24h. Após crescimento bacteriano o caldo foi descartado vertendo-se a microplaca. Os poços foram lavados com água destilada e corados com fucsina por 30 minutos em temperatura ambiente. A produção de “slime” foi observada como uma película aderida à ao fundo da placa (CHRISTENSEN et al., 1985). Os resultados foram avaliados através de leitura visual segundo a escala: ausente (-), fraco (+), moderado (++) e forte (+++). Para controle positivo do teste foi utilizada a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

4.6.2. Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo

As placas de ágar Vermelho Congo (CRA) foram preparadas através da adição de 0,8g de Vermelho Congo e 36g de sacarose (Sigma) a cada 1L de caldo BHI (Britania). Todos os isolados foram semeados na superfície do ágar e após 24h a 37°C a coloração das colônias foi avaliada. Os isolados que produziram colônias coradas em preto foram consideradas produtoras de “slime” enquanto que colônias vermelhas foram classificadas como não produtoras (ARCIOLA et al., 2001). A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

4.6.3. Produção de hemolisinas e sinergismo hemolítico (SHA)

Os isolados foram semeados através de estrias radiais em ágar sangue para avaliação da produção de halos de hemólise total e parcial após 24h a 37°C. Isolados de estafilococos produtores de hemólise total são denominados alfa hemolíticos enquanto que os produtores de hemólise parcial são denominados beta hemolíticos.

O SHA foi avaliado através do inóculo de *S. aureus* produtor de beta hemolisina em ágar sangue e os isolados foram semeados perpendicular a este. Uma zona de hemólise total dentro da zona parcial de beta hemolisina foi considerada como SHA positivo (DEMO,1996). A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle do teste.

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

Todo o experimento de amplificação dos genes foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular situado no Departamento de Parasitologia e Sanidade Animal do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

4.7.1. Extração do DNA bacteriano

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

A extração do DNA bacteriano foi realizado segundo protocolo de Senna et al., (2002) onde cada colônia crescida em ágar tripticase de soja (Merck) foi repicada em 10 mL de caldo BHI (Britania). Após 12h a 37°C, uma alíquota de 1,0 mL do caldo contendo o inóculo foi transferida para microtubos que foram centrifugados a 12.000 rpm por 2 min. Após três lavagens com tampão TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA – ph 8.0) foram adicionadas 4U de lisostafina (Sigma) a 100µl de TE contendo o precipitado. Após incubação à 37°C por 30 minutos, os microtubos foram levados ao banho-maria a 100°C por 10 minutos, e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 500 µl de tampão (SENNA et al., 2002).

A extração de DNA para detecção do gene de resistência à oxacilina e aos antibióticos beta-lactâmicos através da produção de beta-lactamase foi realizado segundo Senna et al. (2002) após o cultivo do microrganismo em ágar MH acrescido de 1 mg/mL de oxacilina.

4.7.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 10X (10 mM TrisHCl, pH 9.0; 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de MgCl₂, 1mM de cada iniciador (Bioneer- Seul, Coréia do Sul), 0,2 mM de dNTP (Fermentas- Burlington, Canadá) e 2 U de *TAQ* polimerase (Fermentas- Burlington, Canadá) em um volume total de reação de 20µl contendo 5µl do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002) .

Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose, seguido por coloração em brometo de etídeo (0,5 mg/mL), visualizado em transiluminador ultra-violeta e documentados pelo programa QuantiOne (BioRad), utilizando marcadores de peso molecular de 100 pb (Fermentas) e 50 pb (Fermentas).

A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle dos testes genotípicos avaliados.

4.7.2.1. Genes de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

Foi realizada a técnica de PCR para a possível amplificação dos genes *mecA* (COELHO et al., 2007), *mecI* (1), *mecI* (2), *mecRI* (ROSATO et al., 2003) e *femA* (ZOCHE et al., 2006) em todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos. Os iniciadores e ciclos utilizados estão expostos no quadro 2.

Quadro 2. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos
<i>mecA</i> (513pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1*
<i>mecI</i> (1) (639pb)	CCG GAA TTC GCA TAT GGA TTT CAC GAT GGT TCG TAG GTT ATG TTG	2
<i>mecI</i> (2) (348)	CGG ATC CGA AAT GGA ATT AAT ATA ATG CGG AAT TCG ACT TGA TTG TTT CCT	2
<i>mecRI</i> (234pb)	CCA AAC CCG ACA ACT AC CGT GTC AGA TAC ATT TCG	2
<i>femA</i> (132pb)	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	3

*1. (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1 min) x 40 e 72°C 5min. 2. (95°C 1min, 55°C 1 min, 72°C 2 min) x 30. 3. 95°C 5min (95°C 1min, 45°C 1min, 72°C 1min) x 37 e 72°C 105min.

4.7.2.2 Genes de resistência relacionados à produção de beta-lactamases de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Foi realizada a técnica de PCR para a possível amplificação dos genes *blaI* (1), *blaI* (2), *blaRI*, e *blaZ* (1), *blaZ* (2), *blaZ* (3) (ROSATO et al., 2003) em todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos de mastite subclínica. Os iniciadores e ciclos utilizados estão expostos no quadro 3.

Quadro 3. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência à beta-lactamase de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos
<i>blaI</i> (1) (513 pb)	ATG TCT CGC AAT TCT TCA A CTA TGG CTG AAT GGG AT	1
<i>blaI</i> (2) (650 pb)	CCC AAT GGG TGT TTT AAA TGG CCA A AAT GGT TAT TTT CTG TACTACT CT	1
<i>blaR1</i> (209 pb)	GGT ATC TAA CTC TTC TTG C CAT CTG ATA AAT GTG TAG C	1
<i>blaZ</i> (1) (639 pb)	TAC AAC TGT AAT ATC GGA GGG CAT TAC ACT CTT GGC GGT TTC	1
<i>blaZ</i> (2) (737 pb)	GAG GCT TCA ATG ACA TAT AGT G TCT ATC TCA TAT CTA ACT GG	1
<i>blaZ</i> (3) (639 pb)	TCA AAC AGT TAC CAT GCC TTC ATT ACA CTC TGG CG	1

*1. 94°C 5min. (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min.

4.7.2.2. Genes de virulência em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação dos genes envolvidos na produção de “slime”, *icaA* e *icaD* (VASUDEVAN et al., 2003) e PCR multiplex para os genes de produção de hemolisinas, *hla* e *hlb* (NILSSON et al., 1999) em todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos. Os iniciadores e ciclos utilizados estão expostos no quadro 4.

Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>hla</i> (210pb)	CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T	1
<i>hlb</i> (300pb)	GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT	1
<i>icaA</i> (1315pb)	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C	2
<i>icaD</i> (381pb)	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	2

*1. 94°C 5min. (94°C 1min, 50°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min ; 2. (92°C 45s, 49°C 45s. 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min.

4.8. Análise estatística

Os perfis de suscetibilidade aos fármacos testados foram expressos em porcentagens que foram analisadas de forma descritiva. Os perfis de suscetibilidade aos fármacos testados foram expressos em porcentagens que foram analisadas de forma descritiva. O programa Excel (Microsoft®) foi utilizado para confecção dos gráficos com os percentuais de suscetibilidade antimicrobiana.

A associação entre os testes fenotípicos de resistência à oxacilina e a detecção do gene *mecA* foi avaliada através do Teste de Qui-quadrado (X^2), utilizando o programa R, com intervalo de confiança de 95% (IC=95%).

Os percentuais de sensibilidade e especificidade, dos testes fenotípicos de produção de “slime” foram calculados considerando a presença dos genes *icaA* e/ou *icaD*, seguindo as fórmulas abaixo:

% Sensibilidade = verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos negativos

% Especificidade= verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos positivos

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos

Após a semeadura de 150 amostras de leite, foi possível obter um total de 100 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos expostos na tabela 2 e 3 e 38 *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

Tabela 2. Distribuição das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos obtidos de mastite subclínica.

Espécies de ECN	Isolados (n=100)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	70
<i>Staphylococcus cohnii</i>	10
<i>Staphylococcus hominis</i>	08
<i>Staphylococcus capitis</i>	07
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	05

Tabela 3. Número de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos por diferentes propriedades nas respectivas localidades.

Propriedades (localidade)	Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos				
	<i>S. xylosus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. haemolyticus</i>
1. Seropédica	35	5	2	3	-
2. Resende	5	1	1	-	2
3. Barra Mansa	7	1	-	-	1
4. Resende	3	-	1	2	-
5. Resende	4	1	-	1	1
6. Barra Mansa	2	-	1	-	1
7. Barra Mansa	4	-	-	1	-
8. Barra Mansa	6	1	1	-	-
9. Barra Mansa	3	1	-	-	-
10. Resende	1	-	2	-	-

No presente trabalho, foi possível detectar diferentes espécies de ECN, sendo *S. xylosus* (70/100) o microrganismo que apresentou maior frequência dentre os isolados. Segundo Dordet-Frisoni e colaboradores (2007) e Nagase e colaboradores (2002) *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria ubíqua, comensal da pele e membranas mucosas de mamíferos e aves. Pode ser encontrada em diferentes ambientes (SHALE et al., 2005; NIMRAT et al., 2006) sendo usualmente isolada de amostras de leite e carne crua. Esta espécie é normalmente definida como não patogênica, no entanto, algumas cepas de *S. xylosus* são relatadas como causadoras de infecções oportunistas em animais e humanos (SIQUEIRA et al., 2002; WON et al., 2002; TOMPKINS et al., 2004).

Foram detectadas 10 espécies de *Staphylococcus cohnii*. Lamaita e colaboradores (2005) relataram o isolamento de 17 *S. cohnii* a partir de 90 amostras de leite e Mariano e colaboradores (2007) relatam que *S. cohnii* tem sido isolados a partir de mastite bovina e ovina.

Mariano e colaboradores (2007) e Stamford e colaboradores (2006) detectaram cepas de *Staphylococcus hominis* a partir de amostras de leite. Neste trabalho, foi detectado um total de 08 isolados de *S. hominis*. A presença deste microrganismo provavelmente está relacionada à transmissão de bactérias entre humanos e animais.

No presente trabalho, foram isolados 07 *Staphylococcus capitis*. Stamford e colaboradores (2006) relataram *S. capitis* como uma espécie comumente isolada de leite *in natura* e Nickerson e colaboradores (1995) e Mahoudeau e colaboradores (1997) relataram seu isolamento a partir do úbere e leite de cabras e ovelhas com mastite.

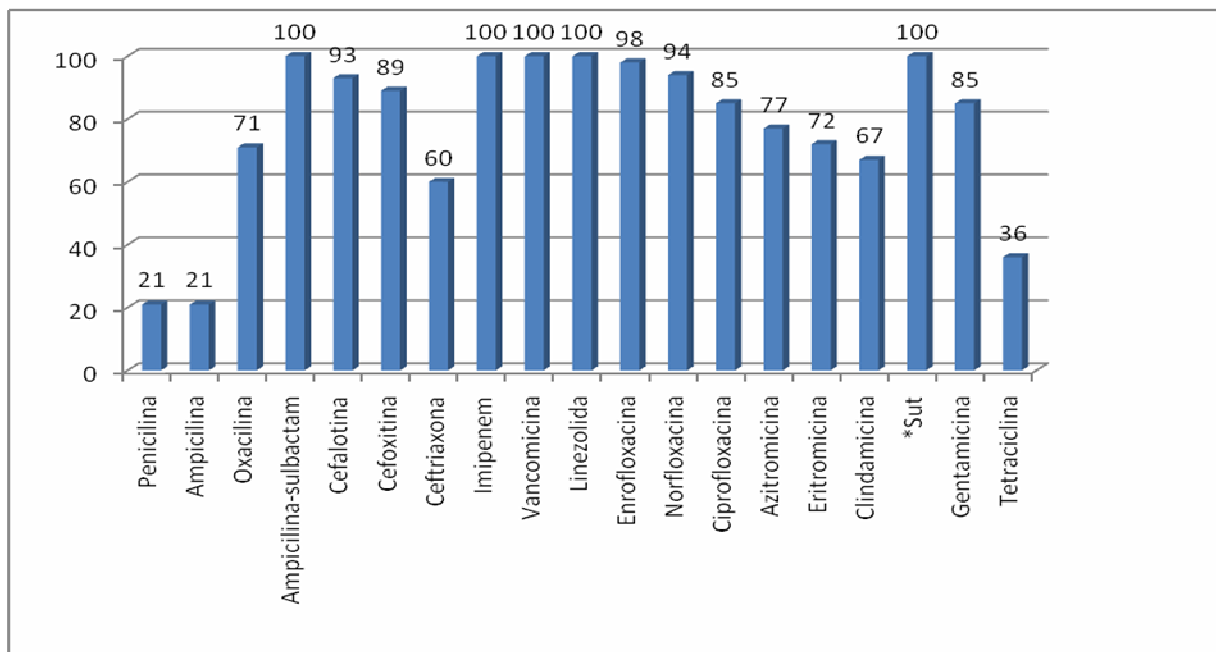
Foram detectadas 05 espécies de *Staphylococcus haemolyticus* no presente estudo. Shittu e colaboradores (2004) detectaram *S. haemolyticus* a partir de amostras de pele e infecções de tecidos moles. Norström e colaboradores (2009) relataram a presença de *Staphylococcus haemolyticus* em feridas de animais pós-operatório.

Apesar de todo avanço nas técnicas de identificação dos ECN e do conhecimento destes como agentes etiológicos em diversos processos infecciosos, estes microrganismos muitas vezes são negligenciados na rotina laboratorial, sendo reconhecidos apenas como contaminantes (BANNERMAN, 2003; De PAULIS, 2003). O maior problema enfrentado pelos microbiologistas e clínicos com relação à identificação dos estafilococos coagulase-negativo é devido à enorme diversidade de espécies encontradas. A identificação das espécies de ECN, embora de difícil realização para a maioria dos laboratórios clínicos, é necessária para diferenciar o potencial patogênico e o perfil de resistência de cada espécie (De PAULIS, 2003).

5.2. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de eleição foi avaliado através da medição do tamanho, em milímetros, da área de inibição dos antibióticos. O gráfico 1 demonstra o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos avaliados.

Gráfico 1. Disposição gráfica do percentual de sensibilidade de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.



*Sut – sulfametoxazol-trimetropim.

Foi detectado 21% de sensibilidade à penicilina e ampicilina. Resultados semelhantes foram demonstrados por Freitas e colaboradores (2005) que detectaram 20% de sensibilidade à penicilina e ampicilina ao avaliarem 59 isolados de *Staphylococcus* spp. Mendes e colaboradores (2002) detectaram 7% de sensibilidade ao avaliarem 131 isolados de ECN. No entanto, Bonna e colaboradores (2007) não detectaram sensibilidade a penicilina e ampicilina ao avaliarem 197 isolados de ECN. Este baixo percentual de sensibilidade deve-se ao fato da penicilina ser um dos antibióticos mais difundidos e utilizados no tratamento de enfermidades animais. Santos e colaboradores (2006) detectaram 10% de sensibilidade à penicilina e ampicilina ao avaliarem 30 isolados de *Staphylococcus* provenientes de leite bovino. Da mesma forma Corrêa (2003) analisou 95 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite bovino e detectou 21,06% e 22,02% de sensibilidade à ampicilina e penicilina, respectivamente.

Segundo dados da literatura, isolados de *Staphylococcus* spp. comunitários apresentam baixo percentual de sensibilidade à penicilina e ampicilina. Um estudo realizado pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY com objetivo de monitorar a prevalência de microrganismos patogênicos e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana nos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa revelaram que os ECN estão entre a terceira causa de infecções hospitalares e a segunda causa de infecções comunitárias (DIEKEMA, 2001).

A resistência à penicilina em *Staphylococcus* spp. é um fenômeno mundial e com prevalência crescente, apesar dos esforços para conter o aumento da disseminação de isolados resistentes (FREITAS et al., 2005; BONNA et al., 2007).

Foi detectado 71% de sensibilidade à oxacilina nos isolados testados. De modo semelhante, Menegotto; Picoli, (2007) detectaram 82,5% (n=40) isolados de estafilococos sensíveis a oxacilina. Santos e colaboradores (2003) detectaram 96,7% (n=30) de sensibilidade em isolados de estafilococos provenientes de mastite bovina.

No entanto, a sensibilidade reduzida à oxacilina tem sido relatada por Sadoyama; Gontijo-Filho (2000), onde relataram que o ambiente hospitalar é o local com maior percentual de resistência a oxacilina. O índice de sensibilidade a oxacilina no presente trabalho é alto quando comparados com trabalhos realizados por John e colaboradores (2002) que analisaram 135 estafilococos coagulase-negativos e detectaram sensibilidade à oxacilina para 38% dos isolados. Ferreira e colaboradores (2002) encontraram 36% (n=152) de sensibilidade à oxacilina em ECN isolados de diferentes sítios clínicos.

A oxacilina foi introduzida em 1961 e é considerada o antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. resistente à penicilina e ampicilina. No entanto, com o aumento da resistência à oxacilina a vancomicina é uma das principais alternativas no tratamento das infecções causadas por estafilococos resistentes à oxacilina (CHANG, 2003b).

Foi detectado 100% de sensibilidade à associação entre ampicilina e sulbactam. Segundo Hirano; Bayer (1991), o uso de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamase é uma alternativa terapêutica no tratamento de infecções por microrganismos produtores de beta-lactamase e multirresistentes. Monroy e colaboradores (2003) relataram que a associação de ampicilina-sulbactam foi eficaz frente a 73 isolados de estafilococos. Da mesma forma, Fernandes e colaboradores (2005) detectaram 80% de sensibilidade ao avaliarem 27 isolados de estafilococos. A não detecção da resistência a este fármaco pode estar relacionado ao elevado custo e ao uso ainda restrito deste tipo de antibiótico nas clínicas veterinárias e humanas (RUSSEL; CHOPRA, 1996).

Foi detectado 93% de sensibilidade a cefalotina. Resultado semelhante 94,7% (n=23) foi demonstrado por Aspis e colaboradores (2003) em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de animais. A cefalotina é uma cefalosporina de primeira geração sendo uma das mais indicadas no tratamento da mastite subclínica e no tratamento de vacas secas. Sua melhor atuação sobre bactérias Gram-positivas, causadoras da maior parte das mastites subclínicas, garante-lhes um lugar de destaque nestes casos (LÓPEZ et al., 1996; LEITER, 2000).

No presente trabalho foi detectado 89% de sensibilidade a cefoxitina. Trata-se de uma cefalosporina de segunda geração que apresenta alta afinidade com a PBP2, PBP4 e resistência à oxacilina, sendo indutora na expressão do gene *mecA* e apresentando grande especificidade (CAUWELIER et al., 2004).

Cauwelier e colaboradores (2004) e Palazzo; Darini (2006) encontraram índices de sensibilidade menores ao exposto pelo presente trabalho. Cauwelier e colaboradores (2004) encontraram 40% (n=155) de sensibilidade e Palazzo; Darini (2006) obtiveram 50,34% (n=151) em isolados de ECN.

A redução da sensibilidade em estafilococos coagulase-negativos pode estar associada ao fato às sucessivas exposições ao fármaco, o que permite que essas bactérias tornem-se resistentes a este antibiótico (HARIHARAN et al., 2006).

Foi detectada 60% de sensibilidade à ceftriaxona. Os estafilococos meticilina-resistentes são normalmente resistentes às cefalosporinas, inclusive à ceftriaxona (LEITER, 2009).

No presente trabalho foi detectado 100% de sensibilidade ao imipenem. De semelhante modo, Tunon e colaboradores (2008) detectaram 100% (n=18) de sensibilidade em isolados de estafilococos e Sader e colaboradores (1999) detectaram 88% (n=17) de sensibilidade em isolados de ECN. O imipenem representa os beta-lactâmicos com maior espectro de ação e potência antimicrobiana, e são os únicos carbapenêmicos disponíveis para uso clínico no Brasil, nos Estados Unidos e na Europa. Seu elevado percentual de sensibilidade provavelmente deve-se ao fato do uso restrito deste medicamento.

Foi detectada 100% de sensibilidade à vancomicina. Estudos semelhantes como o de Freitas e colaboradores (2005a) relatam 100% (n=59) de sensibilidade em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leites de vacas com quadro de mastite. Dantas e colaboradores (2006) relataram 94,8% (n=140) de sensibilidade em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de leite e das mãos de manipuladores. A vancomicina é o antibiótico de escolha no tratamento de infecções por estafilococos resistentes a oxacilina.

Foi detectado 100% de sensibilidade à linezolida. Trata-se de um novo antibiótico que atua contra infecções por estafilococos resistentes à oxacilina. Também é considerada uma alternativa ao tratamento com vancomicina, porém seu uso prolongado deve ser evitado devido sua toxicidade (MALTEZOU et al., 2006). Segundo Kim e colaboradores (2004) e Stevens e colaboradores (2002) a linezolida é um potente antimicrobiano contra estafilococos. No entanto, segundo Tsiodras e colaboradores (2001) a resistência a linezolida foi relatada um ano após seu lançamento na indústria farmacêutica.

A introdução das fluoroquinolonas, grupo ao qual pertencem a norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, sendo esta última de uso veterinário, na década de 80, significou um avanço no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, particularmente infecções do trato urinário, visto que diversas cepas de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos mostraram-se sensíveis a esse novo grupo de medicamentos. No entanto, a literatura aponta para uma redução na sensibilidade de bactérias às quinolonas (TEIXEIRA et al., 1995).

A sensibilidade a norfloxacin e ciprofloxacina foi detectada em 94% e 85% dos isolados, respectivamente. Netto e colaboradores (2001) detectaram 95,77% (n=107) de sensibilidade à norfloxacin em isolados de *Staphylococcus* spp. Resultado semelhante foi demonstrado por Moura e colaboradores (2006) ao detectar 100% (n=27) de sensibilidade em isolados de estafilococos. Em relação à ciprofloxacina, resultados semelhantes foram demonstrados por Lopes e colaboradores (1998) que detectaram 70% de sensibilidade em 55 isolados de estafilococos. De acordo com Blumberg e colaboradores (1991) tem-se observado diminuição na frequência de *Staphylococcus* spp. sensíveis à norfloxacin e ciprofloxacina. É importante observar que existem indicações que essas cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à norfloxacin e ciprofloxacina são mais frequentemente resistentes a diversos outros antimicrobianos (LOPES et al., 1998).

No presente estudo foi detectado 98% de sensibilidade à enrofloxacin. Estudos *in vitro*, utilizando a enrofloxacin para diferentes agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites, revelaram resultados favoráveis quanto à sensibilidade desses microrganismos (CARACAPPA et al., 1991; LANGONI et al., 1994; LANGONI et al., 2000). Langoni e colaboradores (1994) detectaram 71,63% (n=101) de sensibilidade a enrofloxacin em isolados de estafilococos e Caracappa et al. (1991) relataram que este fármaco apresenta eficácia no controle do tratamento das mastites por estafilococos. Da mesma forma, Langoni e colaboradores (2000) detectaram 72% (n=55) de sensibilidade a enrofloxacin em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de quadros de mastite. Este elevado percentual de sensibilidade provavelmente deve-se ao fato deste medicamento ser restrito ao tratamento animal.

No grupo dos macrolídeos foram detectados 77% e 72% de sensibilidade à azitromicina e eritromicina, respectivamente. Resultados contrastantes foram demonstrados por Bernardi e colaboradores (2007) ao detectarem 12,5% (n=27) de sensibilidade a eritromicina em isolados de ECN e Martinaeu e colaboradores (2000) que relataram 1,5% (n=394) de sensibilidade em isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. Segundo Nawaz e colaboradores (1999) a redução da sensibilidade à eritromicina constitui um alerta para o fato deste fármaco ser rotineiramente empregado no tratamento de doenças em animais, podendo portanto trazer conseqüências

indesejáveis, como o desenvolvimento de *Staphylococcus* spp. resistentes à eritromicina. Pereira et al. (2009) detectaram 60% (n=30) de sensibilidade a azitromicina em *S. intermedius*, 44,4% (n=18) em *S. aureus* e 50% (n=12) em ECN provenientes de diversos quadros infecciosos em animais. A azitromicina é um antibiótico que permite a administração de dose única diária com curto ciclo de tratamento (HANSEN et al. 2002).

Foi detectado 67% de sensibilidade à clindamicina nos isolados de ECN. Ko e colaboradores (2005) detectaram 61,1% e 96,1% de sensibilidade em isolados de estafilococos resistentes e sensíveis à oxacilina, respectivamente. No entanto, Bernardi e colaboradores (2007) detectaram 33,3% (n=27) de sensibilidade a clindamicina em isolados de ECN. A clindamicina é uma boa alternativa para o tratamento de infecções estafilocócicas, porém podem apresentar falhas terapêuticas, causadas por resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas. Jorgensen e colaboradores (2004) relataram que a resistência aos macrolídeos em estafilococos pode ser devido a modificação do alvo ribossomal e está associada com o fenótipo de resistência macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B e a resistência pode ser constitutiva ou induzida após a exposição ao macrolídeo. Segundo o CLSI (2008) o uso da clindamicina no tratamento de infecções por estafilococos pode resultar em fracasso terapêutico devido o fenótipo induzível de resistência, onde ocorre expressão da resistência durante o tratamento. Neste caso, os isolados devem ser reportados como resistentes. Esta resistência induzível à clindamicina pode ser detectada pela colocação do disco de clindamicina a uma distância de 15 a 26 mm do disco de eritromicina. No presente trabalho não foi detectada resistência induzível a clindamicina.

Em relação à associação de sulfametoxazol-trimetoprim foi detectada 100% de sensibilidade nos isolados de ECN. No entanto, Corrêa (2003) e Machado e colaboradores (2008) detectaram 75,79% (n=95) e 52,2% (n=57) de sensibilidade em isolados de estafilococos provenientes de leite mastítico.

Em relação aos aminoglicosídeos, foi detectado 85% de sensibilidade a gentamicina nos isolados testados. Nader Filho e colaboradores (2000) detectaram 94,6% (n=72) de sensibilidade em isolados de estafilococos. Da mesma forma, Langoni e colaboradores (2000) relataram que a gentamicina foi o antimicrobiano com maior ação *in vitro* sobre *S. aureus* e afirma ser este um antibiótico eficaz no tratamento das mastites bovinas de origem estafilocócica. Neves e colaboradores (2007) relataram 96% (n=50) de sensibilidade em isolados de estafilococos provenientes da glândula mamária de vacas lactantes sadias. Resultados semelhantes foram demonstrados por Gentilini et al. (2002) que relataram ser a gentamicina um fármaco eficaz no tratamento das mastites por ECN. No entanto, resultados discordantes foram demonstrados por Archer; Scott (1991) que detectaram 40% (n=208) de sensibilidade em isolados de ECN a partir de várias fontes clínicas e Cunha; Lopes (2002) que detectaram 29,1% (n=60) de isolados de ECN sensíveis ao fármaco. Segundo estes autores, os ECN transportam genes que codificam enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, assim como o *S. aureus*.

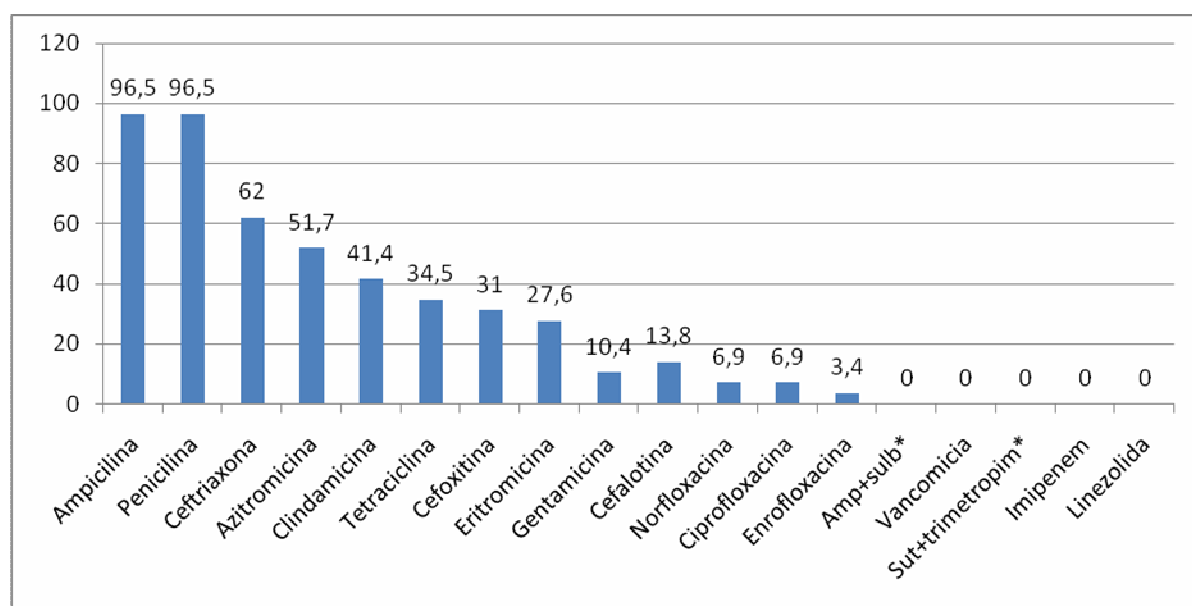
No presente trabalho foi detectado 36% de sensibilidade à tetraciclina. Resultados contrastantes foram demonstrados por Santos e colaboradores (2006) que detectaram 93,4% (n=30) de sensibilidade em isolados de estafilococos provenientes de leite mastítico. Da mesma forma, Bernardi e colaboradores (2007) detectaram 92,5% (n=27) de sensibilidade em isolados clínicos de ECN. A baixa sensibilidade à tetraciclina detectada no presente estudo, pode estar associada ao fato deste fármaco ser utilizado na água do rebanho como medida profilática, tendo como objetivo a redução de infecções (BOOTH, 1992).

5.2.1. Resistência à oxacilina

5.2.1.1 *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos resistentes à oxacilina

Dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, um total de 29% (29/100) apresentou resistência à oxacilina pela técnica da difusão em disco simples, sendo 13,8% (4/29) dos isolados positivos para o gene *mecA*. O gráfico 2 apresenta os percentuais de resistência dos isolados resistentes à oxacilina frente aos antibióticos testados.

Gráfico 2. Gráfico apresentando o percentual de resistência dos *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos resistentes à oxacilina isolados de mastite bovina aos diferentes antibióticos testados através da técnica de difusão em disco.



*Amp+sulbactam – ampicilina+sulbactam; Sut+trimetropim – sulfametoxazol-trimetropim.

Estes isolados demonstraram 96,5% (28/29) de resistência à penicilina e ampicilina e baixos índices de resistência à gentamicina, cefalotina, norfloxacinina, ciprofloxacina e enrofloxacinina. A associação de ampicilina+sulbactam, vancomicina, sulfametoxazol+trimetropim e linezolida foram eficazes frente a estes. Resultados similares foram encontrados por Ferreira e colaboradores (2003), onde isolados de estafilococos coagulase-negativos demonstraram baixos níveis de resistência à gentamicina, vancomicina e teicoplanina, com exceção apenas à penicilina. No entanto, apesar dos baixos índices de resistência detectada, esta provavelmente está associada ao uso incorreto de antibióticos, resultando no fenômeno da resistência tanto na medicina veterinária quanto na humana.

5.2.1.2 Resistência fenotípica à oxacilina versus detecção do gene *mecA*

Para a triagem da resistência à oxacilina o teste de disco-difusão é o mais utilizado. No entanto, várias metodologias estão sendo desenvolvidas e outras modificadas para aumentar a detecção de isolados verdadeiramente resistentes à oxacilina. Entre estas metodologias, destaca-se o teste de difusão em disco modificado pela adição de NaCl, o método de microdiluição em ágar e em caldo para determinação da CIM e o teste do ágar screen (HUSSAIN et al., 2001).

De acordo com os resultados dos cinco testes fenotípicos de avaliação da suscetibilidade à oxacilina realizados, os isolados apresentaram 15 perfis de suscetibilidade (tabela 4), confirmando a heterogeneidade da resistência dos *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos à oxacilina.

Tabela 4. Perfis de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos nos distintos testes fenotípicos.

Perfis (nº de isolados)	Testes				
	DD* (1µg) R≤13mm	DM* (1µg) R≤13mm	AS* 6µg/mL	MP* R≥4µg/mL	MC* R≥4µg/mL
1 (40)	S*	S	S	S	R
2 (11)	S	S	S	S	S
3 (9)	S	R	R	S	S
4 (8)	R*	S	R	R	R
5 (7)	S	R	S	S	R
6 (6)	R	R	R	R	R
7 (5)	R	S	R	S	R
8 (4)	R	R	S	R	R
9 (2)	S	R	S	R	R
10 (2)	R	R	R	S	R
11 (2)	R	S	S	S	S
12 (1)	S	R	R	R	R
13 (1)	S	R	S	S	S
14 (1)	R	S	S	S	R
15 (1)	R	R	S	S	R

* DD: difusão em disco, DM: difusão em disco modificada, AS: ágar “screen”, MP: microdiluição em placa, MC: microdiluição em caldo. S - Sensível, R - Resistente.

A detecção da resistência à oxacilina através de métodos fenotípicos em isolados de *Staphylococcus* spp. tem sido dificultada devido ao fenômeno da heteroresistência, onde duas populações, sensível e resistente, existem em uma mesma cultura. Segundo Lowy (2003), toda população bacteriana heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma. Cada isolado de *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina apresenta um perfil característico da proporção de células que crescem na presença de concentrações específica de oxacilina e de diferentes condições ambientais. Tal idéia é corroborada com os estudos de Aarestrup e colaboradores (2001) que relataram que o fenótipo da heteroresistência pode estar relacionado com a temperatura e tempo de incubação, tamanho do inóculo e presença de NaCl, assim como induzida pelos próprios antimicrobianos beta-lactâmicos. E um fenótipo menos freqüente é a resistência homogênea, onde toda a população de células é altamente resistente. De acordo com o CLSI, o uso adicional de sal no meio de cultura tem sido utilizado para aumentar a acurácia na detecção da resistência a oxacilina. No entanto, outros pesquisadores apontam para uma elevada freqüência de alterações na seqüência gênica do sistema *mec*, incluindo deleções, mutações e transposições o que inviabilizaria sua confiabilidade como marcador de resistência (PETINAKI et al., 2001; ROSATO et al., 2003).

No presente trabalho, o gene *mecA* foi detectado em apenas 13,8% (4/29) dos isolados de ECN resistentes à oxacilina, representados por *Staphylococcus xylosus*. Dos isolados resistentes à

oxacilina, 6 foram resistentes nos diferentes testes fenotípicos à oxacilina, incluindo os 4 isolados *mecA* positivos. Os testes fenotípicos de detecção de resistência à oxacilina são avaliados quanto à sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativos e positivos, considerando a positividade para o gene de resistência *mecA*, o isolado deveria apresentar-se resistente. Como a taxa de detecção do gene *mecA* foi baixa, não foi possível correlacionar sua presença com a sensibilidade e especificidade dos testes.

Segundo os resultados obtidos após a análise estatística (anexo 2), utilizando o programa R, com um intervalo de confiança de 95%, os testes de difusão em disco simples, difusão em disco modificada, ágar screen e microdiluição em ágar apresentaram correlação estatística com a presença do gene *mecA* em isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos. Porém o método de microdiluição em caldo não apresentou correlação entre o perfil fenotípico de resistência e a detecção do gene *mecA*.

Entre todas as penicilinas penicilinase-estáveis, a oxacilina, durante anos foi a preferida para testes *in vitro* utilizando a difusão em disco. Estudos demonstram acurácias variadas com diferentes testes fenotípicos de resistência à oxacilina provavelmente devido à ocorrência do fenômeno da heterorresistência (FELTEN et al., 2002; POTTUMARTHY et al., 2005; SWENSON et al., 2005; MIMICA et al., 2007).

Isolados de estafilococos resistentes à oxacilina devem ser relatados como também resistentes a outros beta-lactâmicos, visto que o mecanismo de resistência é o mesmo e os testes *in vitro* com esses antimicrobianos têm menor acurácia como preditivos da presença do gene *mecA* do que os testes com oxacilina ou ceftoxitina (VELASCO et al., 2005; CLSI, 2008).

A difusão em disco simples e a difusão em disco modificada são técnicas de fácil execução, rápidas e de baixo custo.

A literatura aponta que a técnica do ágar screen (figura 2) suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina pode ser utilizado para detecção da resistência com boa acurácia (FELTEN et al., 2002; SHARP et al., 2005; MIMICA et al., 2007), sendo portanto recomendada pelo CLSI. Trata-se de um teste simples e econômico quando comparado aos testes de avaliação da concentração inibitória mínima, mas que deve ser executado de forma cuidadosa, onde cada colônia crescida, mesmo que pequena, deve ser considerada resistente.



Figura 2. Técnica de ágar screen. A seta indica colônia crescida em meio contendo oxacilina (6µg/mL).

A técnica da microdiluição em caldo foi a técnica menos específica (10%). Esta baixa especificidade provavelmente pode estar relacionada ao fato que a leitura deste teste se faz através da turbidez e esta pode ser subjetiva, sendo, portanto, uma prova que considera muitos isolados falso-positivos.

Em relação à técnica de microdiluição em ágar, Ferreira e colaboradores (2002) e Rowe e colaboradores (2002) relataram ser o teste de maior acurácia na detecção da resistência à oxacilina e consideraram esta técnica mais acurada que a difusão em disco, apresentando fácil interpretação.

5.2.1.3 Resistência à cefoxitina versus *mecA*

De igual modo, o baixo percentual de isolados *mecA* positivos não permitiu correlacionar sua presença com a sensibilidade dos testes de difusão em disco com cefoxitina. Segundo os resultados obtidos após a análise estatística, utilizando o programa R, com um intervalo de confiança de 95%, os testes de difusão em disco simples com oxacilina e cefoxitina apresentaram correlação estatística com a presença do gene *mecA* em isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos.

De acordo com o CLSI (2007), a detecção fenotípica da resistência a cefoxitina e oxacilina em ensaios de difusão em disco representam métodos confiáveis para predição da presença do gene *mecA* em estafilococos coagulase-negativos. No entanto, a cefoxitina por apresentar maior especificidade e sensibilidade equivalente a oxacilina tem sido preferencialmente recomendada como predição da presença do gene *mecA* por ser um forte indutor de seu sistema regulatório. Estudos têm relatado maior eficácia em testes de difusão em disco com cefoxitina correlacionado com a presença do gene *mecA*, em relação ao uso da oxacilina (SWENSON et al., 2005). A cefoxitina induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica (DANCER, 2001).

A melhor maneira de determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados à cefoxitina é através da técnica da difusão em disco e/ou microdiluição em caldo enquanto que para a oxacilina é o teste da CIM. O teste com disco de cefoxitina, quando comparado com os testes de CIM com oxacilina, possui idêntica sensibilidade, mas maior especificidade, sendo, portanto mais preciso na identificação da resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus*.

5.2.1.4 Detecção dos genes regulatórios do sistema *mec* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Após a realização dos testes fenotípicos de detecção da resistência à oxacilina, os isolados foram avaliados quanto à presença dos genes *mecA*, *mecI* e *mecR1* (tabela 5; figura 3) através da técnica de PCR.

Tabela 5. Prevalência dos genes envolvidos na expressão da resistência à oxacilina nos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Genes	Percentual
<i>MecA</i>	4%
<i>mecI</i>	47%
<i>mecR1</i>	4%

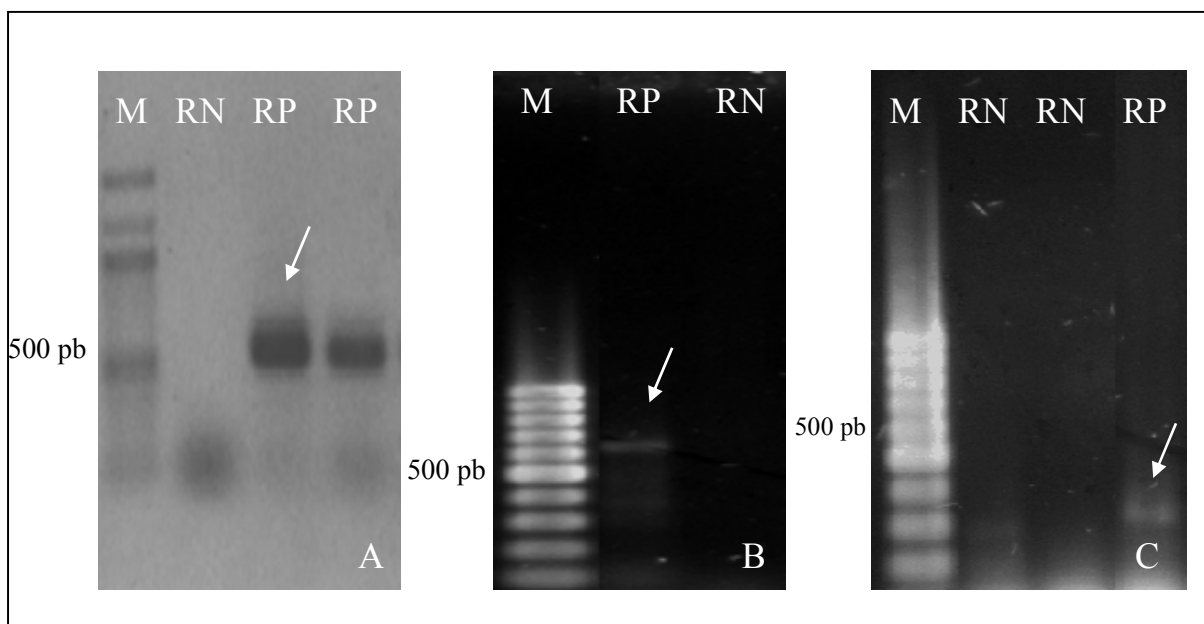


Figura 3. Perfil eletroforético dos genes de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina em gel de agarose 1,5% (isolado positivo indicado pela seta). **A:** fragmento do gene *mecA* (639pb). **B:** fragmento do gene *mecI* (639 pb). **C:** fragmento do gene *mecR1* (234pb). M: marcador de peso molecular (100pB), RN: Reação negativa, RP: reação positiva.

O gene *mecA* foi detectado em apenas 4% (4/100) dos isolados, sendo representado por *S. xylosus*. Estudos apontam que isolados resistentes à oxacilina em diferentes testes fenotípicos podem não apresentar o gene *mecA*, podendo este fato ser explicado por outros mecanismos de resistência como a hiperprodução de beta-lactamases (MARTINEAU et al., 2000; BROWN, 2001; McKINNEY et al., 2001) e modificação da afinidade de outras “PBPs”. Segundo Petinaki e colaboradores (2001), a PBP3 é a principal proteína envolvida neste caso de resistência.

Griethuysen e colaboradores (2005) relataram a perda do gene *mecA* em isolados de *Staphylococcus* spp. mantidos sob congelamento, onde esta perda estava diretamente relacionada ao tempo de estocagem. No presente trabalho, as amostras de leite coletadas foram mantidas sob refrigeração e enviadas ao laboratório de Bacteriologia. Devido ao elevado número de amostras coletadas, estas foram congeladas para posterior análise. Num primeiro momento, os isolados de ECN obtidos a partir destas amostras foram submetidos à rotina de identificação e aos ensaios de detecção fenotípica de resistência à oxacilina. O DNA destes isolados foi extraído somente após a realização de todos os testes fenotípicos, o que poderia ser uma explicação para a baixa taxa de detecção. No entanto, a elevada taxa de detecção do gene *mecI*, pertencente ao cassete *SCCmec* torna esta hipótese pouco provável.

Silva (2008) propõe o uso de antimicrobiano em baixa concentração no meio de cultivo visando à manutenção de determinantes genéticos que podem ser perdidos durante o cultivo sem pressão seletiva. No presente estudo, foram realizados subcultivos com concentrações subinibitórias de oxacilina antes da extração do material genético, não acarretando aumento na taxa, ou qualquer variação na detecção do gene *mecA*.

Outra possibilidade é o fato do gene *mecA* estar contido num elemento genético móvel, denominado *SCCmec* o qual possui genes adicionais para resistência antimicrobiana e outros genes que codificam enzimas com diversas funções e seqüências de inserção, como também genes de funções desconhecidas. Os genes regulatórios do complexo *mec* podem estar íntegros ou truncados e esta característica pode estar associada pelo movimento ou inclusão de seqüências de inserção (LOWY, 2003). Recentemente, com vistas ao incremento da detecção do gene *mecA*, outros *primers* vem sendo testados, os quais não foram utilizados neste experimento (SCHUENCK et al., 2008; PEREIRA et al., 2009).

Wada e colaboradores (1991) aponta para o fato de que uma transposição intramolecular de IS431 seja responsável pela supressão do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina. Segundo estes autores o gene *mecA* foi excluído em todos os 7 subclones sensíveis à metilicina avaliados, e o tamanho da deleção variou de 20-100 kilobases dependendo de cada subclone. Em seis dos sete subclones, no entanto, a supressão foi confinada ao IS431. Desse modo, é provável que diversos fatores possam estar envolvidos com a expressão variável do gene *mecA* levando a resultados contrastantes quando comparados com os testes fenotípicos de resistência à oxacilina, apontando para a necessidade de novos estudos a fim de elucidar questões a respeito da presença do gene *mecA* e a regulação do complexo *mec*.

O gene *mecI* foi detectado em 47% (47/100) dos isolados, sendo considerado positivo o isolado que amplificou para ao menos um dos genes avaliados (*mecI* 1:639pb; *mecI* 2: 348pb). Destes, 2 isolados apresentaram o gene *mecA* (2/47), correspondendo a 4,25% dos isolados *mecI* positivos. O gene *mecRI* foi detectado em 4% (4/100) dos isolados de estafilococos, os quais foram *mecA* positivos. Em 2% (2/100) dos isolados foram detectados todos os genes do sistema *mec* (*mecA-mecI-mecRI*) sendo este fenotipicamente resistentes à oxacilina. No trabalho desenvolvido por Rosato e colaboradores (2003) o gene *mecI* foi detectado em 76,7% (56/73) dos isolados de estafilococos resistentes à oxacilina e todos os isolados positivos para a presença do gene *mecI* apresentaram também os genes *mecA* e *mecRI*. Segundo estes autores, os outros 17 isolados de estafilococos resistentes à oxacilina apresentaram deleções nos genes *mecI* e *mecRI*. Petinaki e colaboradores (2001) após a realização do sequenciamento do sistema *mec* de ECN relataram que de um total de 76 isolados, a deleção do gene *mecRI* foi detectada em 21% (16/76) dos isolados e no gene *mecI* em 1,3% (1/76) dos isolados.

Com base na análise das seqüências dos genes *mecI* e *mecRI* tem sido observada elevada freqüência de mutações e deleções destes genes em isolados de estafilococos. Este fato está associado com a expressão variável do sistema *mec*. Provavelmente estas deleções e mutações tem contribuído para resultados contrastantes entre os testes fenotípicos de resistência à oxacilina com a predição do gene *mecA* (SUZUKI et al., 1993; WELLER et al., 1999; ROSATO et al., 2003).

Segundo Katayama e colaboradores (2001) são reconhecidas cinco classes do complexo *mec* e a literatura aponta para o fato de que mudanças nos genes do sistema regulatório *mec* podem ser desencadeadas por mutações, plasmídeos, fagos e transposons gerando perfis genéticos diferenciados. A classe A do complexo *mec* contém os genes *mecRI* e *mecI* intactos. A classe B, contém o gene *mecI* e o domínio citoplasmático do gene *mecRI* truncados por um IS1272. A classe C é dividida em C1 e C2. Na porção C1, o domínio citoplasmático do gene *mecRI* e todo o gene *mecI* estão truncados pela IS431 e em C2 tanto o domínio transmembrana quanto o citoplasmático do gene *mecRI* e todo o gene *mecI* estão truncados por um IS43. Na classe D o gene *mecI* está deletado e o domínio transmembrana do *mecRI* está truncado por um IS431. É possível que as discrepâncias na detecção do complexo *mec* no presente trabalho sejam por conta de sua diversidade de classes. Os isolados avaliados podem ter sofrido deleções ou

mutações no sistema *mecRI* e *mecI*, sendo necessária a realização do sequenciamento do *SCCmec* a fim de constatar se tais fenômenos ocorreram.

A tabela 6 apresenta os perfis de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos e o perfil dos genes regulatórios do sistema *mec* encontrados nos isolados *mecA* positivos.

Tabela 6. Perfil de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos e detecção dos genes do sistema regulatório *mec* em isolados de *Staphylococcus xylosus mecA* positivos.

Perfis (n° de isolados)	Difusão em Disco					Genes	
	Oxa*	Cef	Pen	Amp	Amp+Sulb	<i>mecI</i>	<i>mecRI</i>
1 (2)	R*	R	R	R	S*	-	+
2 (2)	R	R	R	R	S	+	+

*Oxa: oxacilina; Cef: cefoxitina; Pen: penicilina; Amp: ampicilina; Amp+sulb: ampicilina+sulbactam; R: resistente; S: sensível;

Dos quatro isolados *mecA* positivos, 50% (2/4) dos isolados não apresentaram o gene *mecI* e foram resistentes à oxacilina, cefoxitina, penicilina e ampicilina. Estes dados corroboram com trabalhos desenvolvidos por Katayama e colaboradores (2001) que relataram a não detecção do gene *mecI* em isolados resistentes à oxacilina e *mecA* positivos. O complexo *mec* apresenta dois genes, os quais são responsáveis pela regulação do gene *mecA*. O *mecRI* possui atividade antirepressora, enquanto que o *mecI* codifica um repressor da transcrição *mecA*. Na ausência de indução através do *mecRI* por um beta-lactâmico a transcrição do *mecA* está fortemente reprimida pelo *mecI* (ARCHER et. al., 1995; LOWY, 2003). Neste caso, é provável que a atividade repressora do gene *mecI* tenha sido alterada levando a uma transcrição do gene *mecA*.

O complexo *mec* (*mecRI*, *mecI* e *mecA*) foi detectado em 2% (2/100) dos isolados, sendo este resistente aos antimicrobianos testados, com exceção da associação de penicilina+sulbactam. Estes dados são discordantes com relatos da literatura, onde Dickinson; Archer (2000) relataram que isolados de ECN que possuem o complexo *mec* (*mecRI*, *mecI* e *mecA*) são denominados estafilococos coagulase-negativos pré-resistentes à oxacilina, pois estes apesar de apresentarem o gene marcador de resistência à oxacilina, são sensíveis a este antimicrobiano devido ao produto do *mecI* estar intacto e fortemente reprimido pela expressão do *mecA*.

A tabela 7 apresenta os diferentes perfis encontrados nos isolados de estafilococos coagulase-negativos quando avaliados em relação à resistência à oxacilina e cefoxitina pela difusão em disco simples e a presença dos genes regulatórios do sistema *mec*.

Tabela 7. Perfil dos testes fenotípicos de detecção de resistência à oxacilina e cefoxitina e genes do sistema regulatório *mec* em isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.

Perfil (n° de isolados)	Antibióticos		Genes			Espécies
	Oxa*	Cef*	<i>mecA</i>	<i>mecI</i>	<i>mecRI</i>	
1 (38)	S	S	-	-	-	<i>S. xylosus</i>
2 (33)	S	S	-	+	-	<i>S. xylosus</i> (18); <i>S. capitis</i> (7); <i>S. cohnii</i> (4) <i>S. haemolyticus</i> (3);
3 (10)	R	S	-	-	-	<i>S. hominis</i> (8); <i>S. cohnii</i> (4)
4 (8)	R	S	-	+	-	<i>S. xylosus</i> (6); <i>S. haemolyticus</i> (2)
5 (4)	R	R	-	+	-	<i>S. xylosus</i>
6 (3)	R	R	-	-	-	<i>S. cohnii</i> (2); <i>S. xylosus</i> (1)
7 (2)	R	R	+	-	+	<i>S. xylosus</i>
8 (2)	R	R	+	+	+	<i>S. xylosus</i>

*S: sensível; R: resistente.

Um total de 71 isolados apresentou perfil de sensibilidade à oxacilina e cefoxitina e ausência do gene *mecA*. Este é um achado importante que reporta que nestes isolados de estafilococos coagulase-negativo provenientes de mastite bovina a resistência à oxacilina não se encontrou de forma disseminada.

5.2.1.5 Produção de beta-lactamases versus resistência à penicilina, ampicilina e ampicilina+sulbactam versus genes *blaZ*, *blaI* e *blaRI*

Dos isolados avaliados, 79% (79/100) apresentaram resistência à penicilina e ampicilina, não tendo sido detectada resistência à ampicilina+sulbactam. A detecção da produção de beta-lactamases através da fita com substrato cromogênico (PROBAC) foi detectada nos 100 isolados avaliados, incluindo os 21% sensíveis. Um total de 16% (16/100) dos isolados foi positivo para a produção de beta-lactamases através do teste do nitrocefim, sendo todos resistentes à penicilina e ampicilina. Entre os isolados negativos neste teste (84/100), 63 foram resistentes à penicilina e ampicilina e 21 isolados foram sensíveis.

Rehder (2006) relata que a resistência à penicilina entre os estafilococos coagulase-negativos, mediada pela produção de beta-lactamase, não foi eficientemente detectada pelo disco de nitrocefim. Já Haveri e colaboradores (2005) relatam que a produção de beta-lactamases em conjunto aos testes de suscetibilidade pode ser utilizada como método rápido de detecção de

resistência aos beta-lactâmicos, principalmente à penicilina. Portanto, no presente trabalho este teste foi avaliado quanto a sua especificidade (100%) e sensibilidade (100%) considerando o gene *blaZ*, relacionado à produção de beta-lactamase. Todos os isolados foram submetidos à detecção deste gene em adição ao *blaI* e *blaR1* através da técnica de PCR.

Um total de 16%, 21% e 5% dos isolados foi positivo para os genes *blaZ*, *blaI*, *blaR1* (figura 4), respectivamente. Diferentes seqüências foram utilizadas para os genes *blaZ* e *blaI*, sendo considerado positivo o isolado que amplificou para ao menos um dos genes avaliados.

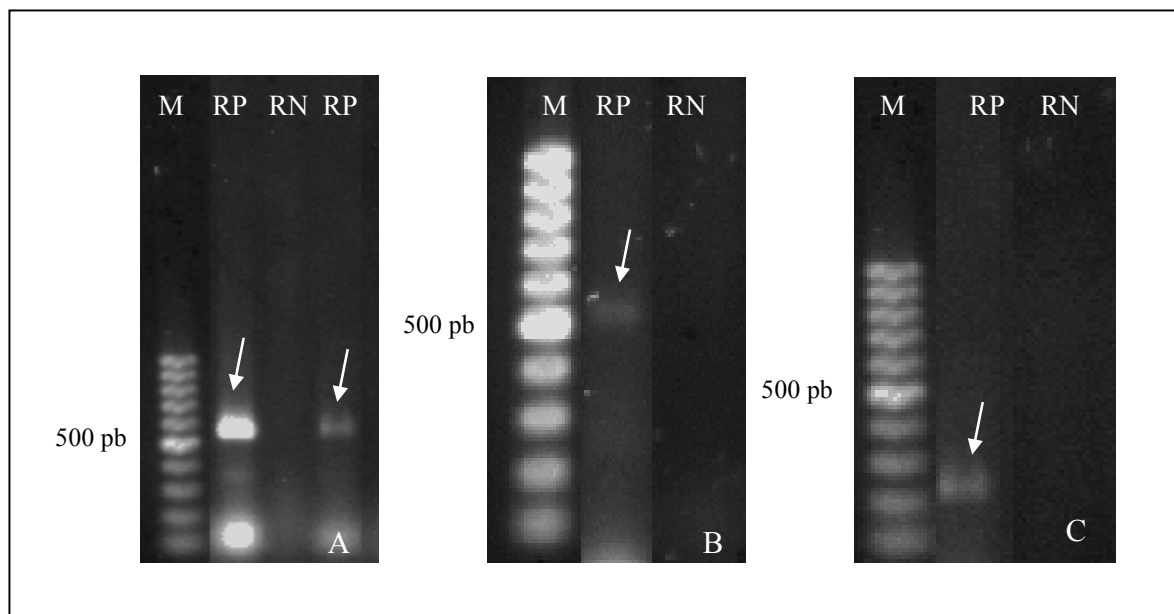


Figura 4. Perfil eletroforético dos genes envolvidos na resistência aos beta-lactâmicos pela produção de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina em gel de agarose 1% (isolado positivo indicado pela seta). **A:** fragmento do gene *blaZ*(1) - 639pb. **B:** fragmento do gene *blaI* - 513 pb. **C:** fragmento do gene *blaR1* - 209 pb. M: marcador de peso molecular (100pB), RN: Reação negativa, RP: reação positiva.

A tabela 8 apresenta os perfis de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos, a produção de beta-lactamases pelo teste do nitrocefim e a presença dos genes reguladores da produção de beta-lactamase encontrada.

Tabela 8. Perfis de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos, produção de beta-lactamases e a presença de genes reguladores da produção de beta-lactamase dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos provenientes de mastite bovina.

Perfil (n° de isolados)	Antibióticos				Genes			Espécies
	Pen*	Amp*	Amp+ Subb*	Teste do Nitrocefim	<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaRI</i>	
1 (63)	R*	R	S*	-	-	-	-	<i>S. xylosus</i> (47); <i>S. cohnii</i> (8); <i>S. hominis</i> (8)
2 (18)	S	S	S	-	-	+	-	<i>S. xylosus</i> (9); <i>S. capitis</i> (7); <i>S. cohnii</i> (2)
3 (11)	R	R	S	+	+	-	-	<i>S. xylosus</i> (9); <i>S. haemolyticus</i> (2)
4 (3)	S	S	S	-	-	-	-	<i>S. haemolyticus</i>
5 (3)	R	R	S	+	+	+	+	<i>S. xylosus</i>
6 (2)	R	R	S	+	+	-	+	<i>S. xylosus</i>

*Pen: Penicilina; Amp: ampicilina; Amp+subb: ampicilina+sulbactam; R: resistente; S: sensível.

Um total de 16 isolados (16%) foi positivo para o gene *blaZ*, resistentes à penicilina e ampicilina e positivos no teste de nitrocefim, sendo *S. xylosus* prevalente com 14 isolados (87,5%). Pitkala e colaboradores (2009) relataram boa correlação entre o teste de detecção de beta-lactamases através de discos de nitrocefim e a técnica de PCR para detecção do gene *blaZ*. No presente trabalho, o teste do nitrocefim demonstrou correlação com a presença do gene *blaZ*, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade. Foi detectado somente o gene *blaZ* em 11% (11/100), 2 isolados (2%) apresentaram os genes *blaZ* e *blaRI*, e 3 isolados (3%) apresentaram todos os genes do sistema *bla* (*blaZ*, *blaI* e *blaRI*). Outros 63 isolados (63%) negativos para o gene *blaZ* também apresentaram resistência à ampicilina e penicilina.

A tabela 9 correlaciona os dados da resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos com a presença dos genes dos sistemas regulatórios de produção de beta-lactamases (*bla*) e de PBP2a (*mec*).

Tabela 9. Perfis de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos, produção de beta-lactamases e a presença de genes reguladores da produção de beta-lactamase e PBP2a dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos provenientes de mastite bovina.

Perfil (n° de isolados)	Antibióticos					Teste do Nitrocefim	Genes					
	Pen*	Amp*	Amp+ Subl*	Oxa*	Cef*		<i>blaZ</i>	<i>blaI</i>	<i>blaR1</i>	<i>mecA</i>	<i>mecI</i>	<i>mecR1</i>
1 (33)	R*	R	S*	S	S	-	-	-	-	-	+	-
2 (20)	R	R	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
3(10)	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-
4 (10)	R	R	S	R	S	-	-	-	-	-	-	-
5 (8)	S	S	S	R	S	-	-	+	-	-	+	-
6 (4)	R	R	S	R	R	+	+	-	-	-	+	-
7 (3)	R	R	S	S	S	+	+	-	-	-	-	-
8 (3)	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
9 (3)	R	R	S	R	R	+	+	+	+	-	-	-
10 (2)	R	R	S	S	S	+	+	-	-	-	-	-
11 (2)	R	R	S	R	R	+	+	-	-	+	-	+
12 (2)	R	R	S	R	R	+	+	-	+	+	+	+

* Pen: penicilina; Amp: ampicilina; Amp+subl: ampicilina+sulbactam; Oxa: oxacilina; Cef: cefoxitina; S: sensível; R: resistente.

Dos 16 isolados positivos para o gene *blaZ*, 4 (25%) foram *mecA* positivos, sendo todos resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos avaliados, com exceção da associação de ampicilina+sulbactam. Neste caso, no perfil 11, não é possível distinguir se a resistência estaria associada à produção de PBP2a mediada pelo gene *mecA* e/ou a produção de beta-lactamases detectada pelo nitrocefim. Já no perfil 12, segundo Dickinson; Archer (2000) isolados de estafilococos que possuem o complexo *mec* (*mecR1*, *mecI* e *mecA*) são sensíveis à oxacilina devido ao produto do *mecI* estar intacto e fortemente reprimido pela expressão do *mecA*. Neste caso, o mecanismo de resistência envolvido é a produção de beta-lactamases. Foi detectado apenas o gene *mecI* em outros 4 isolados *blaZ* positivos, também resistentes a penicilina e ampicilina, indicando a produção de beta-lactamases como possível mecanismos.

No conjunto avaliado, 79 isolados apresentaram resistência a penicilina e ampicilina, e apenas 16 (20,2%) foram *blaZ* positivos, incluindo entre estes, os 4 isolados *mecA* positivos. Nos demais 63 isolados (79,8%) não foi possível identificar através da análise genética um provável mecanismo de resistência. Tal fato pode ser explicado por outros mecanismos não avaliados neste trabalho, mas também cabe analisar a baixa positividade detectada para o gene *blaZ* a semelhança do ocorrido com o gene *mecA*. Haveri e colaboradores (2005) relata que diferentes beta-lactamases podem ser encontradas em isolados de *Staphylococcus* spp. e estas modificações podem estar localizadas no sítio de anelamento do *primer*, podendo comprometer a amplificação. Outra hipótese é proposta por Olsen e colaboradores (2006) que relatam a diversidade do gene *blaZ* em isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos provenientes de mastite bovina e apontam para a possibilidade que diferentes espécies de estafilococos presentes em um mesmo microambiente possam trocar genes *blaZ*. Este autor avaliou cinco seqüências distintas de *primers* para a amplificação do gene *blaZ* e ao analisar 143 isolados resistentes à penicilina,

somente dois pares de *primers* obtiveram 100% de positividade enquanto que um par de *primer* não amplificou nenhum isolado.

Segundo Rehder (2006), estafilococos com fenótipo e genótipo discrepantes quanto à resistência aos beta-lactâmicos pode estar associado com a presença do gene repressor *blaI* ou devido a deleções ou mutações nos genes regulatórios do complexo *bla*. Além disso, o gene *blaZ* pode estar localizado em elementos móveis como plasmídeos podendo estes genes estar íntegros ou truncados. Esta característica pode estar associada pelo movimento ou inclusão de seqüências de inserção.

Olsen e colaboradores (2006) ao avaliarem 143 isolados de estafilococos resistentes à penicilina, detectaram o gene *blaR1* (209pb) em todos os isolados, no entanto, ao avaliar uma seqüência distinta de *primers*, o gene *blaR1* não foi detectado. Este relato aponta para a importância do estudo de seqüências mais confiáveis para confecção dos *primers*. Possivelmente, a baixa taxa de *blaR1* detectada no presente estudo pode estar associada com a seqüência do *primer* utilizada. Outra possibilidade é o fato do gene *blaR1* ter sofrido deleção ou mutação como relatada por Rosato e colaboradores (2003). Logo, o seqüenciamento genético se faz necessário para avaliar tais fenômenos.

5.2.1.6 *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos e o gene *femA*

No presente trabalho não foi detectada a presença do gene *femA* nos 100 isolados avaliados. O gene *femA* tem sido relatado como marcador específico de *S. aureus*. Este gene codifica fator essencial para a resistência a meticilina e está universalmente presente em todas as cepas de *S. aureus* (MEHROTA et al., 2000).

5.3 Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

5.3.1 Produção de “slime” pela técnica do ágar Vermelho Congo versus genes *icaA* e *icaD*

Estudos relatam que estafilococos coagulase-negativos podem produzir uma substância extracelular, denominada “slime”, durante seu crescimento sobre superfícies inertes, como biomateriais, facilitando a aderência e a formação do biofilme, podendo ser considerado um marcador de patogenicidade associado à virulência dos ECN (CHRISTENSEN et al., 1982; COSTERTON et al., 1995; VUONG; OTTO, 2002).

No presente estudo, dos 100 isolados avaliados quanto à produção de “slime”, 46% (n=46) foram produtores através técnica do ágar Vermelho Congo (figura 5), sendo todos identificados como *S. xyloso*. Este meio de cultura permite observar as modificações fenotípicas das colônias de *Staphylococcus* spp, onde colônias produtoras de “slime” apresentam cor negra e as não produtoras cor vermelha. Resultados semelhantes foram demonstrados por Fox e colaboradores (2005) ao estudarem a formação de biofilmes em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite, onde a presença de “slime” foi detectada em 41% (48/117) dos isolados.

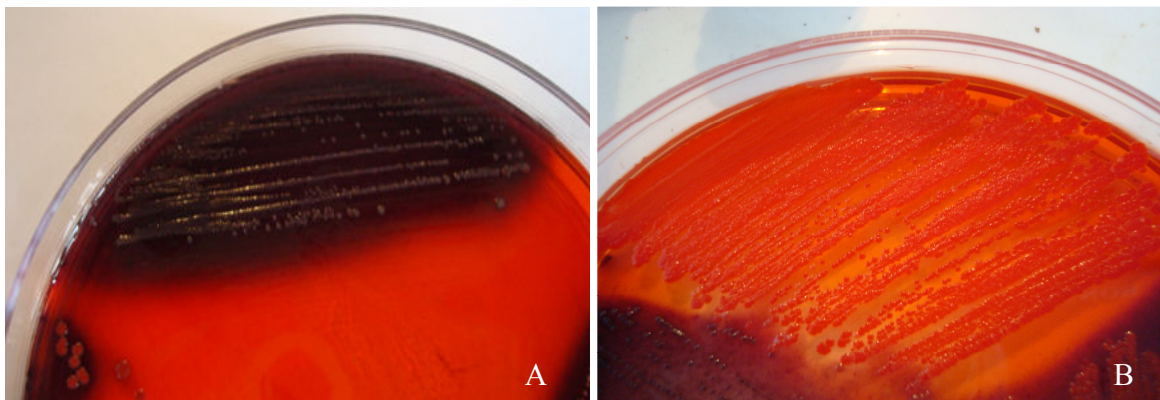


Figura 5. Colônias de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina crescidas em ágar Vermelho Congo. **A:** Colônia produtora de “slime” (negra); **B:** Colônia negativa para a produção de “slime” (vermelha).

Turkyilmaz; Eskimirliler (2006) ao avaliarem a produção de “slime” em 180 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de diversas fontes clínicas, detectaram 61,1% de positividade usando esta mesma técnica e Vasudevan e colaboradores (2003) detectaram uma produção mais elevada (91,4%) em 35 *S. aureus* avaliados provenientes de vacas com quadro de mastite.

Um dos fatores limitantes desta técnica é que somente  possível fazer uma avaliação qualitativa e não quantitativa das características das colônias, tornando a prova subjetiva, uma vez que existem inúmeras variações de coloração que podem ocorrer desde a cor preta até a vermelha. No presente trabalho, dos isolados positivos (46/100) para a produção de “slime”, 36 isolados apresentaram colônia negras e 10 colônias cinza, sendo, portanto, consideradas como positivas, segundo a leitura deste teste proposta por Arciola e colaboradores (2001) (tabela 10). A literatura aponta que a formação de “slime” por *Staphylococcus* spp. está associada com a presença de ambos os genes *icaA* e *icaD* (figura 6) (BERNARDI et al., 2005; FOX et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006). No entanto, no presente trabalho esta associação não foi encontrada, pois nenhum isolado apresentou os dois genes. A presença dos genes *icaA* e *icaD* foi detectada em 9% (9/100) e 10% (10/100) dos isolados produtores de “slime” através desta técnica, respectivamente. A sensibilidade (100%) e especificidade (67%) desta técnica foram calculadas considerando positivo o isolado que apresentou o gene *icaA* ou *icaD*, uma vez que não foram detectados ambos os genes em um mesmo isolado.

Tabela 10. Presença dos genes de produção de “slime” e característica de coloração em ágar vermelho congo em 100 *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina.

Genes*		Vermelho Congo	Nº isolados (%)
<i>icaA</i>	<i>icaD</i>		
-	-	Vermelho	54
-	-	Preto	24
-	+	Preto	6
+	-	Preto	6
-	+	Cinza	4
+	-	Cinza	3
-	-	Cinza	3

* -: negativo; +: positivo.

Segundo Arciola e colaboradores (2001) nem sempre é possível correlacionar a presença de ambos os genes com a produção de “slime”, podendo detectar apenas a presença de um único gene e a colônia apresentar coloração negra. Uma das explicações aventadas para este fato é a não expressão dos genes destes isolados nas condições as quais foram submetidos, sendo possivelmente necessária uma maior concentração de açúcar no ágar vermelho congo ou maior tempo de incubação.

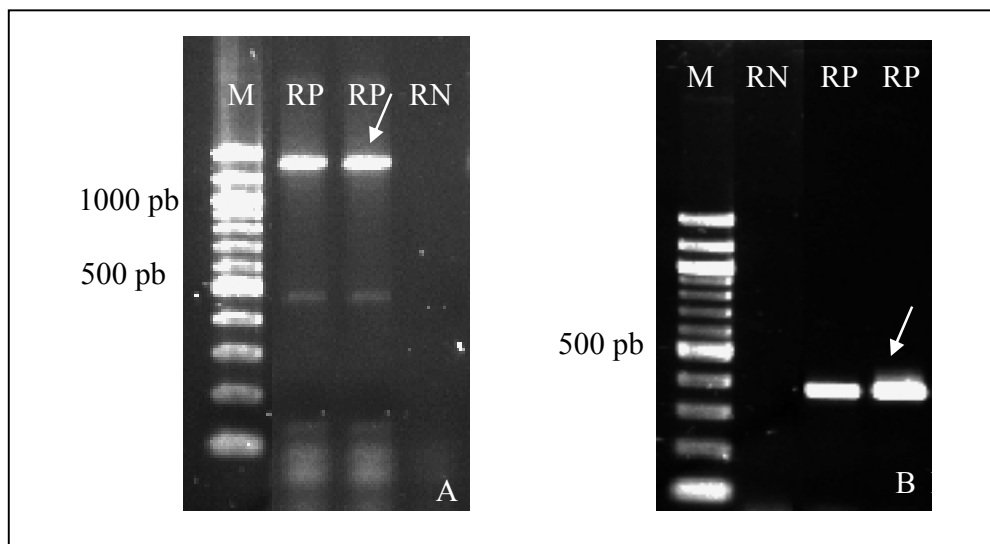


Figura 6. Perfis eletroforéticos da amplificação dos genes *icaA* (A) e *icaD* (B) em *Staphylococcus* spp. coagulase negativos isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5% (Isolado positivo indicado pela seta). A: fragmento do gene *icaA* (1315pb); B: fragmento do gene *icaD* (381pb); M: marcador de peso molecular (100pB), RN: Reação negativa, RP: reação positiva.

5.3.2 Produção de “slime” pela técnica da microplaca versus genes *icaA* e *icaD*

Um total de 77% (77/100) dos isolados foi positivo, em diferentes escalas, para a produção de “slime” (tabela 11) na técnica da microplaca (figura 7), representados por 70 *S. xylosus*, 5 *S. haemolyticus*, 2 *S. capitis*.

Tabela 11. Níveis de produção de “slime” por *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina.

Espécies	Produção de “slime”*			
	-	+	++	+++
<i>S. xylosus</i> (n=70)	-	-	10	60
<i>S. haemolyticus</i> (n=5)	-	2	3	-
<i>S. capitis</i> (n=2)	-	-	2	-

*: ausente (-), fraco (+), moderado (++) e forte (+++)

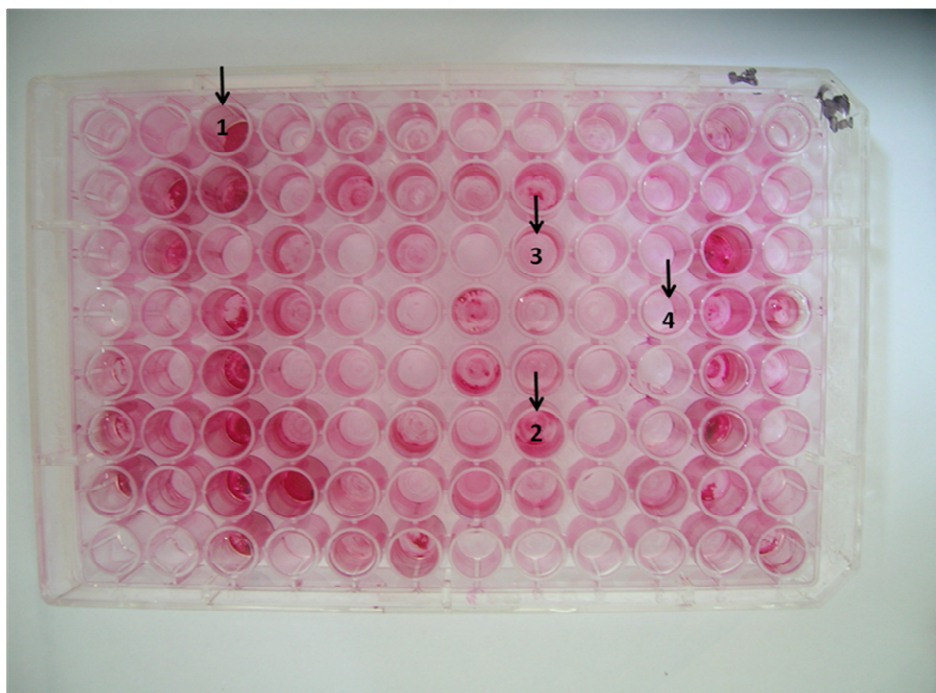


Figura 7. Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina. 1- isolado forte produtor (+++), 2- isolado produtor moderado (++) , 3- isolado fraco produtor (+), 4- isolado não produtor (-).

No presente trabalho, o gene *icaA* foi detectado em 9% (9/100) e o gene *icaD* em 10% (10/100) dos isolados positivos para o “slime”. Em trabalho realizado por Fox e colaboradores (2005) e Oliveira e colaboradores (2006) a produção de “slime” foi positiva em 41% e (48/117) e 37,5% (18/50) dos *Staphylococcus* spp isolados de mastite bovina, respectivamente, sendo que nenhuma correlação foi feita com a presença dos genes *icaAD*. Ao contrário do que foi relatado em trabalhos desenvolvidos por Vasudevan e colaboradores (2003) e Bernardi e colaboradores (2005) que encontraram associação entre a técnica de microplaca e a detecção dos genes *icaAD*.

A baixa taxa de detecção destes genes comparada ao elevado percentual de detecção de “slime” (77%) no presente trabalho sugere o envolvimento de outros genes, possivelmente relacionados à expressão do “slime”, que não foram amplificados. A sensibilidade (100%) e especificidade (28%) desta técnica foram calculadas considerando positivo o isolado que apresentou o gene *icaA* ou *icaD*, uma vez que não foi detectado ambos os genes em um mesmo isolado.

Segundo Stepanovic e colaboradores (2000), a técnica de aderência em microplacas é um dos métodos usados com frequência para quantificar a formação do “slime” produzido por *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, além de funcionar como um indicador de patogenicidade.

A tabela 12 relata o perfil dos isolados de ECN em relação à produção de “slime” nas duas técnicas avaliadas e a presença dos genes *icaA* e *icaD*.

Tabela 12. Perfis de produção de “slime” através da técnica em ágar vermelho congo e microplaca e presença dos genes *icaA* e *icaD*.

Perfil (Nº isolados)	Vermelho Congo	Microplaca*	Genes**	
			<i>icaA</i>	<i>IcaD</i>
1 (24)	Preto	+++	-	-
2 (23)	Vermelho	-	-	-
3 (15)	Vermelho	++	-	-
4 (14)	Vermelho	+++	-	-
5 (6)	Preto	+++	-	+
6 (6)	Preto	+++	+	-
7 (4)	Cinza	+++	-	+
8 (3)	Cinza	+++	+	-
9 (3)	Cinza	+++	-	-
10 (2)	Vermelho	+	-	-

*: ausente (-), fraco (+), moderado (++) e forte (+++). **: negativo (-), positivo (+).

Sabendo-se que o processo de infecção da glândula mamária pode ser ocasionado por estafilococos e tendo em vista a capacidade dos mesmos se aderir e formarem biofilmes neste sítio evidencia-se a importância do manejo profilático da mastite.

5.3.3 Produção de hemolisinas versus genes *hla* e *hlb*

Dos isolados avaliados quanto à produção de hemolisinas, apenas 13% (13/100) foram hemolíticos (figura 8). Destes, 15,4% (2/13) apresentou hemólise total, sendo representados por *S. haemolyticus* e 84,6% (11/13) a hemólise parcial, representados por *S. xylosus*. A hemólise parcial, em *Staphylococcus* spp., é representada pela beta-hemolisina, uma enzima que apresenta atividade de esfingomielinase, destruindo membranas celulares ricas em esfingomielina, sendo tóxica para vários tipos celulares apresentando grande importância nos casos de mastite uma vez que o úbere é rico em esfingomielina (NISHIYAMA et al., 2002; LIASSINE et al., 2005).

Segundo Coelho e colaboradores (2009) a produção de hemolisinas foi detectada em 12% (9/21) dos isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite bovina. Destes, 77,7% (7/9) foi produtor de hemólise total e parcial e 22,2 % (2/9) foi produtor de hemólise parcial. Madani-Bedini e colaboradores (1997) detectaram a produção de hemolisinas em 165 isolados de ECN provenientes de leite de cabra. Destes, 56,9% (94/165) foi produtor de hemólise e total e 75,1% (124/165) de hemólise parcial. O baixo percentual de isolados produtores de hemolisinas no

presente estudo provavelmente pode estar associado aos múltiplos repiques realizados e ao longo período de congelamento antes de serem processados, onde 87% dos isolados não produziram nenhum tipo de hemolisina.

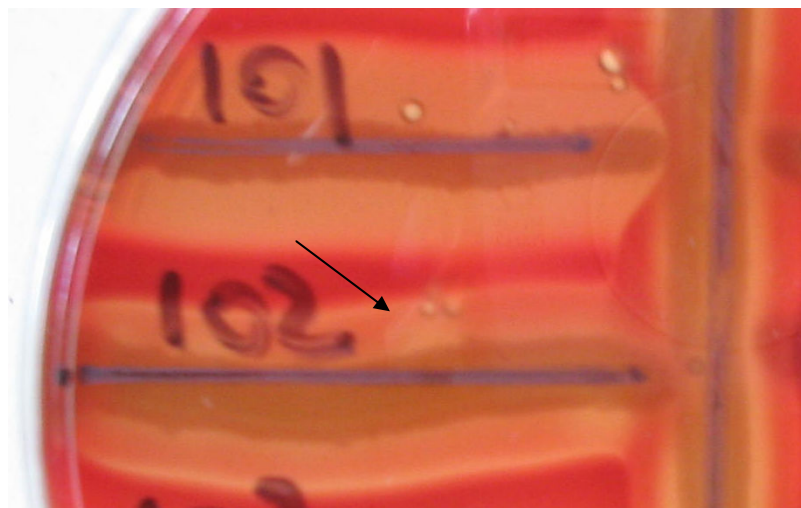


Figura 8. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de mastite bovina. A seta indica um isolado produtor de hemólise parcial.

Através da técnica de PCR multiplex, os genes *hla* e *hlb* (210pb e 300 pb, respectivamente) não foram detectados em nenhum isolado, o que sugere o envolvimento de outros genes, possivelmente relacionados à expressão destas toxinas em ECN, que não foram amplificados no presente trabalho.

O SHA foi positivo em 15% (15/100) dos isolados sendo que destes, 14 não apresentaram hemolisinas. Silva e colaboradores (2005) detectaram o sinergismo hemolítico em 34,5% (122/353) dos isolados de estafilococos avaliados não hemolíticos. A literatura relata que isolados não hemolíticos com produção de sinergismo podem ser portadores da delta hemolisina, a qual é expressa somente na presença da beta-hemolisina. Além disso, acredita-se que o fenômeno de sinergismo hemolítico seja independente da produção de hemolisinas, porém sua ação é considerada potencializadora para isolados que são hemolíticos (REINOSO, 2004).

6. CONCLUSÕES

- A espécie *S. xylosus* foi mais frequente dentre os estafilococos identificados;
- Os isolados apresentaram elevada resistência à penicilina e à ampicilina, tendo a associação entre ampicilina e sulbactam, a vancomicina, a linezolida e a imipinema mostrado maior eficácia *in vitro* frente a estes;
- A difusão em disco com a cefoxitina foi mais específica que a oxacilina.
- Foram encontrados 15 perfis distintos nos testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina.
- As cepas resistentes à oxacilina apresentaram elevada resistência a penicilina e ampicilina.
- A técnica de microdiluição em caldo foi a menos específica.
- O gene *mecA* foi detectado em apenas 13,8% dos isolados resistentes à oxacilina, os quais também foram *mecRI* positivos.
- O gene *mecI* foi detectado em 47% dos isolados. Destes, 2 isolados apresentaram o gene *mecA*.
- Em 2% dos isolados foram detectados todos os genes do sistema *mec* (*mecA-mecI-mecRI*) sendo este fenotipicamente resistentes à oxacilina.
- A detecção da produção de beta-lactamases através da fita com substrato cromogênico foi observada nos 100 isolados avaliados, incluindo os 21% sensíveis à penicilina.
- Um total de 16 isolados foi positivo para o gene *blaZ*, resistentes à penicilina e ampicilina e positivos no teste de nitrocefim.
- O teste do nitrocefim demonstrou concordância com a presença do gene *blaZ*, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade.
- Foi detectado somente o gene *blaZ* em 11% dos isolados.
- Em 2 isolados foram detectado os genes *blaZ* e *blaRI*, e 3 isolados apresentaram todos os genes do sistema *bla* (*blaZ*, *blaI* e *blaRI*).
- Dos 16 isolados positivos para o gene *blaZ*, 4 foram *mecA* positivos.
- Um total de 79 isolados apresentaram resistência a penicilina e ampicilina, e apenas 16 foram *blaZ* positivos.
- Em 63 isolados resistentes à penicilina e ampicilina não foi possível identificar através da análise genética um provável mecanismo de resistência.
- O gene *femA* não foi detectado em nenhum dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos;
- Os *Staphylococcus* spp. produziram “slime” em diferentes escalas na técnica da microplaca e ágar vermelho congo.
- Os genes de produção de “slime”, *icaA* e *icaD*, foram detectados em 9% e 10% dos *Staphylococcus* spp. coagulase negativos, respectivamente;
- Não foi detectada associação entre ambos os genes *icaA* e *icaD* com a produção de “slime”.
- Um total de apenas 13% foi produtor de hemolisinas e destes 15,4% apresentaram hemólise total e 84,6% a hemólise parcial.
- O SHA foi positivo em 15 isolados sendo que destes, 14 não apresentaram hemolisinas.
- Os genes *hla* e *hly* não foram detectados em nenhum dos isolados.

- Não foi possível estabelecer uma correlação entre os testes fenotípicos e genotípicos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos nos isolados avaliados.

6.1. Considerações Finais

- A grande diversidade de espécies bacterianas pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos associados a processos infecciosos, em particular a mastite bovina, torna a execução dos testes de identificação bacteriana e a realização do antibiograma ferramentas importantes para evitar falhas na terapêutica veterinária, bem como impedir sua disseminação silenciosa nos rebanhos leiteiros.
- Dados sobre os percentuais de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos entre os estafilococos coagulase-negativos bem como a avaliação dos prováveis mecanismos de resistência apresentados pelos mesmos têm importância relevante no contexto do uso racional de antimicrobianos.
- Os testes de suscetibilidade antimicrobiana avaliados no presente trabalho representam condições *in vitro*, podendo estes resultados ser diferentes em condições *in vivo*.
- A baixa correlação do gene *mecA* com a resistência à oxacilina inviabiliza sua confiabilidade como marcador de resistência e padrão ouro, apontando para a necessidade de novos estudos, uma vez que os parâmetros estabelecidos para a detecção deste gene utiliza *Staphylococcus aureus* como modelo. Associado a isso, a diversidade de espécies encontrada no grupo dos ECN levanta questões a respeito deste gene ser o marcador de resistência em todas as espécies.
- A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, especialmente à oxacilina, tem sido correlacionada com a presença da proteína PBP2a estafilocócica. Neste contexto, estudos são necessários para a detecção da produção da proteína PBP2a nos isolados avaliados. Associado a isso, existe a necessidade de estudos mais acurados sobre a produção de PBP2a em estafilococos coagulase-negativos, uma vez que os trabalhos utilizados na literatura utilizam *S. aureus* como modelo.
- De acordo com o CLSI, isolados de estafilococos resistentes à cefoxitina são resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos, fato não observado nos isolados provenientes de animais no presente trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canidea gives possible evidence for host specificity and co-evolution of bacteria and hosts. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1343–1347, 2001.
- ADAMS, H. R. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- AERTS, M.M.L., HOGENBOOM, A.C., BRINKMAN, U.A.T. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal Chromatography**, v. 667, p. 1-40, 1995.
- ALCARÁZ, L.E.; SATORRES, S.E.; LUCERO, R.M.; CENTORBI, O.N.P. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, p. 45- 51, 2003.
- AMARAL, L.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. Incidence of *Staphylococcus* sp. in the water used by dairy farms in the State of Sao Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**. v.55, n.(5), 2003.
- AGUILAR, B. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p.165-175, 2001.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151-2156, 2001.
- ARCHER, G.L.; SCOTT, J. Conjugative transfer genes in staphylococcal isolates from the United States. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.35 p.2500–2504, 1991.
- ARCHER GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. **Churchill-Livingstone**. v.4, p.1777-84, 1995.
- ARCHER LG. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R editors. Principles and practice of infectious diseases. **Churchill Livingstone**. v.5, p. 2092-100, 2000.
- ASPIS, D.; BALDASSI, L.; GERMANO, P.M.L.; FEDULLO, J.D.L.; PASSOS, E.C.; GONÇALVES, M.A. Suscetibilidade *in vitro* a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* spp e *Micrococcus* spp isoladas a partir de mucosa oral de macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. v.40 n.2, 2003.
- ASO, Y.; SASHIHARA, T.; NAGAO, J.; KANEMASA, Y.; KOGA, H.; HASHIMOTO, T.; HIGUCHI, T.; ADACHI, A.; NOMIYAMA, H.; ISHIZAKI, A.; NAKAYAMA, J.;

SONOMOTO, K. Characterization of a gene cluster of *Staphylococcus warneri* ISK-1 encoding the biosynthesis of and immunity to the lantibiotic, nukacin ISK-1. **Biosci Biotechnology Biochemistry**.68(8):1663-71, 2004.

BANNERMAN, T.M. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.384-404, 2003.

BASELGA, R. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**., v. 61, p. 4857- 4862., 1993.

BAYSTON, R.; PENNY, S.R. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus* SIIA: a possible factor in colonization of Holter shunts. **Developmental Medicine and Child Neurology**. v.27, p.25-8, 1972.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZOLITTO, A.C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**. v.28, n.1, p.57-66, 2007.

BERNARDO, W.L.C.; BORIOLLO, M.F.G.; GONÇALVES, R.B.; HOFLING, J.F. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.(1), 2005.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Molecular Biology**. v.55, n.(4), p.733-751, 1991

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

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

BLUMBERG, H.M.; RIMLAND, D.; CARROLI, D.J.; TERRY, P.; WACHMUTH, K. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin- susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Infections Disease**. v.163, n.1, p.279-285, 1991.

BOHACH, G.A.; DINGES, M.M.; MITCHELL, D.T.; OHLENDORF, D.H. Schlievert PM. Exotoxins. In: Crossley KB, Archer LG, editors. The Staphylococci in Human Disease. **New York: Churchill Livingstone**. v. 5, p.83-111, 1997.

BONNA, I.C.F.; SANTOS, A.P.V.; TEIXEIRA, G.N.; MOTTA, O.V. *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes a drogas isolados de leite de búfalas (*Bubalus Bubalis*) Drug resistant coagulase-negative Staphylococci isolated from milk of buffaloes (*Bubalus Bubalis*). **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 14, n. 2, p. 117-121, 2007.

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

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; CORDEIRO, F.M.; COSTA, W.A.; FORTES, T.O. Caracterização de biótipos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.52 n.(5), 2000.

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

BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Simplified scheme for identification of coagulase-positive Staphylococci isolated from bovine mastitis **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.79-82, 2002b.

BRITO, M. A. P. Uso de antibacterianos na pecuária leiteira e risco de resistência para o homem. In: Simpósio De Resistência Bacteriana Aos Antimicrobianos, 2003, Rio de Janeiro. [**Anais...**], 2003. [Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003]. CD-ROM. SimrebanII.pps.

BROWN, D.F.J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.65-70, 2001.

CAFISO, V. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbial Infection.**, v. 10, p. 1081-1088, 2004.

CARACAPPA, S.; LORIA, G.R.; NOTO, A. Sensibilità e resistenza verso alcuni chemio-antibiotici in ceppi de *Staphylococcus aureus* isolati de latte mastitico bovino in Sicilia. Atti della Soc Itali Buiatria, n. 23, p. 229-33, 1991.

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

CENTER, K.J.; REBOLI, A.C.; HUBLER, R.; RODGERS, G.L.; LONG, S.S. Decreased Vancomycin Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care Unit: Evidence of Spread of *Staphylococcus warneri*. **Journal Clinical Microbiology**. v.41, n.(10), p.4660-5, 2003.

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

CHANG, M.R.; CARVALHO, N.C.P.; OLIVEIRA, A.L.L.; MONCADA, P.M.F.; MORAES, B.A.; ASENSI, M.D. Surveillance of Pediatric Infections in a Teaching Hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Infections Disease**. v.7, n.(2), p.149-60, 2003 (a).

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med.* v. 348 p.1342-7, 2003(b).

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

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.; BISNO, A.L.; BEACHEY, E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infections Immunology.* v.37, n.(1), p.318-26, 1982.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.J.; BADDOUR, L.M.; BARRETT, F.F.; MELTON, D.M.; BEACHEY, E.H. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococcus* to medical devices. **Journal Clinical Microbiology.** v. 22, p. 996-1006, 1985.

CHRISTENSEN, G.D.; BALDASSARI, L.; SIMPSON, W.A. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. **Infection associated with indwelling medical devices.** 2nd. ed. Washington: ASM Press, p. 45-78, 1994.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement, document M100-S17. Wayne, PA, USA: CLSI, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2008.

COELHO S.M.O.; MENEZES R.A.; SOARES L.C.; PEREIRA I.A.; GOMES L.P.; SOUZA M.M.S. Mapeamento do Perfil de Resistência e Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural.** v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COELHO, S.M.O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; DEMO, M.; BOGNI, C.; SOUZA, M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.29, n.5, 2009.

CONLON, K.M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal Bacteriology.** v. 184, p. 4400-4408, 2002.

CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. Aplicabilidade dos conjuntos para detecção de resíduos de antibióticos no leite em propriedades leiteiras. **Biólogo**, v. 62, n. 1, 2000.

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

COSGROVE, S. E., Y. QI, K. S. KAYE, S. HARBARTH, A. W. KARCHMER, AND Y. CARMELI. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. **Infections Control Hospital Epidemiology**. v.26, p.166-174, 2005.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. Revista de Educação Continuada do CMRV-SP, São Paulo, v.1, p.3-9, 1998.

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

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002, p. 442-455.

COSTA, S.F.; MICELI, M.H.; ANAISSIE, E.J. Mucosa or skin as source of coagulase negative staphylococcal bacteremia? **Lancet Infectious Disease**. v. 4, p. 278-286, 2004.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**. v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, W.; VEEH, R.; SHIRTLIFF; PASMORE, M.; POST, C.; EHRlich, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1466-1477, 2003.

CUI, L.; TOMINAGA, E .; NEOH, H. M.; HIRAMATSU, K. Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, p.1079-1082, 2006.

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

CUNHA, M.L.R.S. Significância etiológica e características de estafilococos coagulase negativo isolados de processos infecciosos em recém nascidos. [Tese (doutorado). Faculdade de Medicina. Unesp. Botucatu, SP; 1998].

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

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

DANTAS, M.D.; ANDRÉ, P.B.; SANTOS, P.P.; CAMPOS, M.R.H.; BORGES, L.J.; SERAFINI, A.B. Utilização do Antibiograma como Ferramenta de Tipagem Fenotípica de *Staphylococcus aureus* Isolados de Manipuladores , Leite Cru e Queijo Minas Frescal em Laticínio de Goiás, Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. v. 43, p. 102-108, 2006.

DEMO, M. Caracterización Y estudios de patogenicidad de cepas de la género *Staphylococcus* aisladas de leches mastíticas. Instituto de Microbiología, Universidad Nacional de Rio Cuarto, 1996.

De GIUSTI, M. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.44, p. 351-358, 1999.

De PAULIS, A.N.; PREDARI, S.; CHAZARRETA, C.D.; SANTOIANNI, J.E. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology** v.41, p.1219-1224, 2003.

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

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Disease**. v.15, p.32, Suppl 2:S114-32, 2001.

DICKINSON, T. M.; ARCHER, G. L. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, p.1616-1623, 2000.

DOBINSKY, S.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. **Plasmid**. v. 47, p. 10-17, 2002.

DOMINGUEZ, M.A.; LINARES, J.; MARTIN, R. Molecular mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**. v.13, p.301-308, 1997.

DORDET-FRISONI, E.D.; ARAÚLO, C.D.; TALON, R.; LEROY, S. Genomic Diversity in *Staphylococcus xylosus*. **Applied Environment Microbiology**. v.73, n.(22), p. 7199–7209, 2007.

EDWARDS, J.R.; BETTS, M.J. Carbapenems: the pinnacle of the β -lactam antibiotics or room for improvement. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**. v.45, p.1-4, 2000.

ERSKINE, R.J.; KIRK, J.H.; TYLER, J.W.; DEGRAVES, F.J. Advances in the therapy for mastitis. **Veterinary Clinics North Ameica Food Animal Praticce**, v.9, n.3, p.499-513, 1993.

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

FELTEN, A. Evaluation of thre etechniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, p. 276671, 2002.

FERNANDES, C.J.; FERNANDES, L.A.; COLLIGNON, P. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 506-10, 2005.

FERREIRA, R.B.R.; NUNES, A.P.F.; KOKIS, V.M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L.S.; BASTOS, M.C.F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K.R.N. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology Infections Disease**, v. 42, p. 205-212, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentrations of oxacillin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3609-3614, 2003.

FITZGERALD, R.H.; RICHARDSON, J.F.; SANE, M.J. Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocardites caused by coagulase negative staphylococci. **Zentrabl Bakteriology Supply.**, v. 14, p. 463-469, 2005.

FLUIT, A. C.; WIELDERS, C. L. C.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F.J. Epidemiology and Susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* Isolates from 25 University Hospitals Participating in the European SENTRY Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.(10), p. 3727-3732, 2001.

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

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

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

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

FREEMAN, D. J. FALKINER, F.R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO, J.W.J.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; FILHO, V.M.S.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FUDA, C.; SUVOROV, M.; VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. THE BASIS FOR Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Biology Chemistry**. v.279, p.40802-40806, 2004.

GALDBART, J.O. et al. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. **Journal Infection Disease**, v. 5, p. 351-355, 2000.

GELOSIA, A.; BALDASSARI, L.; DEIGHTON, L.; NGUYEN, T.V. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. **Journal Clinical Microbiology**, v. 7, p. 193-199, 2001.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A.; REBUELTO, M.; FERMEPIN, M.R.; De TORRES, R.A.J. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. **American Dairy Science**, v.85, p.1913-1917, 2002.

GERKE, C.; KRAFFT, A.; SÜBMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. Characterization of N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polyssaccharide intercellular adhesin. **Journal Biology Chemotherapy**. v. 273, p. 18586-18593, 1998.

GEWEHR, C. E.; LAWISCH, A. A. Antibióticos na nutrição animal. **Agropecuária Catarinense**, v. 16, n. 2, p. 43-46, 2003.

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

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**., v.43, p.1367-1378, 2002.

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

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

GRIETHUYSEN, A. van.; LOO, I. van.; BELKUM, A. van; VANDENBROUCKEGRAULS, C.; WANNET, W.; KEULEN, P. van.; KLUYTMANS, J. Loss of the *mecA* Gene during Storage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, The Netherlands, v.43, n. 3, p-1361-1365, 2005.

GROOM, A.V. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. **Journal American Medicine Association**. v.286, p. 1201-1205, 2001.

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

HAILE, D.T.; HIGHERS, J.; VETTER, E.; KOHNER, P.; SNYDER, R.; PATEL, R.; COCKERILL, F.R. Frequency of Isolation of *Staphylococcus lugdunensis* in Consecutive Urine Culture an Relationship to Urinary Tract Infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, n.(2), p.654-6, 2002.

HANSEN, G.T.; METZLER, K.L.; DECAROLIS, E.; BLONDEAU, J.M. The macrolides. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.11 p.189-215, 2002.

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

HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D.; LUND, L.; PAGE, R. Update on microbial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. **Canadian Veterinarian Journal**, v.4, p.253-257. 2006.

HAVERI, M.; SUOMINEN, S.; RANTALA, L.; HONKANEN-BUZALSKI T, T.; PYÖRÄLÄ, S. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. **Veterinary Microbiology**,. v.20, p. 97-102, 2005.

HEBERT, G.A.; HANCOCK, G.A. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22 n.3 p.409-415, 1985.

HEIJENOORT, J.V.; Formation Of Glycan Chains In The Synthesis Of Bacterial Peptidoglycan, **Glycobiology**, v.11, n.3, p.25R-36R, 2001.

HEIKENS, E. Comparison of genotypic and phenotypic methods for specieslevel identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: Fischetti VA; Novick RP; Ferreti JJ; Portnoy DA; Rood JI *Gram-positive pathogens*. Washington, D.C.: ASM Press, p.442-9, 2000.

HEINZELMANN, M.; HERZIG, D.O.; MARK, B.S.; MERCER-JONES, A.; BERGAMINI, T.M.; POLK JR, H.C. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, p. 705-710, 1997.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**. v.40, p.135-136, 1997.

HIRANO, L.; BAYER, A. S. b-Lactam–b-lactamase inhibitor combinations are active in experimental endocarditis caused by b-lactamase-producing oxacillin-resistant staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.35, p. 685–690, 1991.

HUDOME, S.M.; FISHER, M.C. Nosocomial infections in the neonatal intensive care. **Current Opinion Infectious Disease**, v.14, p.303-307. 2001

HUSSAIN, M.; HEILMANN, C.; PETERS, G.; HERRMANN, M. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, p. 261-270, 2001.

IZDEBSKI, R.; RUTSCHMANN, J.; FIETT, J.; SADOWY, E.; GNIADKOWSKI, M.; HRYNIEWICZ, W.; HAKENBECK, R. Highly variable penicillin resistance determinants PBP 2x, PBP 2b, and PBP 1a in isolates of two *Streptococcus pneumoniae* clonal groups, Poland 23F-16 and Poland 6B-20. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.52, n.(3), p.1021-1027, 2008.

JEFFERSON, K.K.; PIER, D.B.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v.186, p. 2449–2456, 2004.

JOHANNES, K. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. **Journal Bacteriology**. v. 183, p.2624-2633, 2001.

JOHN, M. A.; PLETCH, C.; HUSSAIN, S. *In vitro* activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telitromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 50, p. 933-938, 2002.

JONAS, D.; WALEV, I.; BERGER, T.; LIEBETRAU, M.; PALMER, M.; BHAKDI, S. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. **Infectious Immunology**. v. 62, n.(4), p. 1304–1312, 1994.

JONES, R.M.; JACKSON, M.A.; ONG, C.; LOFLAND, G.K. Endocarditis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v.21, n.(3), p.265-268, 2002.

JONES, R.N.; ROSS, J.E.; FRITSCH, T.R. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, p.279–87, 2006.

JORGENSEN, J.H.; CRAWFORD, S.A.; MCELMEEL, M.L.; FIEBELKORN, K.R. Detection of inducible clindamycin resistance on staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing. **Journal Clinical Microbiology**. v.42, p.1800-1802, 2004.

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

KIM, H.B.; JANG, H.C.; NAM, H.J.; LEE, Y.S.; KIM, B.S.; PARK, W.B.; LEE, K.D.; CHOI, Y.J.; PARK, S.W.; OH, M.D.; KIM, E.C.; CHOE, K.W. *In vitro* activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.48, p. 1124-1127, 2004.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV – *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore. p. 1.013-1.035, 1994.

KLOOS, W.E. Taxonomy and Systematic of Staphylococci Indigenous to Humans. In: Crossey KB, Archer LG, editors. *The Staphylococci in Human Disease*. New York: **Churchill Livingstone**. p. 113-37, 1999.

KO, K.S.; LEE, J.Y.; SUH, J.Y.; OH, W.S.; PECK, K.R.; LEE, N.Y.; SONG, J.H. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. **Journal Clinical Microbiology**, v.43, 421–426, 2005.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. *Diagn. Microbiol.* 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.

- KOROIKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998, 793p.
- KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA T.; YUZAWA, H.I.; KOBAYASHI, L.; CUI, A.; OGUCHI, K.; AOKI, Y.; NAGAI, J. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New Englang Journal Medicine**, v.319, p.157-61, 2001.
- LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw Milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57, n.(5), 2005.
- LANGONI, H.; MARINHO, M.; BALDINI, S.. Ação *in vitro* da enrofloxacin em microrganismos isolados de leite mastítico. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda. **Anais**. Olinda, 1994, p. 259.
- LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Napgama**. v.2, n.1, p.4-7, 2000.
- LECLERQ, B.; COURVALIN, M. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant recovered from adult patients with community-acquired pneumonia in an Argentinian teaching hospital. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.25,n.(3),p.260-263,2003.
- LEITER, T.(2000) Cephalosporins. <http://www.fhu.edu/nursing/otitis/cephalosporins.html>. Acessado em outubro de 2009.
- LEWIS, R.A.; CURNOCK, S.C.; DYKE, K.G.H. Proteolytic cleavage of the repressor (BlaI) of β -lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.178, p.271-275, 1999.
- LIASSINE, N.; AUCKENTHALER, R.; DESCOMBES, M.C.; BES, M.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. **Journal Clinical Microbiology**. v.42, n.(2), p.825-8, 2004.
- LOPES, A.A.; SALGADO, K.; MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Aumento da frequência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.44, n.3, p.196-200, 1998.
- LÓPEZ, H.S.; BRUMBAUGH, G.W.; TRIGOS, G.M. Bases farmacológicas Del tratamiento de la mastitis bovina. **Revista Veterinária do México**. v.27, n.(1), p.63-82, 1996.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Investigation**, v.111, p.1265-1273, 2003.

- MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARINS, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.1, p.278-282, 2008.
- MADANI-BEDIDI, N.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Veterinary Microbiology**, v.59, p. 139-145, 1998.
- MAESTRE, M.M.; VERA, J.R.M. Biofilm: Modelo de comunicação bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. **Revista Esp Quimioterapic**. v.17, n.(1), p.26-28, 2004.
- MAGALHÃES, H. R. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa **Revista brasileira de zootecnia**, v.35, n(3), p. 354-360, 2006.
- MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, v. 9 p. 34-39, 2001.
- MAHOUDEAU, I.; DELABRANCHE, X.; PREVOST, G.; MONTEIL, H.; PIEMONT, Y.V.E.S. Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2153-2154, 1997.
- MALTEZOU, H.; GIAMARELLOU, H. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections, *International Journal of Antimicrobial Agents* v. 27, n.(2), p.87-96, 2006.
- MANIE, T. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in south Africa. **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, p. 253-258, 1997.
- MARIANO, F.A.; FOLLY, M.M.; TEIXEIRA, G.N.; CARMO, L.S.; MOTTA O.V. Enterotoxins production by *Staphylococcus* isolated from milk of goats from Rio de Janeiro state. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 14, n. 2, p. 105-110, maio/ago. 2007
- MARIMÓN, J.M.; VALIENTE, A.; ERCIBENGOA, M.; GARCÍA-ARENZANA, J.M.; PÉREZ-TRALLERO, E. Erythromycin Resistance and Genetic Elements Carrying Macrolide Efflux Genes in *Streptococcus agalactiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. vol. 49, n.(12), p.5069-5074, 2005.
- MARQUES, C.S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; LANSAC, N.; MENARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p.231-238, 2000.

MCEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial Use and Resistance in **Animals Clinical Infectious Disease**, v.34, n.(3), p.93-106, 2002.

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

MEHROTA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, Mar. 2000.

MENDES, C.; SINTO, S.; HIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; TEIXEIRA, L.; SEGURA, A. SOUZA, D.; BARTH, A.; NICODEMO, A.C. Antimicrobial in vitro activity of quinupristin/dalfopristin against gram-positive cocci isolated from 5 Brazilian centers: results from the local smart (L-SMART) surveillance study **Jornal Brasileiro de Patologia Medica**. v.38, n.3, 2002.

MENEGOTTO, F.R.; PICOLI, S.U. Resistent oxacilin *Staphylococcus aureus* (MRSA): incidence of cepas acquired in the community (CA-MRSA) and importance of research and descolonization in hospital 147 RBAC, vol. 39, n.2, p.147-150, 2007.

MICHELIM L, LAHUDE M, ARAÚJO PR, GIOVANAZ DSH, MÜLLER G, DELAMARE APL, COSTA SOP, ECHEVERRIGARAY S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive Care units. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.36, p.17-23, 2005.

MIMICA, M.J. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? **Brazilian Journal Infectious Disease**. v. 11, p. 415-7, 2007.

MONROY, P.E.; PANIAGUA, C.G.L.; VACA, P.S.; GONZÁLEZ, A.S.E. Comparación de la efectividad de antibióticos β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus aureus*. **Rev Hosp M Gea Glz**. v.6, n.1, p.7-12, 2003.

MORALES, M.; MÉNDEZ-ALVAREZ, S.; MARTIN-LÓPEZ, J.V.; MARRERO, C.; FREYTES, C.O. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. **Support care cancer**, v. 12, p. 701-707, 2004.

MORENO, L. V. Antibiotic residues and drugs resistant bacteria in beef and chicken tissues. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 3, p. 632-635, 1990.

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

MOTA, R.A.; SILVA, R.A.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal veterinary Research animal Science**. v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MOTTI E.F. Contribuição Prática dos Novos Antibióticos: avanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Medicina**, v.47, n.6, p.236-244, 1990.

MOURA, A.P.B.L.; ACIOLIL, R.; DUARTE, D.A.M.; PINHEIRO, J.W.J.; ALCÂNTARA, J.S.; MOTA, R.A. Caracterização e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de carne caprina comercializadas em mercados e supermercados em Recife, PE. **Arquivo do Instituto de Biologia de São Paulo**, v.73, n.1, p.7-15, 2006.

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

NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITAI, S.; KAWANO, J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **Journal Veterinary Medicine Science**. v.64, p.245-250, 2002.

NASCIMENTO, G. G. F. do; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. de. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 2, 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **TaxBrowser**, Washington, 12 dez. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>. Acesso em: 12 jun. 2009.

NAWAZ, M.S.; KHAN, A.A.; KHAN, S.A. et al. Biochemical and molecular characterization of erythromycin-resistant avian *Staphylococcus* spp. isolated from chickens. **Poultry Science**. v.78, p.1191-1197, 1999.

NETTO, M.Z.; HERREIRO, F.; BANDEIRA, C.O.P.; ITO, Y.; CIORLIN, E.; SAQUETIL, E.E.; ANSILEIRO, I.J.; GONÇALVES, L.; SIQUEIRA, V.L.D. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum Maringá**, v. 23, n. 3, p. 709-712, 2001.

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

NICODEMO, M.L.F. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. Embrapa Gado de Corte, v. 56, p. 54, 2001.

NIMRAT, S.; SIRIBOONLAMOM, S.; ZHANG, S.; XU, Y.; VUTHIPHANDCHAI, V. Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. **Aquaculture**. v.261, p.944-951, 2006.

NICKERSON, S.C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R.L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 7, p. 1607-1618, 1995.

NILSSON, I.M.; HARTFORD, O.; FOSTER, T.; TARKOWSKI, A. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. **Infection and Immunity**. v.67 p. 1045–1049, 1999.

NISHIYAMA A, GUERRA MA, SUGAWARA N, YOKOTA K, KANEKO J, KAMIO Y. Identification of serine138 residue in the 4-residue segment K135K136I137S138 of LukS-I component of *Staphylococcus intermedius* leukocidin crucial for the LukS-I-specific function of staphylococcal leukocidin. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.66, n.(2), p.328-35, 2002.

NORSTRÖM, M.; SUNDE, M.; THARALDSEN, H.; MØRK , T.; BERGSJØ , B.; HILDE KRUSE, B. Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* in the Norwegian Dog Population. **Microbial Drug Resistance**, v.15, n.(1), p. 55-59, 2009.

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

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 62, p. 10– 13, 1999.

OLIVEIRA G.A., DELL'AQUILA A.M., MASIERO R.L. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control Hospitalar Epidemiology**. v.22, p.443-8, 2001.

OLIVEIRA, M. et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**. v.118, p.133- 140, 2006.

OLIVEIRA, N. J. Antibióticos promotores de crescimento na produção animal. In: 4º Encontro de zootecnista do norte de minas: novas perspectivas mercadológicas, 2008, Montes Claros. **Anais da UFMG**, p. 89-115, v. 42, 2008.

OLSEN, J.E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F.M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.31, p. 232-240, 2006.

PAI, H. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, p.480-484, 2001.

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

PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; COELHO, S.M.O.; BALBINO, F.A.; PRIBUL, B.R.; SOUZA, M.M.S. Azithromycin susceptibility pattern of bacterial isolated from different sites of infections in pet animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.3, p.577-584, 2009.

PERRY CM, JARVIS B. Linezolid: a review of its use in the management of serious Gram-positive infections. **Drugs**. v.61, n.(4), p.525-51, 2001.

PETERSSON, A.C.; KAMME, C.; MIÖRNER, H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.2047-2050, 1999.

PETINAKI, E.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mecA* gene **Microbiology Drug Resistance**, v.7, n.3, p.297-300, 2001.

PINHO, M.G.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Na acquired and a native penicillin binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. **PNAS**, v.98, n.19, p.10886-10891, 2004.

PITKALA, A.; SALMIKIVI, L.; BREDBACKA, P.; MYLLYNIEMI, A.L.; KOSKINEN, M.T. Comparison of tests for the detection of β -lactamase I producing staphylococci. **Journal Clinical and Microbiology**. 2007.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**. London, v.17, n.4, p.361-365. Aug. 2000.

POTTUMARTHY, S.; FRITSCHÉ, T.R.; JONES, R.N. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting *mecA*-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology of Infectious Disease**. v. 51, p. 57-62, 2005.

PRESCOTT, M.L., HARLEY, J.P. AND KLEIN, D.A. Prokaryotic cell structure and function in Microbiology. **WCB** . p 33-72, 1996.

PREVOST G, COUPPIE P, PREVOST P, GAYET S, PETIAU P, CRIBIER B, MONTEIL H, PIEMONT Y. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. **Journal of Medical Microbiology**. v.42, n.(4), p.237-45, 1995.

PROJAN, S.; NOVICK, R. The molecular basis of pathogenicity. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. (Ed.). *The Staphylococci in Human Disease*. New York: **Churchill Livingstone**. p. 55-81, 1997.

RADOSTITS, O.M; GAY, C.C; BLOOD, W.C; HEMCHELIFF, K.W. *Clínica Veterinária – Um tratado de doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 541-621.

REINOSO, E.B. Análisis epidemiológico y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* de distintos orígenes. Tese de doutorado. Instituto de Microbiologia. Universidad Nacional de Rio Cuarto. 199p, 2004.

REHDER, A. Caracterização da resistência aos beta-lactâmicos em estafilococos mediada pelos operons *mecA* e *bla*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2006.

REIS, G. L. Efeito do tipo de ordenha sobre a saúde do úbere e a qualidade do leite. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*. Editora FEP MVZ, v. 48, p. 6-13, setembro, 2005.

RIMAL, A.; FLETCHER, S.M.; MCWATTERS, K.H.; MISRA, S.K.E.; DEODHAR, S. Perception of food safety and changes in food consumption habits: a consumer analysis. **International Journal of Consumer Studies**. p 43-52, 2001.

ROSATO, A.E.; KREISWIRTH, B.N.; CRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.; ARCHER, G.L. *mecA-blaZ* Corepressors in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.(4), p. 1460–1463, 2003.

ROWE, F.; SUPERTI, S.V.; SCHEIBE, R.M.; DIAS, C.G. Agar diffusion, agar dilution, Etest®, and agar screening test in the detection of methicillin resistance in staphylococci. **Diagnostic Microbiology Infections Disease**, v.43, p.45-48, 2002.

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

RUSSEL, A.D.; CHOPRA, I. Understanding antibacterial action and resistance. **El. Horwo. Chichester**. n.(2),1996.

RŮŽIČKOVÁ, V.; KARPÍŠKOVÁ, R.; PANTŮČEK, R.; POSPÍŠILOVÁ, M.; ČERNÍKOVÁ, P.; DOŠKAŘ, J. Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.60-65, 2008.

SADER, H.S.; MENDES, C.M.F.; MONTELLI, A.; SAMPAIO, J.; SEGURA, A.J.A.; KESSELRING, G.L.F.; COSTA, L.; RIBEIRO, J.E.F.; MAMIZUKA, E.; MIMIÇA, I. Atividade antimicrobiana *in vitro* da cefpiroma em comparação com outros beta-lactâmicos de amplo espectro contra 804 amostras clínicas de nove hospitais brasileiros. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**. v.44, n.(4), 1999.

SADER, H.S.; GALES, A.C. Emerging strategies in infectious diseases: new carbapenem and trinem antimicrobial agents. **Drugs**. v.61, n.(4), 2001.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infection in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.135-143, 2000.

SAKAI, H. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5739-5744, 2004.

SAKO, T.; TSUCHIDA, N. Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus* **Nucleic Acids Research**. v.11, n.(22), p. 7679-7693, 1983.

SALYERS, A.A.; SHOEMAKER N.B.; STEVENS, A.M.; LI, L.Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. **Microbiology Review**, v.59, n.4, p.579-590, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2002.

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

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

SCHALLIBAUM, M. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 40, Reno, 2001. **Proceedings**. Madison, National Mastiti Council, 2001, p.38-46.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D.V. Doenças Infecciosas - Conduta Diagnóstica e Terapêutica. 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan, 1998.

SCHUENCK, R.P.; PEREIRA, E.M.; IORIO, N.L.P.; SANTOS, K.R.N. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*, **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.52, p. 431–435, 2008.

SENNA, J.P.M.; PINTO, C.A.; CARVALHO, L.P.S.; SANTOS, D.S. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec* hipervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, pp.2254-2256, 2002.

SHALE, K.; LUES, J. F. R.; VENTER, P.; BUYS, E.M. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**. v.22, p.433-438, 2005.

SHARP, S.E.; WARREN, J.A.; THOMSON, R.B. Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and utility in the clinical laboratory. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**. v. 51, p. 69-71, 2005.

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

SHITTU, A.; LIN, J.; MORRISON, D.; KOLAWOLE, D. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. **Journal of Medical Microbiology**. v.53, p.51-55, 2004.

SILVA, E.; CARMO, L.; SILVA, N. Detection of enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.103-107, 2005.

SILVA, C.C.M. Resistência a Antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* Isolados de Gado de Leite Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doctor Scientiae. 2008.

SIQUEIRA, J.F.; ANE, J.R.; LIMA, K.C. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosum* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. **Australian Endodontic Journal**. v.28, p.61-63, 2002.

SMITH, T.L. Jarvis for the Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **New England Journal Medicine**, v.340, p.493-501, 1999.

SPINOSA, H; GÓRNIAK, S. L; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, R.A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.(1), p. 41-45, 2006.

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

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABICVLAHOVIC, M. A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation, **Journal of Microbiological Methods**, v.40, p. 175-179, 2000.

STEVENS, D.L.; HERR, D.; LAMPIRIS, H. Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Clinical Infectious Disease**, v.34, p. 1481-90, 2002.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J. F.; HIRAMATSU, K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.37, p.1219–1226, 1993.

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

TEIXEIRA, L.A.; RESENDE, C.A.; ORMONDE.; L.R. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n.(2), p. 400-404, 1995.

TENOVER, F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER, M.V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infections Disease**. v.7, n.2, p.327-32, 2004.

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

TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ, A.J.; LEE, J. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.2998–3003, 2000.

TOMPKINS, J. C.; FIGUEROA, J.; Steele, R. W. Occult bacteremia. **Infectious Medicine**. v.21, p.68-72, 2004.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.35, p.124-129, 1991.

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

TSIODRAS, S.; GOLD, H.S.; SAKOULAS, G. Linezolid resistance in a Pharmaceuticals, 1999 clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v.21, p.88, 2001.

TUNON, G.I.L.; SILVA, E. P.; FAIERSTEIN, C.C. Isolation of multiresistant staphylococci from canine otitis and its importance for public health. **Boletim epidemiologico paulista**. v.5, n.58, 2008.

TURKYILMAZ, S.; ESKLIZMITLILER, S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from various animal clinical samples. **Turkey Journal Veterinary Animal Science**, v.30, p.201-6, 2006.

VANNUFFEL, P., J. GIGI, H. EZZEDINE, B. VANDERCAM, M. DELMEE, G. WAUTERS, J. GALA. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v.33 p.2864–2867, 1995.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANA, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. v.92 p. 179-185, 2003.

VON EIFF, C.; PETERS, G. HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet of Infectious Disease**. v. 2, p. 677-685, 2004.

VELASCO, D. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 379-82, 2005.

VUONG, C. & OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes Infectious**. v.4 p.481–489, 2002.

WADA, A.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K.; YOKOTA, T. Southern hybridization analysis of the *mecA* deletion from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.15, p.1319-1325, 1991.

WALKER, J.; BORROW, R.; GOERING, R.V.; EGERTON, S.; FOX, A.; OPPENHEIN, B.A. Subtyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the North-West of England: a comparison of standardized pulsed-field gel electrophoresis with bacteriophage typing including an inter-laboratory reproducibility study. **Journal of Medical Microbiology**. v.48, p.297-301, 1999.

WALSH, T. R.; HOWE, R.A. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review Microbiology**. v.56, p.657-675, 2002.

WAXMAN, D.J.; STROMINGER, J.L. Penicillin-binding protein and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. **Annual Review Biochemistry**. v.52, p.825-869, 1983.

WELLER, T. M. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.15–22, 1999.

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

WILLIAMS, R.E.O., HARPER, G.J. Staphylococcal hemolysins on sheep-blood agar with evidence for a fourth hemolysin. **The Journal of Pathology and Bacteriology**. v. 59 n 1-2 p. 69 – 78, 2005.

WITTE, W.; KRESKEN, M.; BRAULKE, C.; CUNY, C. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. **Clinical of Microbiology Infections**. v.3, n.40, p.414-422, 1999.

WON, Y. S.; KWON, H. J.; OH, G. T.; KIM, B. H.; LEE, C. H.; PARK, Y. H.; HYUN, B. H.; CHOI, Y. K. Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from mice with dermatitis. **Microbiology Immunology**. v.46, p.629-632, 2002.

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

YOUNG, H. K. Do nonclinical uses of antibiotics make a difference? **Infectious Control Hospital Epidemiology**. v. 15, p. 484-487, 1994.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15-18, 2000.

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

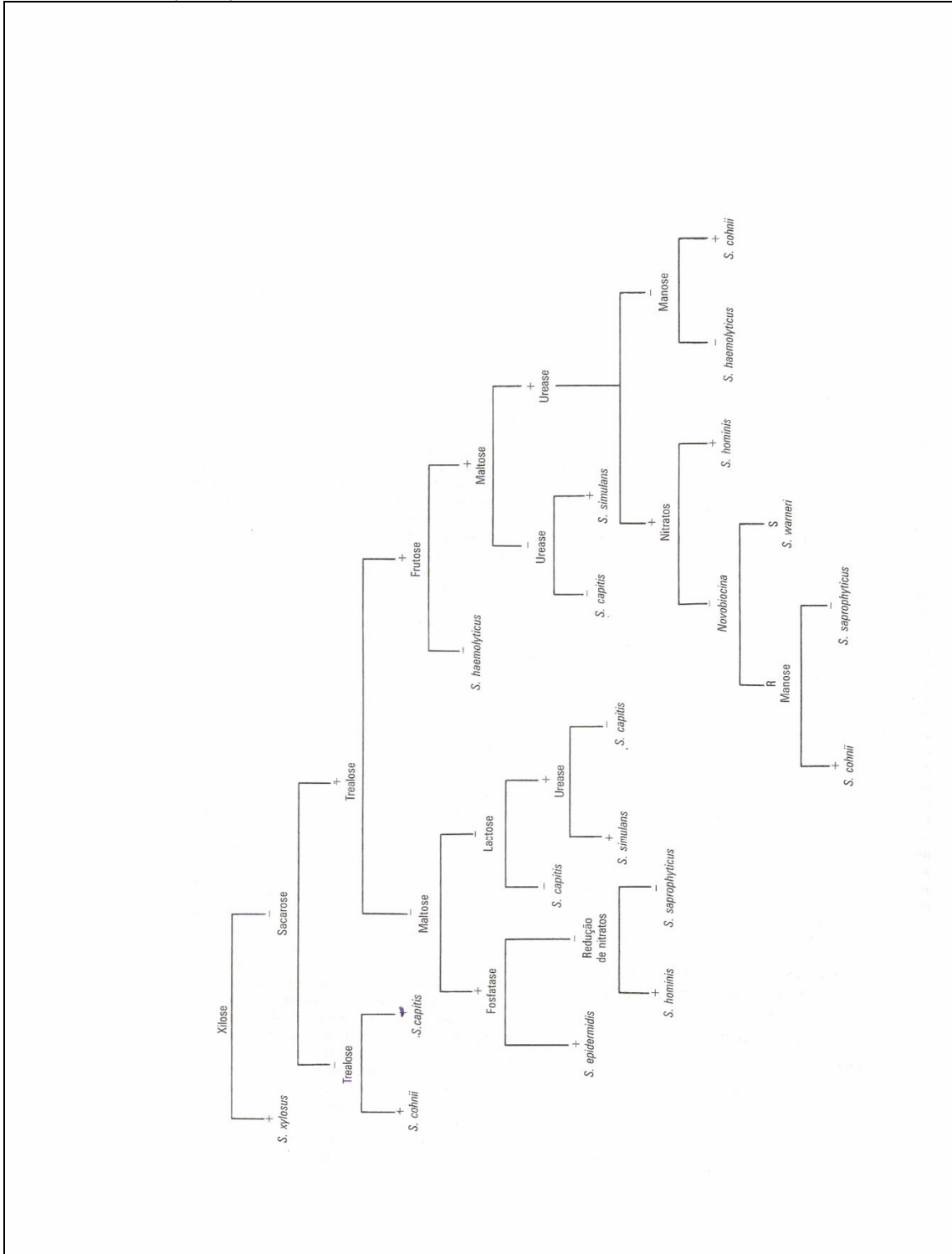
ZHANEL G.G., KARLOWSKY J.A., SAUNDERS M.H., DAVIDSON R.J., HANCOCK R.E.W., MCLEAN I. & NICOLLE L.E. Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.39, p.489-495, 1995.

ZOCHE, F.; BASTOS, C.P.; FRANÇA, R.C.; SILVA, W. P. *Staphylococcus aureus* Enterotoxigênicos em Queijo Tipo Minas Frescal: Detecção Por PCR. Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2006.

ZSCHÖCK, M.; BOTZLER, D.; BLÖCHER, S.; SOMMERHÄUSEN, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v.10, p.569-574, 2000.

ANEXO 01

Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos, segundo Koneman et al. (2008).



ANEXO 2

Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2) com intervalo de segurança de 95%:

1. Teste comparativo entre a difusão em disco simples com oxacilina e a presença do gene *mecA*:
p-value = 0.009021

2. Teste comparativo entre o ágar screen e a presença do gene *mecA*:
p-value = 0.01338

3. Teste comparativo entre o teste difusão em disco modificada e a presença do gene *mecA*:
p-value = 0.01898

4. Teste comparativo entre a microdiluição em ágar e a presença do gene *mecA*:
p-value = 0.0009312

5. Teste comparativo entre o teste microdiluição em caldo e presença do gene *mecA*:
p-value = 0.6039

6. Teste comparativo entre a difusão em disco simples com cefoxitina e a presença do gene *mecA*:
p-value = 6.954e-07