

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação das Espécies e Perfil de Suscetibilidade aos  
Antimicrobianos de *Staphylococcus* Isolados de Leite de  
Ovelha**

**Gabriela Viana da Silva**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus* ISOLADOS DE LEITE DE  
OVELHA**

**GABRIELA VIANA DA SILVA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Norma dos Santos Lázaro**

*e Co-orientação da Professora*

**Dália dos Prazeres Rodrigues**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Março de 2012

637.1277

S586a

T

Silva, Gabriela Viana da, 1986-  
Avaliação das espécies e perfil de  
susceptibilidade aos antimicrobianos de  
Staphylococcus isolados de leite de ovelha/  
Gabriela Viana da Silva. - 2012.  
87 f.: il.

Orientador: Norma dos Santos Lázaro.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Bibliografia: f. 51-72.

1. Leite - Microbiologia - Teses. 2.  
Leite como alimento - Teses. 3. Leite -  
Derivados - Teses. 4. Ovinos - Teses. I.  
Lázaro, Norma dos Santos, 1949- II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência  
e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

GABRIELA VIANA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/03/2012

*Norma dos Santos Lázaro*

\_\_\_\_\_  
D.Sc. Norma dos Santos Lázaro UFRRJ/FIOCRUZ  
Orientadora

*Ingrid Annes Pereira*

\_\_\_\_\_  
D.Sc. Ingrid Annes Pereira – FIOCRUZ

*Maria da Conceição E. Vianni*

\_\_\_\_\_  
D.Sc. Maria da Conceição E. Vianni - UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu pai Gabriel Henrique da Silva que sempre me incentivou a seguir a vida acadêmica e por ser meu exemplo de profissional e pessoa, se cheguei até aqui é por causa dele.

À minha mãe Maria José Viana que sempre me apoiou e me deu a base para que pudesse estudar.

Ao meu noivo Alexandre Araujo Ribeiro Freire por ter estado comigo todos esses anos, sempre me apoiando, me dando carinho e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar onde estou agora por ter estado em todos os momentos de minha vida, me guiando e iluminando meu caminho.

À UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO por ter me abrigado por todos esses anos, desde os tempos da graduação, por toda sua beleza e por tudo que representa na minha vida.

À FIOCRUZ por ter me cedido o espaço para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À minha orientadora NORMA DOS SANTOS LÁZARO por me ter acolhido como orientada, por toda a paciência e dedicação comigo e com este trabalho.

À minha co-orientadora Dália dos Prazeres Rodrigues por ter dividido comigo um pouco do seu vasto conhecimento e pelas dicas valiosas.

À Carla da Clínica de Bovinos da Universidade Federal de Pernambuco por ter cedido as cepas que utilizadas neste trabalho.

À Ingrid Annes Pereira por toda ajuda e paciência em me ensinar as técnicas, pela amizade e pelas conversas.

À todos do LABENT por terem me acolhido, pela colaboração e pelos momentos de descontração.

Aos meus professores da Pós-Graduação por todos os ensinamentos não só profissionais, mas também de vida.

## RESUMO

SILVA, Gabriela Viana. **Avaliação das Espécies e Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos de *Staphylococcus* Isolados de Leite de Ovelha.** 2012. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A produção de leite ovino no Brasil é uma atividade relativamente nova, cuja produção está direcionada para a confecção de queijos, iogurtes e outros derivados. Com isso há uma deficit de trabalhos científicos ligados a esta atividade. Considerado um excelente substrato, muitos micro-organismos patogênicos podem ser veiculados ao homem através do consumo de leite e seus derivados, entre eles *Staphylococcus* spp., um dos principais agentes envolvidos em surtos de intoxicações alimentares. Além disso, o crescente aumento da resistência aos antimicrobianos vem se constituindo um problema de saúde pública global. Dentro desta problemática, o presente estudo objetivou identificar as espécies de *Staphylococcus* e seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de uso corrente em medicina humana e veterinária, isoladas de leite de origem ovina provenientes de propriedades rurais no Agreste Meridional de Pernambuco. Foram identificadas 13 espécies diferentes, sendo três do grupo *Staphylococcus* coagulase-positivo e 10 de *Staphylococcus* coagulase-negativo e duas cepas identificadas apenas como SCN, destacando-se por sua frequência *Staphylococcus aureus* (29) seguida pelo *S. chromogenes* (15) e *S. intermedius* (9). A determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos pelo teste disco difusão revelou elevados percentuais de resistência à penicilina (53,2%) e ampicilina (45,6%). A suscetibilidade a oxacilina foi avaliada através dos métodos de disco-difusão para oxacilina e cefoxitina, *Screen Agar* e determinação da Concentração Inibitória Mínima através dos testes de Microdiluição em Caldo e em Agar, tendo estes dois últimos detectado resistência em 24% e 6% dos isolados, respectivamente. Todos os isolados foram negativos para a presença dos genes *blaZ* e *mecA*, não tendo sido observada uma correlação entre os testes fenotípicos e genotípicos para a resistência aos beta-lactâmicos. Os resultados obtidos evidenciam que esta espécie animal é mais uma fonte de infecção e veiculadora, através de seus produtos, de *Staphylococcus* potencialmente patogênicos para o homem.

**Palavras-chave:** gene *mecA*, resistência bacteriana, oxacilina

## ABSTRACT

SILVA, Gabriela Viana. **Evaluation of the Species and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus* Isolated from Sheep Milk**. 2012. 77p. Dissertation (Master of Science and Food Technology, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The sheep milk production in Brazil is a relatively new activity, whose production is directed towards the manufacture of cheeses, yogurts and other products. Therewith a deficit of scientific papers related to this activity. Considered an excellent substrate, many pathogens can be transmitted to humans through consumption of milk and its derivatives, including *Staphylococcus* spp., one of the main agents involved in outbreaks of food poisoning. Moreover, the increasing of antimicrobial resistance is becoming a global public health problem. Within this problematic, this study aimed to identify the species of *Staphylococcus* and its antimicrobial susceptibility profile of current use in human and veterinary medicine, isolated from milk of sheep origin from rural properties in the Meridional Agreste of Pernambuco. We identified 13 different species, three coagulase-positive and 10 coagulase-negative and two strains identified only as SCN, especially *Staphylococcus aureus* (29) followed by *S. chromogenes* (15) and *S. intermedius* (9) by its frequency. The determination of antimicrobial susceptibility by disk diffusion revealed high rates of resistance to penicillin (53.2%) and ampicillin (45.6%). The susceptibility to oxacillin was evaluated by the disk diffusion methods for oxacillin and cefoxitin, *Screen Agar* and determination of Minimum Inhibitory Concentration through tests of broth microdilution and agar, the latter two detected resistance in 24% and 6% of isolates, respectively. All isolates were negative for the presence of *blaZ* and *mecA* genes and was not observed a correlation between phenotypic and genotypic testing for resistance to beta-lactams. The results show that this species is a source of infection, through its products, *Staphylococcus* potentially pathogenic to humans.

Keywords: *mecA*, bacterial resistance, oxacillin

## LISTA DE ABREVIACÕES

ATTCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
LRNEB	Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MRS	<i>Staphylococcus</i> spp resistente a meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina sensível
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PBPs	Penicillin Binding Protein (Proteína Ligante de Penicilina)
PBP2a	Proteína Ligante de Penicilina alterada
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
RNA	Ácido Ribonucleico
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico mec
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Frequência da produção de hemolisina pelas 79 cepas *Staphylococcus* spp..... Pag 29
- FIGURA 2 - Imagem de padrões de hemólise apresentados pelas cepas de *Staphylococcus*.....Pag 30
- FIGURA 3 - Positividade das cepas de *Staphylococcus* no teste do sinergismo hemolítico.....Pag 32
- FIGURA 4 - Percentuais de resistência apresentados por *Staphylococcus* coagulase-positivo (40 cepas) e *Staphylococcus* coagulase-negativo (39 cepas).....Pag 34
- FIGURA 5 - Frequência e distribuição dos marcamos de resistência de acordo com as espécies de *Staphylococcus*. .....Pag 36
- FIGURA 6 - Distribuição das cepas de *Staphylococcus* de acordo com a resistência a diferentes classes de drogas.....Pag 39
- FIGURA 7 - Perfis de suscetibilidades das 79 cepas de *Staphylococcus* spp. em relação a produção de beta-lactamase através do método da cefalosporina cromogênica em disco (Nitrocefim®).....Pg 40
- FIGURA 8 - Frequência das espécies de *Staphylococcus* produtoras de beta-lactamase através do método da cefalosporina cromogênica em disco (Nitrocefim®).....Pag 41
- FIGURA 9 - Frequência e distribuição das espécies de *Staphylococcus* resistentes nos testes de Microdiluição em Caldo e Microdiluição em Agar.....Pag 43
- FIGURA 10 - Imagem de uma placa para microtitulação revelando a Concentração Inibitória Mínima em *Staphylococcus* spp. através da técnica de Microdiluição em Caldo.....Pag 44
- FIGURA 11 - Imagem revelando a Concentração Inibitória Mínima em *Staphylococcus* spp. através da técnica de Diluição em Agar.....Pag 44
- FIGURA 12 - Amplificação do fragmento correspondente ao gene *mecA*.....Pag 47

## LISTAS DE TABELAS

- TABELA 1 - Drogas utilizadas para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana e padrões de interpretação.....Pag 21
- TABELA 2 - Frequência e distribuição das espécies de *Staphylococcus* isoladas do leite de ovelha.....Pag 26
- TABELA 3 - Frequência da produção de hemolisina de acordo com as espécies de *Staphylococcus*.....Pag 31
- TABELA 4 - Suscetibilidade aos antimicrobianos apresentada pelas 79 cepas de *Staphylococcus* no teste de Disco-difusão..... Pag 33
- TABELA 5 - Susceptibilidade das espécies de *Staphylococcus* frente às diferentes drogas antimicrobianas.....Pag 35
- TABELA 6 - Modelos de suscetibilidade apresentados pelas 79 cepas de *Staphylococcus* SCP e SCN.....Pag 38
- TABELA 7 – Percentual de suscetibilidade a oxacilina nos testes fenotípicos.....Pg 42
- TABELA 8 - Frequência e distribuição das cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo e *Staphylococcus* coagulase-negativo, de acordo com o antibiograma e resistência a oxacilina na determinação da Concentração Inibitória Mínima em caldo e em Agar.....Pag 43

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Importância do Leite como Alimento.....	3
2.2 Leite Ovino na Indústria.....	4
2.3 Caracterização e Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. ....	5
2.4 Características Epidemiológicas e de Patogenicidade.....	7
2.5 Epidemiologia da Resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp.....	10
2.6 Mecanismos de Resistência dos <i>Staphylococcus</i> aos Antibióticos Beta-lactâmicos.....	12
2.7 Mecanismo de Regulação do Gene <i>mecA</i> .....	14
2.8 Métodos de Detecção da Resistência à Meticilina.....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 Amostragem do Estudo.....	18
3.2 Procedimentos Laboratoriais.....	18
3.3 Caracterização Fenotípica da Suscetibilidade aos Antimicrobianos.....	20
3.4 Caracterização Genotípica da Resistência Antimicrobiana através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	23
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
4.1 Identificação das Espécies.....	25
4.2 Produção de Hemólise.....	29
4.3 Perfil de Resistência aos Antimicrobianos através da técnica de disco difusão .....	33
4.4 Avaliação Fenotípica da Produção de Beta-lactamases.....	40
4.5 Avaliação Fenotípica da Suscetibilidade à Oxacilina.....	42
4.6 Caracterização Genotípica da Resistência aos Beta-lactâmicos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	46
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
<b>ANEXOS</b> - Provas Bioquímicas para Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	73
ANEXO A - Provas Bioquímicas para Identificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos.....	73
ANEXO B - Provas Bioquímicas para Identificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos.....	76

## 1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura de leite vem, nos últimos anos, conquistando espaço como uma alternativa de produtores rurais, propiciando a diversificação e maior sustentabilidade das propriedades, destacando-se no Brasil, a região Nordeste por possuir um dos maiores contingentes de ovino do país.

O leite de ovelha é considerado o mais rico de todos os leites utilizados em laticínios. Mundialmente, é muito apreciado não somente pelas qualidades gastronômicas, mas também, por sua inocuidade para pessoas que possuem intolerância à lactose do leite da vaca. Entretanto seu mercado ainda é muito pouco difundido no Brasil, já que seu consumo *in natura* é praticamente inexistente e sua produção está direcionada principalmente para a confecção de queijos, iogurtes e outros derivados, tendo o dobro do rendimento na produção de queijo, em comparação com o leite de vaca.

Características peculiares desse leite, como a presença de níveis elevados de gordura e de caseína, favorecem a elaboração de diferentes tipos de queijos, com particularidades especiais de textura e sabor, o que confere aos produtos aromas e sabores especiais, como os queijos Roquefort, Pecorino Romano e Azeitão.

Conseqüentemente, o progresso da ovinocultura de leite no Brasil vem proporcionando uma crescente necessidade de elaborar avaliações específicas que forneçam dados para um balizamento de medidas de controle microbiológico de qualidade para esses produtos, por ser o leite um bom substrato para o desenvolvimento de diversos micro-organismos. Outrossim, não é raro o envolvimento de produtos lácteos em surtos de infecções alimentares em todo o mundo.

Um grande número de micro-organismos patogênicos podem estar sendo transmitidos ao homem tendo o leite como veículo, entre eles *Staphylococcus* spp., um dos principais agentes na epidemiologia da mastite em ovelhas. Nestas, a redução na produção de leite é considerada o fator individual mais importante das perdas econômicas da mastite, onde cerca de dois terços correspondem às infecções sub-clínicas, as quais não são facilmente detectadas, no entanto compromete a produção do animal.

Um fator agravante é o fato de que os *Staphylococcus* spp. apresentam mecanismos de virulência complexos que tornam sua erradicação difícil. Nas últimas décadas houve um aumento do número de infecções persistentes relacionadas com *Staphylococcus*, tanto em animais quanto em humanos face aos mecanismos de resistência desenvolvidos por esta bactéria.

O uso indiscriminado de antimicrobianos em animais produtores de alimentos seja com finalidade terapêutica, profilática ou como promotores de crescimento facilita a seleção de cepas resistentes e possibilidade de transferência da resistência entre espécies, através de mecanismos genéticos. Além disso, o crescente aumento da resistência aos antimicrobianos particularmente a drogas de última geração vem se constituindo um problema de saúde pública global, representando um dos principais componentes dos custos diretos em saúde.

Dentro desta problemática, *Staphylococcus* spp. resistentes à metilicina (MRS) se destacam, uma vez que apresentam resistência a maioria dos antimicrobianos disponíveis no comércio, tornando difícil o tratamento e controle das infecções causadas por esses micro-organismos.

Considerando a magnitude com que as doenças de origem alimentar ocorrem nos países desenvolvidos e emergentes e a importância que os animais assumem, através de seus produtos, na disseminação deste micro-organismo, torna-se de grande relevância conhecer as espécies circulantes de *Staphylococcus*, em ovinos em nosso país.

Considerando ainda a possibilidade de transmissão zoonótica de cepas de *Staphylococcus* resistentes a oxacilina, droga de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas graves no homem, aponta-se para a necessidade de monitorar os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, deste micro-organismo.

Em seu conjunto, tais informações certamente, vêm a constituir-se um aspecto de extrema relevância, auxiliando ações da Vigilância bem como ofertando informações que possam auxiliar na adoção de medidas de controle da resistência antimicrobiana relacionada à utilização de antimicrobianos em animais produtores de alimentos.

Assim o presente estudo teve por objetivos identificar as espécies de *Staphylococcus* ocorrentes em leite de ovelhas e determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados na prática clínica humana e veterinária. Adicionalmente, objetivou-se:

- Detectar por testes fenotípicos a produção de coagulase e hemolisinas;
- Caracterizar fenotipicamente a resistência a oxacilina mediada por gene *mecA*;
- Caracterizar fenotipicamente a produção de beta-lactamases;
- Caracterizar por método genotípico (PCR) a presença de gene *mecA* em cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas e negativas.
- Caracterizar por método genotípico (PCR) a presença do gene *blaZ*, para a produção de beta-lactamases em cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas e negativas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Importância do Leite como Alimento

O leite tem por definição o produto integral da ordenha total e ininterrupta de uma fêmea leiteira sadia, bem nutrida e não fatigada, que assegura a subsistência na primeira fase da vida, graças a riqueza de constituintes. Sua composição varia com a espécie, raça, individualidade, alimentação, tempo de gestação e muitos outros fatores (BRASIL, 2002).

O leite e seus derivados são conhecidos desde a pré-história, quando o homem domesticou alguns animais. Essa domesticação iniciou-se entre 10.000 e 6.000 a.C. (ALEIXO, 2000).

Na antiguidade, a necessidade de sobrevivência fez com que o homem identificasse a importância do leite e de pelo menos dois de seus derivados, a manteiga e o queijo, como importantes fontes nutricionais (LEITE et al., 2006).

Constitui-se uma fonte de macro e micro nutrientes essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e uma das principais fontes de proteínas de origem animal a humanos de todas as idades, particularmente jovens (PEREIRA, 2003). É também uma excelente fonte de cálcio, sendo que o consumo de um copo de leite (cerca de 250 ml) corresponde a 32% da ingestão diária recomendada (IDR) deste mineral, essencial na composição dos ossos (SILVA et al., 2001).

O leite de ovelha difere das demais espécies especialmente pela riqueza dos constituintes, existindo diferença entre os rebanhos. (ASSENAT, 1991). Muitos fatores contribuem nas variações da composição e na qualidade do leite de ovelhas, entre os quais estão o ambiente, a raça, a idade, o estágio da lactação, o nível nutricional e as técnicas de ordenha (BENCINE & PULINA, 1997; PEETERS et al., 1992).

Comparando ao leite das demais espécies, o leite ovino caracteriza-se principalmente por possuir elementos mais ricos em sua composição (BRITO, 2004). A composição média do leite de ovelha é de 7,6% de gordura, 5,6% de proteína, 19,0% de sólidos totais, 10,3% de sólidos desengordurados, 4,7% de lactose e 4,6% de caseína (BENCINI & PURVIS, 1990; JANDAL, 1996; NUDDA et al., 2002; SEVI et al., 2004; SILVA, 2003; ZAMIRI et al., 2001). Essa característica lhe confere a capacidade de ser transformado em produtos lácteos de alta qualidade com altos rendimentos por litro de leite (BENCINI & PULINA, 1997).

A alta concentração de sólidos totais (McKUSICK et al., 2002) e níveis elevados de gordura e de caseína são fatores importantes na elaboração de queijos duros e macios, com características particulares de textura e sabor e com alto valor de mercado (TIMPERLEY & NORMAN, 1997).

Segundo Furtado (2003), o leite de ovelha apresenta a peculiaridade de não ter caroteno em sua gordura, o que lhe proporciona brancura típica. De acordo com esse autor, a gordura do leite de ovelha, se comparada à do leite de vaca, apresenta maior quantidade de determinados ácidos graxos de cadeia curta, como o capríico (hexanóico), caprílico (octanóico) e cáprico (decanóico).

Jandal (1996), ao estudar os aspectos comparativos dos leites de cabra e ovelha, descreveu que o leite ovino possui maior teor de gordura, sólidos desengordurados, proteína, caseína e cinzas quando comparado com o de cabra. Estas diferenças fazem com que o tempo de coagulação do leite de ovelha seja menor e o coalho mais firme, principalmente em decorrência da quantidade de caseína.

Outra peculiaridade é o menor diâmetro dos glóbulos de gordura no leite ovino (4µm x 4,4µm) que no leite bovino, o que lhe confere maior digestibilidade em humanos (PULINA &

NUDDA, 2004). A maior concentração de minerais no leite ovino do que no bovino (0,92% x 0,72%), principalmente cálcio, confere ao leite ovino maior poder tampão e, conseqüentemente, pH levemente mais básico (PULINA & NUDDA, 2004).

## 2.2 Leite Ovino na Indústria

A composição físico-química do leite tem importância fundamental para a indústria, visto que o rendimento na produção de lácteos é dependente do conteúdo de gordura e de sólidos não gordurosos. Diante disso, a maior parte dos países tem buscado executar programas de pagamento por qualidade do leite de vaca, baseando-se no nível de contaminação microbiana, contagem de células somáticas, teores de gordura e de sólidos não gordurosos, presença de inibidores e outros parâmetros (CEBALLO, 1999). Da mesma forma, este programa também é desenvolvido em países como a França que tem a produção de leite de ovelha como uma importante atividade do setor primário.

Mundialmente o leite ovino é muito apreciado não somente pelas qualidades gastronômicas, mas também pela sua inocuidade para pessoas que possuem intolerância à lactose do leite de vaca. O leite ovino tem o dobro do rendimento na produção de queijo, em comparação com o leite de vaca ou de cabra. O iogurte é mais fino, mais leve e em torno de 50% mais nutritivo (BRITO, 2004).

Com exceção de algumas situações de subsistência em que o leite é consumido *in natura*, a maior parte do leite de ovelha obtido é transformado em queijo e, em menor escala, em iogurte. Mais concentrado que o leite de vaca e cabra, o leite de ovelha é indicado para fabricação de queijos com aromas e sabores especiais, famosos e de alto valor comercial no mundo inteiro, como o Roquefort e o Gorgonzola (SOUZA et al., 2005).

Durante muitos anos, a ordenha era feita manualmente, o que exigia esforço físico e, frequentemente, era realizada ao ar livre, expondo os ordenhadores ao tempo e prejudicando a qualidade microbiológica do leite. Atualmente, é possível encontrar ordenhadeiras específicas para a espécie no mercado (BRITO, 2004).

Com o avanço da ciência tem sido possível melhorar a tecnologia da indústria de laticínios no Brasil. As modificações no processo de pasteurização do leite, a melhoria da qualidade do rebanho e a adoção de boas práticas de higiene, desde a ordenha até as diferentes etapas do processamento industrial, para a obtenção dos produtos desejados, formam um conjunto que assegura leite e derivados de qualidade (LEITE et al., 2006).

Atualmente a ovinocultura encontra-se difundida em praticamente todo o mundo, sendo uma das principais atividades econômicas de vários países, dentre os quais se destacam a Austrália e a Nova Zelândia (MACEDO Jr., 2004).

No Brasil, a busca por novas alternativas para a produção primária e a necessidade de sistemas de produção intensivos para a pequena propriedade, despertou interesse dos investidores em ovinocultura, especialmente a leiteira (BRITO, 2004).

De acordo com o PPM/IBGE, 2011, o efetivo de ovinos em 2010, 17,4 milhões de cabeças, teve aumento de 3,4% comparativamente a 2009. O maior efetivo de ovinos encontrava-se no Nordeste, 56,7% do total nacional.

A produção e o processamento industrial de leite de ovelhas ainda são pouco desenvolvidos no Brasil. Rohenkohl et al. (2011) estimou um processamento nacional de aproximadamente 509.000 litros por ano, o que representa a apenas 0,0019% do total de leite produzido no Brasil enquanto o leite de cabras representou em 2007 um total de 136,5 mil toneladas (FAO, 2011), o que corresponde a apenas 0,5% do total de leite produzido no Brasil

(considerando vacas, cabras e ovelhas). Esta produção está concentrada principalmente nos Estados da Região Nordeste, Sul e Sudeste.

As características geográficas do Nordeste brasileiro o colocam como região vocacionada para produção de caprinos e ovinos, não só por deter grande parte do rebanho nacional, mas principalmente pela importância sócio-econômica que esta atividade representa (MEDEIROS, 1998).

A produção de leite ovino pode ser uma alternativa sustentável, de baixo investimento e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais, cuja utilização desta valiosa matéria-prima para fabricação de derivados de leite, pode aumentar o retorno financeiro do ovinocultor (SOUZA et al., 2005).

### **2.3 Caracterização e Identificação de *Staphylococcus* spp.**

O gênero *Staphylococcus* foi proposto em 1884 por Rosenbach e inserido dentro da família Micrococaceae. Estudos de biologia molecular, perfis de ácidos graxos, composição de parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S promoveram a inclusão do gênero *Staphylococcus* em uma nova família, a Staphylococcaceae (GARRITY, 2006). Atualmente já são descritas 46 espécies e 24 subespécies dentro do gênero (EUZÉBY, 2012).

Os estafilococos são classificados como cocos Gram-positivos os quais quando visualizados ao microscópio aparecem predominantemente em forma de cachos de uva irregulares (*staphyle* em grego significa cacho de uva), por se dividirem em planos diferentes, porém ocorrem na forma de células isoladas, aos pares, em tétrades e em cadeias curtas. São anaeróbicos facultativos, porém crescem melhor em atmosfera aeróbica, imóveis, não esporulados e produtores da enzima catalase, uma prova importante para diferenciá-lo dos *Streptococcus*, catalase negativos (KONEMAN et al., 2008).

Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos. Podem crescer em temperaturas de 7 a 48<sup>o</sup>C, tendo como temperatura ótima de 30<sup>o</sup>C a 37<sup>o</sup>C (BERGEY'S, 1994). Crescem em 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). Dentre as bactérias não esporuladas, os estafilococos são os mais resistentes ao meio ambiente e podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e toleram elevadas concentrações de cloreto de sódio (KLOSS & BANNERMAN, 1994).

A parede celular das bactérias Gram positivas, como os estafilococos, tem como principal função a proteção contra a lise osmótica. Pela sua natureza confere forma, rigidez e funciona como uma barreira em relação ao meio externo. O principal componente da estrutura química da parede celular dos estafilococos é o peptidoglicano, um polímero que consiste em longas cadeias de glicídios com ligações cruzadas flexíveis de peptídeos que forma uma estrutura forte, mas elástica (SCHEFFERS, 2005). Desta maneira, o peptidoglicano forma uma rede covalentemente fechada, como um corpo oco, ao redor da bactéria (HOLTJE, 2001). Estes são ligados entre si por reações de transpeptidação e os dissacarídeos são polimerizados ao longo da cadeia do glicano por reações de transglicosilação. (GIESBRECHT, 1998).

Como as exigências nutricionais são poucas, os *Staphylococcus* spp. crescem bem nos meios de cultura comuns como o caldo e Agar simples. As colônias em meios sólidos são redondas, lisas, elevadas e brilhantes. Algumas cepas de *S. aureus* produzem um pigmento carotenóide (amarelo ou amarelo alaranjado “dourado”) em aerobiose, enquanto outras podem produzir colônias esbranquiçadas ou cinza.

Em meios enriquecidos como Agar sangue de carneiro, algumas cepas de *S.aureus* e algumas espécies coagulase-negativas podem apresentar um halo de hemólise ao redor das colônias.

A capacidade de se desenvolver em meios contendo alta concentração de NaCl, além de possuírem certa tolerância ao telurito de potássio, cloreto de lítio são aproveitadas para o preparo de meios seletivos. O Agar Manitol Salgado assim como o Agar Baird-Parker, contendo telurito de potássio, são meios seletivos para isolamento e contagem de estafilococos em alimentos e amostras clínicas (FDA, 2001; KONEMAN et al., 2008).

Com base nas características coloniais e morfo-tintoriais (Método de Gram), os isolados são submetidos às provas de catalase e coagulase (CUNHA et al., 2002). A prova da catalase é um teste importante na identificação das famílias Staphylococcaceae e Micrococcaceae (catalase positivos) e Streptococcaceae (catalase negativo) (EUZÉBY, 2012; ROSA, 2008).

O gênero *Staphylococcus* é diferenciado do gênero *Micrococcus* com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência a bacitracina (0,04U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm (CUNHA et al., 2002).

De uma maneira prática, os estafilococos são divididos em duas categorias: *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) de acordo com a resposta ao teste da plasmó coagulase. A maioria das espécies são coagulase-negativa, caracterizando-se a exclusividade da síntese da enzima ao *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S.lutrae* e *S. delphini*, enquanto *S.hyicus* e *S. agnetis* são variáveis (EUZÉBY, 2012).

Para identificação dos *Staphylococcus*, conforme esquema fenotípico simplificado de provas bioquímicas, o protocolo estabelecido segue critérios e padrões propostos por Kloss e Bannerman (1994) e Cunha et al. (2002), os quais preconizam a realização de teste de fermentação de açúcares: xilose, arabinose, sacarose, trealose, manitol, maltose, lactose, xilitol, ribose e frutose, bem como caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase e resistência a novobiocina.

Apesar da relevância das infecções causadas pelos SCN, a caracterização das espécies não é realizada de forma rotineira em laboratórios de microbiologia clínica. O esquema proposto por Kloss & Schleifer (1975) e modificado por Bannerman (2003) é o método usado, porém é relativamente laborioso, pois são necessários inúmeros testes bioquímicos para a identificação. Na maioria das análises de rotina, os testes realizados para a identificação dos estafilococos são baseados nos aspectos morfológicos das colônias, coloração de Gram e produção de coagulase, o que permite apenas classificar estafilococos coagulase negativa (SCN) ou em *S. aureus* (CUNHA et al., 2004).

Atualmente métodos bioquímicos efetivos e rápidos têm sido utilizados em substituição às provas bioquímicas tradicionais (WIESER & BUSSER, 2000). No entanto, a acurácia desses métodos pode ser reduzida para isolados de origem animal, uma vez que eles são desenvolvidos, em geral, para isolados de origem humana (SAMPIMON et al., 2009).

Em amostras clínicas humanas, a detecção da coagulase é suficiente para a identificação e distinção de *S. aureus* dos estafilococos coagulase negativos. No entanto, esse procedimento fenotípico não diferencia *S. aureus* das outras espécies coagulase positivas do gênero. Para amostras veterinárias, essa distinção é importante para evitar falsas identificações de *S. aureus*, uma vez que *S. intermedius* e cepas de *S. hyicus*, também coagulase positivos, são frequentemente isolados de várias espécies animais (ALMEIDA, 2009).

## 2.4 Características Epidemiológicas, Clínicas e de Patogenicidade

O gênero *Staphylococcus* está associado a infecções que acometem tanto humanos quanto animais (ANNEMULLER et al., 1999). Amplamente disseminados no ambiente, diversas espécies pertencentes ao gênero estão presentes na pele e mucosas de mamíferos, sendo que a maioria dos portadores encontra-se na condição de assintomáticos. Portanto, seres humanos e outros animais podem veicular os micro-organismos para os alimentos, com atenção especial para o leite e seus derivados, a qual surge em diferentes fases da cadeia alimentar. Principais fontes de contaminação de leite cru nas explorações agrícolas são as superfícies mucosas, a pele animal, glândulas infectadas, equipamentos de ordenha, as mãos dos ordenhadores e o meio ambiente visto que vários fatores como uso de ordenha manual, falhas na higiene dos animais e equipamentos, bem como ausência de programas de controle de mastite, ainda ocorrem em muitos rebanhos (ASSUMPCÃO et al., 2003; BERGONIER et al., 2003).

De um modo geral, os produtos lácteos são produzidos a partir de leite pasteurizado e sendo assim, não deveriam apresentar nenhum micro-organismo patogênico. Porém, pode haver recontaminação pós-pasteurização durante ou após o processamento, utilização de equipamentos com deficiente sanitização e/ou quando acondicionados, após preparo, em temperaturas inadequadas e/ou durante o período de transporte (CHARLIER et al., 2009; CORBIA et al., 2000; PICOLI et al., 2006).

Segundo Picoli et al. (2006), os *Staphylococcus* podem ser introduzidos no alimento sob várias formas, entre as quais o ato de o manipulador levar a mão à boca ou nariz, assim como, por lesões estafilocócicas presentes na pele do funcionário que trabalha diretamente com alimento.

O gênero *Staphylococcus* é o agente responsável por aproximadamente 45% das intoxicações de origem alimentar no mundo. A contaminação com *Staphylococcus* spp., pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento por cepas, de origem ambiental ou humana. Em condições favoráveis de temperatura, o micro-organismo cresce, podendo produzir toxinas. *Staphylococcus* é um agente causal de mastite no rebanho leiteiro, podendo ser encontrado no leite, onde níveis elevados de contaminação podem ser rapidamente alcançados se as condições para a sua multiplicação forem favoráveis (FDA/CFSAN, 2003).

Durante seu crescimento no leite, cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas estão aptas a produzir enterotoxinas termoestáveis, que quando ingeridas pelo homem causam náusea, vômito e diarreia (SILVA et al., 2000). A toxina é produto da multiplicação da bactéria nos alimentos deixados em temperaturas inadequadas (FDA/CFSAN, 2003). O controle da enterotoxiose é possível desde que se observem as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos, pois a proteção contra esta enfermidade é considerada uma obrigação dos profissionais das áreas de alimentos e saúde (STANFORD, 2006). Embora o *Staphylococcus aureus* seja a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, *S. intermedius* e *S. hyicus* também podem produzir enterotoxinas e já foram envolvidos em surtos (SILVA & GANDRA, 2004).

*S. aureus* é talvez, o patógeno de maior preocupação devido à virulência intrínseca, à diversidade de infecções potencialmente fatais e à sua capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais, mas a incidência de infecções causadas por estafilococos coagulase-negativos vem aumentando em todo o mundo (SAKAI, 2004).

Trinta e sete espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa são conhecidas (EUZÉBY, 2012). Este grupo está amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado no solo, água, plantas e na microbiota do trato intestinal, pele e mucosas de humanos e animais. Entre as infecções causadas por esses micro-organismos, destacam-se: infecções de trato respiratório, vias urinárias, sítio cirúrgico, principalmente no ambiente hospitalar (VON EIFF et al., 2002). Em infecções de corrente circulatória de origem nosocomial em pacientes debilitados, especialmente em unidades de tratamento intensivo (UTI), os SCN podem ser isolados em até 76% das hemoculturas (HUANG et al., 2003).

Seu principal representante é o *S. epidermidis*, agente de infecções de cateteres e próteses, frequentemente isolado em hemoculturas e identificado como uma das causas principais de infecções nosocomiais associadas aos biofilmes. O *S. saprophyticus* apresenta-se como um importante agente de infecção urinária em mulheres jovens, enquanto que vários isolados de *S. haemolyticus* são resistentes a diversos antimicrobianos, e podem ser confundidos com o *S. aureus*, por apresentarem hemólise na placa de ágar sangue de carneiro. Além desses são espécies importantes no laboratório clínico: *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. caseolyticus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. delphini*, *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. gallinarum*, *S. klossii*, *S. equorum*, *S. arletta*, *S. capitis*, *S. warnei*, *S. saccharolyticus*, *S. caprae*, *S. auricularis* (ANVISA, 2004; SAKAI et al., 2004).

A maioria dessas espécies é residente no homem, entretanto *S. xylosus* e *S. simulans* são usualmente transitórios no homem e são adquiridos primariamente dos animais domésticos e seus produtos. Por outro lado algumas das espécies humanas são transitórias ou residentes temporários em animais domésticos. *S. aureus* é a maior espécie (residente e transitória) para primatas, enquanto ecovares ou biotipos podem ser encontrados ocasionalmente vivendo em diferentes animais domésticos e aves (DEVRIESE, 1984).

Um aspecto importante do *Staphylococcus aureus* é o estabelecimento de uma relação comensal com os seres humanos, com a colonização assintomática de indivíduos. As narinas são o local de colonização mais frequente, mas a orofaringe, as axilas, o períneo, a vagina, o trato digestivo e a pele (principalmente com solução de continuidade) também são colonizados com frequência (WERTHEIM et al., 2005).

Ainda que não esclarecido totalmente, já foram identificados diversos fatores da bactéria e do hospedeiro associados à colonização (VAN BELKUM et al., 2009). Usualmente, o *Staphylococcus aureus* atinge as narinas através das mãos contaminadas no meio ambiente, e fatores da bactéria associados à capacidade em aderir às células do hospedeiro e evadir do sistema imunológico não são ainda completamente entendidos, porém constituem a base para manter a colonização pela bactéria (GORDON & LOWY, 2008; WERTHEIM et al., 2005).

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. *S. aureus* sempre foi a espécie do gênero mais importante relacionada a uma série de infecções e intoxicações em humanos nos animais. Vários fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções causadas pelo micro-organismo. Seus atributos de virulência são descritos em 3 categorias: enzimas (catalase, hialuronidase, nucleases, lactamase (penicilinase), lipases, coagulase), toxinas (hemolisinas, leucocidina, enterotoxinas, toxina esfoliativa, toxina da síndrome do choque tóxico) e estruturas de superfície (Proteína A, cápsula, adesinas), fatores estes indicativos do potencial de capacidade de produzir doenças, sendo alguns, marcadores de espécie (BANNERMAN, 2003).

As hemolisinas são agentes citotóxicos cuja ação pode auxiliar no poder invasivo das bactérias. As quatro hemolisinas estafilocócicas (alfa, beta, delta e gama) são diferentes entre

si de acordo com a ação lítica sobre os eritrócitos de diferentes espécies, mas as dos tipos beta e delta apresentam uma maior importância na patogênese das infecções intra-mamárias (DEMO, 1996).

A alfa-hemolisina produz danos aos tecidos posteriormente ao estabelecimento do foco da infecção. É citotóxica e citolítica para uma variedade de tipos celulares cuja função está relacionada a formação de poros em membranas celulares, além de ser dermonecrótica e neurotóxica, sendo uma das toxinas bacterianas mais potentes (BHAKDI et al., 1991; BOHACH & FOSTER, 2000; LINEHAN, 2003).

A sensibilidade dos eritrócitos a lise pela ação da alfa-hemolisina varia muito, devido à distribuição de lipídeos e proteínas na membrana, sendo os mais sensíveis os de coelho, seguidos de ovelha e bovinos (ROGOLSKY, 1979). Suspeita-se que os eritrócitos de coelhos possuam um maior número de sítios de afinidades para a alfa-toxina, o que explicaria a ação especialmente tóxica dessa hemolisina a essas células (BOHACH & FOSTER, 2000). Em células humanas o efeito citopatogênico não está associado à hemólise. O principal efeito patogênico da alfa-toxina é o dano celular endotelial e a ativação de plaquetas, levando ao comprometimento da microcirculação (LIASSINE et al., 2004). A alfa-toxina é produzida na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano.

Vários estudos demonstram que a alfa-hemolisina apresenta um efeito favorável no surgimento de doenças. Cepas não produtoras de alfa-hemolisina foram, em alguns estudos, menos virulentas do que suas ancestrais isogênicas produtoras desta toxina (BRAMLEY, 1989; CALLEGAN, 1994).

A beta-hemolisina - diferenciada da alfa-hemolisina por apresentar lise em eritrócitos de carneiro e não de coelhos - é produzida por aproximadamente 20% dos isolados de *S.aureus* e sua identificação é relacionada principalmente a cepas de mastite bovina, devido ao fato de que a pele e os tecidos do úbere serem extremamente ricos em esfingomielina, que é um fosfolípídeo encontrado na membrana, quando comparados a outras áreas do corpo. Esta age como uma esfingomielinase e destrói membranas celulares ricas em esfingomielina, sendo tóxica para vários tipos celulares tais como hemácias, leucócitos, plaquetas, fibroblastos e macrófagos. No entanto, seu papel patogênico em infecções humanas é desconhecido (BOHACH et al., 1997; PARK et al., 2004). Assim como a alfa-hemolisina a beta-hemolisina é sintetizada na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano.

A beta-hemolisina é também conhecida como toxina *hot-cold* devido a uma característica particular que apresenta quando inoculada em placas contendo ágar sangue de carneiro. A 37 °C, a toxina interage com as células sanguíneas vermelhas, mas não ocorre lise. Caso os eritrócitos sejam incubados em seguida a 4 °C, observa-se lise das células (HUSEBY et al., 2007).

Tem se observado *in vitro* que a ação da beta-hemolisina é antagonista à ação da alfa-hemolisina. Tal fato se deve à ação da beta-hemolisina sobre a membrana dos eritrócitos, impedindo, assim, a polimerização da alfa-hemolisina.

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 equinos. Como a alfa-hemolisina não tem efeito sobre eritrócitos humanos e equinos, e a beta e gama hemolisina apresentam pouco ou nenhum efeito sobre eritrócitos de equinos se deduz que o SHA observado é devido a delta toxina e é observado principalmente em sangue de ovino (HEBERT & HANCOCK, 1985).

Em 1947, Willians & Harper propuseram a existência da delta-hemolisina como uma quarta toxina citolítica de *S. aureus*, considerando as descritas até então, alfa, beta e gama. A delta-hemolisina é única em seu pequeno tamanho, estabilidade ao calor, propriedades surfactivas e é lítica para vários tipos de membranas da maioria das espécies animais, incluindo eritrócitos, outras células, organelas e até mesmo protoplastos bacterianos. (BOHACH & FOSTER, 2000).

A atuação da delta-hemolisina provoca uma grande variedade de efeitos citolíticos em vários tipos celulares, como os eritrócitos pela formação de poros na membrana citoplasmática, causando vazamento citoplasmático e lise das células expostas a essa toxina. A função precisa da delta-toxina em doença humana ainda não é clara. (BOHACH & FOSTER, 2000; CUNHA, 1998).

Gama-hemolisina também é chamada de leucotoxina, é tóxica para neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos (LIASSINE et al., 2004).

Segundo o estudo realizado por Larsen e colaboradores (2000) algumas cepas de *Staphylococcus aureus* são mais contagiosas, virulentas ou persistentes que outras. Além disso, *S. aureus* é frequentemente resistente à terapia antibiótica devido a sua capacidade de produzir uma barreira de exopolissacarídeo e por causa de sua posição no interior dos micros abscessos, que limitam a ação dos antimicrobianos (CONTRERAS et al., 2000). Os animais infectados por este micro-organismo na glândula mamária representam uma fonte de infecção para o rebanho e um perigo à saúde pública, tendo o leite como veículo (SILVA et al., 2004).

Medidas de controle são o principal e mais econômico meio para a eliminação da mastite em um rebanho; no entanto, as dificuldades de implantação e manutenção destes procedimentos levam à necessidade de tratamento dos animais doentes, geralmente realizado através de antibioticoterapia, ocasionando inúmeras consequências para o animal, o leite e os consumidores (SANTOS, 2007).

## **2.5 Epidemiologia da Resistência Antimicrobiana de *Staphylococcus* spp.**

O crescimento da resistência aos antimicrobianos se dá pelo uso inapropriado destes na medicina humana e, também, por práticas usadas na agricultura. As dificuldades no estabelecimento de medidas de controle, no que diz respeito ao uso indiscriminado de antibióticos, ampliam a gama de bactérias resistentes. Além disso, as células bacterianas podem trocar seu material genético, agravando ainda mais este quadro (JOHN et al., 2002).

Entre os patógenos causadores de infecções hospitalares, os cocos Gram- positivos tornaram-se predominantes nas últimas duas décadas. Esta tendência está relacionada a capacidade desses patógenos para acumular determinantes de resistência aos antibióticos (GOLD & MOELLERING, 1996).

A maioria das infecções estafilocócicas pode ser eficazmente tratada com antibióticos; no entanto, nos recentes anos, um número crescente de espécies de *Staphylococcus* tornou-se resistentes a uma gama ampla de antibióticos, incluindo beta-lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclinas e gentamicina (FENG et al., 2008).

Quando a penicilina foi introduzida para uso clínico, praticamente todas as estirpes de *S. aureus* eram sensíveis. Infelizmente, em menos de uma década, graves problemas de resistência foram vistos em muitos dos principais centros médicos. *S. aureus* adquiriu genes que codificam a produção de beta-lactamases, tornando o organismo penicilina-resistente. Para combater esse problema, pesquisadores desenvolveram penicilinas de amplo espectro e cefalosporinas. Estes novos antimicrobianos só conseguiram superar parcialmente o problema da resistência (CALDERÓN-JAIMES, 2002).

Um exemplo notável é o de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, que surgiu na década de 1970 e aumentou em frequência como patógenos hospitalares durante os anos de 1980 e 1990 em muitos países (AYLIFFE, 1997; GOLD & MOELLERING, 1996; VANDENBROUCKE-GRAULS, 1998; VINCENT et al., 1995). Estas cepas foram denominadas MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*) que além de sua ampla disseminação mundial, representam um grande desafio no tratamento de infecções hospitalares por apresentarem um único mecanismo de resistência que lhes conferem proteção contra todos os antibióticos beta-lactâmicos (REMONATTO et al., 2007).

Concomitante a ampla resistência a todos os beta-lactâmicos, os isolados de MRSA frequentemente apresentam-se multirresistentes a diferentes classes de antimicrobianos, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrolídeos (BARRETT, 2006), ressaltando-se a importância de que as infecções por MRSA estão sempre associadas a consideráveis índices de morbidade e mortalidade, altos custos no tratamento como também permite que o micro-organismo persista no ambiente hospitalar (MIYAZAKI et al., 2007; PFALLER et al., 1999).

A resistência à meticilina nos *Staphylococcus* spp. é um fenômeno mundial com marcadas variações geográficas e com prevalências crescentes apesar dos esforços para conter o aumento da disseminação de cepas resistentes. É prevalente nos Estados Unidos (STYERS et al., 2006) sendo cada vez mais observado na Europa e Ásia (SABER et al., 2006).

MRSA anteriormente considerado exclusivamente um patógeno nosocomial (FARR, 2004), vem emergindo na literatura como uma importante causa de infecção em pessoas sem fatores de risco identificáveis, como contato direto e indireto nos serviços de saúde (HA-MRSA) (CHAMBERS, 2001), as quais são comumente referidas como MRSA adquiridas na comunidade (CA-MRSA). CA-MRSA pode ser transmitido durante contato direto entre pessoas que compartilham intimamente o mesmo espaço como, por exemplo, acampamentos, internatos, creches e outros (GWEN et al., 2005).

CA-MRSA caracteristicamente tende a ser menos multirresistente que MRSA de origem hospitalar mantendo, em geral, sensibilidade à clindamicina, porém resistência a esse antibiótico pode ser do tipo induzida (LAMPLANTE et al., 2007). Esse mecanismo de resistência não é detectado através do teste de sensibilidade rotineiramente empregado em laboratórios, sendo recomendado o teste de indução, denominado de D-teste (O'SULLIVAN et al., 2006; OTSUKA et al., 2007).

No início da década de 1980 Saravolatz et al. (1982) descreveram um surto de infecções por MRSA adquirido na comunidade, em Detroit, principalmente entre usuários de drogas intravenosas. Desde aquele tempo, casos isolados ou esporádicos de infecção por MRSA vem sendo relatados (BERMAN & EISNER, 1993). CA-MRSA é comumente implicado em infecções da pele e tecidos moles, pneumonia e é uma das mais importantes preocupações de saúde pública atingindo proporções endêmicas (ZLOMEK, 2007).

Nunes (2000) afirma que os micro-organismos resistentes não são um problema restrito ao ambiente hospitalar e que esses micro-organismos estão disseminados também na comunidade. A ocorrência de CA-MRSA era raramente identificada até que em 1999 foram relatados nos EUA, óbitos de crianças, causados por um clone de MRSA. Outros casos de colonização e infecção comunitária por MRSA foram relatados em indivíduos destituídos dos tradicionais fatores de risco (BOYCE, 2001; CARVALHO & BEREZIN, 2004).

O aparecimento de cepas de SCN resistentes à meticilina tornou-se um problema clínico grave nas últimas décadas. Em estudos de Vigilância em diferentes países da Europa, a taxa de resistência dos SCN a oxacilina está em 70 a 80%, semelhante às informadas nos Estados Unidos, Canadá, América Latina (AGVALD- OHMAN et al., 2004; STEFANI & VARALDO, 2003). Livermore (2000) e Boisson et al. (2002) salientam que os mecanismos

responsáveis pela resistência desses micro-organismos são idênticos aos que ocorrem nos *S. aureus*, tendo sido detectado o gene *mecA*, que determina a resistência para beta-lactâmicos em vários isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Não se sabe ao certo a origem evolutiva desse elemento genético, que tem condicionado grande poder de resistência em relação aos beta-lactâmicos, porém estudos relatam a transferência de genes de resistência entre espécies ao longo de tempo. A presença do gene *mecA* em *S. intermedius* proveniente de amostras animais e em *S. aureus* provenientes de amostras humanas sugere a possibilidade de ocorrência de transferência horizontal entre espécies bacterianas distintas (COELHO et al., 2007).

Segundo Rajala-Schultz et al. (2004), bactérias resistentes em animais produtores de alimentos, podem contaminar os produtos alimentícios e serem transferidas para humanos através da cadeia alimentar (LUZ, 2008). Em animais o isolamento de MRSA foi primeiramente reportado por Devriese et al. (1972) a partir de leite de vacas com mamite.

A infecção do homem pelo consumo de produtos como o leite contaminado com linhagens MRSA de origem animal é possível e, uma vez ocorrida a transferência interespecie, estes micro-organismos podem ser disseminados no meio animal (LEE, 2003).

## 2.6 Mecanismos de Resistência dos *Staphylococcus* aos Antibióticos Beta-lactâmicos

Os antibióticos beta-lactâmicos produzem um efeito bactericida pela inibição das enzimas responsáveis por catalisar um estágio vital da biossíntese do peptidoglicano, principal componente da parede celular das bactérias Gram positivas. (ITO et al., 1999). Esta inibição é o resultado de uma ligação covalente formando um complexo estável do antibiótico com uma ou mais destas enzimas chamadas proteínas ligantes de penicilina (*Penicillin-Binding Proteins* - PBPs) (LYON, 1987). Quando o peptidoglicano não pode ser formado, ocorre um distúrbio do mecanismo de controle das hidrolases (autolisinas), a bactéria entra em ciclo lítico e este processo pode levar a morte celular (GIESBRECHT et al., 1998).

Os dois principais fatores envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antibióticos em bactérias são a pressão seletiva e a presença de genes de resistência (WITTE, 2000). Os genes que codificam resistência aos antimicrobianos podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos. O DNA cromossômico é relativamente mais estável, enquanto que o DNA plasmidial é facilmente transportado de uma linhagem para outra por conjugação bacteriana, permitindo uma transferência de genes em conjunto incluindo os de resistência a antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008).

Em *S. aureus* a resistência aos antimicrobianos pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídeos. Particularmente para a meticilina, três mecanismos distintos de resistência são conhecidos: a) hiperprodução de beta-lactamases; b) presença de uma proteína ligante de penicilina alterada, denominada PBP2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBPs (TOMASZ et al., 1989). De Lencastre et al. (1991) sugerem que os três mecanismos podem estar presentes numa mesma amostra, inclusive interagindo entre si, tendo em vista que cepas meticilina sensíveis são carentes de PBP2a.

O primeiro mecanismo se deve às beta-lactamases produzidas pelos *Staphylococcus* spp., que são enzimas extracelulares codificadas por plasmídeos e, com base em testes sorológicos e cinéticos, podem ser divididas em quatro tipos (A a D). Diferentemente das beta-lactamases produzidas pelas bactérias Gram negativas, que são genericamente expressas de maneira constitutiva, as beta-lactamases dos estafilococos, com exceção do tipo D, são expressas em altos níveis somente na presença dos indutores, como a penicilina ou seus análogos (GARCIA-CASTELLANOS et al., 2004; LYON & SKURRAY, 1987).

Algumas cepas de estafilococos produzem grandes quantidades de beta-lactamase (hiperprodutoras) que rapidamente hidrolisam a penicilina, este excesso de enzima pode ainda hidrolisar parcialmente as penicilinas resistentes às penicilinases (McDOUGAL & THORNSBERRY, 1986). Cepas de *S. aureus* com menor susceptibilidade à oxacilina, em decorrência da alta produção de beta-lactamases, são designadas BORSA (*Borderline Oxacillin-Resistant S. aureus*) (NADARAJAH et al., 2006).

A síntese de beta-lactamases 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 *blaRI* (HACKBARTH & CHAMBERS, 1993; LOWY, 2003). O primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor. Quando não existe penicilina no meio, *BlaI* se liga ao promotor de *blaZ*, inibindo a transcrição do gene. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima *BlaRI*, presente na membrana celular, que por sua vez cliva a enzima *BlaI*, ativando o promotor de *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de beta-lactamase (CLARKE & DYKE, 2001; GREGORY et al., 1997; LEWIS et al., 1999).

O segundo mecanismo é mediado pela produção da PBP2a, uma enzima carboxipeptidase extra, cuja função é ligar resíduos de D-alanina do aminoácido terminal da cadeia lateral do ácido N-acetil murâmico do peptideoglicano. Esta nova proteína tem baixa afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos e é codificada pelo gene *mecA* (GIESBRECHT et al., 1998), porém a resistência à penicilina não depende só da expressão desta nova enzima, o mecanismo é mais complexo e depende também da expressão de altas concentrações de PBP2 sensível. Quando a meticilina inativa a PBP2, a PBP2a sozinha não pode sintetizar peptideoglicano funcional. Parece que o segundo domínio enzimático, sítio da transglicosilação da PBP2, nativa e bifuncional, é necessário para cooperar com a atividade de transpeptidase da PBP2a. O domínio da transglicosilação da PBP2 permanece funcional e ativo enquanto o domínio funcional da transpeptidase é inativado pela meticilina (ITO et al., 2001; PINHO et al., 2001; SCHEFFERS & PINHO, 2005).

A PBP2a tem baixa afinidade de ligação para antibióticos beta-lactâmicos. Trata-se de uma transpeptidase que pode assumir a síntese da parede celular bacteriana durante o tratamento com o antibiótico, quando normalmente PBPs são inativadas pela ligação com os anéis de compostos beta-lactâmicos (BRAKSTAD & MAELAND, 1997). Esta proteína é codificada pelo gene *mecA* que juntamente com dois genes regulatórios, o *mecI* e o *mecRI*, constituem o *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), imprescindível na determinação da resistência à meticilina nos *S. aureus* (BERGER-BÄCHI & ROHRER, 2002; RICARDO, 2004).

Outros mecanismos de resistência dos estafilococos aos beta-lactâmicos já foram descritos, porém com menor importância clínica. São alguns fatores cromossômicos, cuja atividade afeta o nível da resistência, muitos destes genes estão envolvidos na biossíntese da parede celular (GIESBRECHT et al., 1998; GUSTAFSON et al., 1992) como por exemplo, a hiperprodução PBP4, uma enzima de baixo peso molecular que está envolvida em uma ligação cruzada secundária da cadeia de peptideoglicano. A PBP4 possui atividades de transpeptidase e D-amino carboxipeptidase. A hiperprodução de PBP4 e ou PBP2, bem como mudanças na afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos, aumenta a resistência intrínseca em cepas susceptíveis (BERGER-BÄCHI, 2001; HENZE & BERGER-BÄCHI, 1996; SCHRADER-FISCHER, 2001).

A resistência fenotípica à oxacilina é extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heteroresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que 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 (MARANAN et al., 1997).

Alguns genes independentes do locus *mec* contribuem para expressão da resistência aos beta-lactâmicos. Estes genes designados *fem* (fatores essenciais para expressão da resistência) estão presentes no cromossomo de MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente) e MRS (*Staphylococcus* spp meticilina resistente) (HENZE et al., 1993).

Dois destes genes, *femA* e *femB*, não tem envolvimento na síntese da PBP2a, mas estão envolvidos na formação da ligação cruzada dos precursores da cadeia do peptidoglicano-pentaglicina. A disfunção do *femA* e *femB* diminuí o conteúdo de glicina nos precursores do peptidoglicano e confere susceptibilidade à meticilina. A presença do *femA* é também necessária para o aumento da atividade autolítica observada nas cepas contendo *mecA* (BERGER-BÄCHI & ROHRER, 2002; HENZE et al., 1993).

## 2.7 Mecanismo de Regulação do Gene *mecA*

As cepas MRSA, em sua evolução e proteção contra a pressão seletiva, adquiriram e integraram ao seu genoma um elemento genético móvel de 21 a 67 kb, denominado staphylococcal cassette chromosome (*SCCmec*), que contém o gene da resistência à meticilina (*mecA*) e outros determinantes de resistência a antibióticos (ITO et al., 2001; MA et al., 2002).

Os *SCCmec* tem importância fundamental na transmissão da resistência e na epidemiologia da bactéria. Inicialmente este cassete cromossômico era denominado como uma ilha de resistência, porém não se pode limitar a função deste elemento cromossômico à transferência da resistência aos beta-lactâmicos. Parece que o *SCCmec* serve como veículo para troca úteis a uma melhor sobrevivência dos estafilococos em vários ambientes, além de conter também genes de resistência a outros antibióticos e outros genes e pseudogenes que codificam enzimas com diversas funções (HIRAMATSU et al., 2004; ITO et al., 2001).

Uma análise comparativa de três genomas de *S. aureus* revelou que, dentro de um plano genético relativamente constante, a plasticidade nas espécies é conferida por transferência horizontal de elementos genéticos grandes e de origem desconhecida, que se inserem no genoma (ITO et al., 2003).

Com a evolução das técnicas de clonagem e sequenciamento toda a região do cromossomo em torno do gene *mecA*, em poucos anos, foi analisada, descrita e classificada. Foram encontradas duas regiões essenciais e comuns a todos os estafilococos resistentes à meticilina. Essas regiões foram denominadas como complexo do gene *mec* e complexo do gene *ccr*. As sequências entre os complexos ou depois deles foram classificadas como regiões *junkyard* (sobras) ou região J que contém vários genes ou pseudogenes que não parecem ser úteis para a célula bacteriana, embora importantes exceções incluam os genes de resistência mediados por transposons ou plasmídeos para resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos e metais pesados (ITO et al., 2003; KATAYAMA et al., 2000; KATAYAMA et al., 2001).

A expressão do gene *mecA* pode ter basicamente dois fenótipos de resistência, associados a diferenças na regulação, resultando em fenótipo induzível ou constitutivo (HACKBARTH & CHAMBERS, 1989).

O fenótipo induzível está associado à presença do plasmídeo contendo o operon *bla* da beta-lactamase regulado pelo gene codificado pela penicilinase plasmidial. 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 (HACKBARTH & CHAMBERS, 1989).

Os estafilococos com fenótipo induzível contém um locus regulatório com os genes *mecI* e *mecRI*, que são homólogos aos genes reguladores *blaI* e *blaRI*, respectivamente e que regulam a produção de beta-lactamase. Estudos tem demonstrado a capacidade do complexo *blaRI-blaI* em regular a expressão do gene *mecA*. Os genes reguladores *bla* ou *mec* podem ambos controlar a produção da PBP2a e da beta-lactamase devido ao alto grau de homologia dos dois sistemas (CHAMBERS, 1997; LIM et al., 2002; WELLER, 1999). Isolados que possuem uma disfunção na região regulatória, dos genes *mecI* e *mecRI* podem expressar *mecA* constitutivamente. Mas também pode usar os genes reguladores da beta-lactamase para melhor expressar *mecA*, principalmente porque *blaRI* é um forte indutor do *mecA* e *blaI* é um fraco repressor. Entretanto a regulação em isolados clínicos é feita principalmente pelos genes *bla* porque ocorrem deleções ou mutações no gene *mecI* que exerce atividade repressora. Estas cepas são clinicamente importantes porque elas são desreprimidas lentamente tornando a detecção da resistência difícil (BANNERMAN, 2003; KATAYAMA et al., 2001; ZHANG et al., 2001 ).

A proteína MecI, quando presente, reprime a transcrição do gene *mecA* e do par de genes *mecRI-mecI* na ausência de antibióticos beta-lactâmicos, através da ligação à região operadora destes genes no DNA bacteriano. Isso significa que quando não houver antibióticos desta classe no meio ambiente a que a bactéria está exposta, não ocorrerá transcrição do gene *mecA* até a proteína PBP2a nem transcrição dos genes reguladoras do *mecA*. Isso acontece por uma questão de economia energética para a célula bacteriana. Porém, na presença de um antibiótico beta-lactâmico, o MecR1 - proteína transmembrana sinalizadora sensível a beta-lactâmicos - é auto-clivado cataliticamente e o domínio metaloprotease, que está localizado na parte citoplasmática dessa proteína, se torna ativo. Esta metaloprotease cliva a proteína MecI, que por sua vez, estava ligada à região operadora do *mecA*, permitindo assim a transcrição do gene a subsequente produção da conhecida proteína alterada PBP2a (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

## 2.8 Métodos de Detecção da Resistência à Meticilina

Espécies de *Staphylococcus* spp. resistentes a antimicrobianos representam um problema cosmopolita, sendo o controle de sua disseminação um importante desafio.

A associação de métodos fenotípicos e genotípicos para a identificação do perfil de resistência antimicrobiana em isolados de amostras clínicas de humanos e animais fornece ferramentas para um diagnóstico mais acurado, capaz de determinar sua prevalência como agentes etiológicos de infecções e de proporcionar o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação das cepas resistentes (COELHO et al., 2007; SKOV, 2003).

A detecção de resistência dos *S. aureus* à meticilina, entre outros antibióticos, pode ser realizada por métodos tradicionais, como a difusão em disco, ou pelo uso de equipamentos automatizados que forneçam o valor da concentração inibitória mínima (CIM) (DONATELE et al., 2002).

Na rotina microbiológica, o diagnóstico para MRSA é baseado nas características fenotípicas. Entretanto, a expressão fenotípica de resistência à meticilina é frequentemente heterogênea e os métodos fenotípicos podem falhar na detecção desta resistência, uma vez que, a expressão fenotípica pode ser influenciada pelas condições de cultivo, como

temperatura, pH e concentração de NaCl do meio. Como consequência, amostras com baixos níveis de resistência podem não ser detectadas, uma vez que duas subpopulações podem coexistir na mesma cultura e nem todas as células, apesar de possuírem a informação genética, expressam *in vitro* o fenótipo de resistência (BRAOIOS, 2005).

A maioria dos isolados clínicos exibe melhor este padrão de heterorresistência sob condições de cultura hipertônica (suplementada com NaCl) e incubada a 35<sup>o</sup>C por 24h (CHAMBERS, 1997; BROWN, 2001). O NCCLS tem recomendado desde de 2000 a utilização do Agar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina, o *Screen Agar*, para confirmação de resistência à meticilina (BRAOIOS, 2005; LEE et al., 2004; METAN et al., 2005).

A oxacilina tem sido usada para avaliação da resistência em função de sua maior estabilidade e melhor resposta na identificação de cepas multirresistentes, embora o termo meticilina resistente seja mantido por razões históricas (CARVALHO & BERENZI, 2004).

Quando o teste de difusão em disco é utilizado para detectar resistência à oxacilina deve ser realizado com discos de 1µg/ml. Embora esta resistência intrínseca, definida seja como CIM  $\geq 4$  µg/ml de oxacilina pelo método de diluição em Agar, o método com disco de oxacilina de 1µg/ml é considerado confiável para detecção de resistência (CARVALHO & BEREZIN, 2004).

Estudos mais recentes demonstram a eficácia do teste de disco-difusão para cefoxitina como marcador substituto da detecção da resistência à meticilina pelo gene *mecA* (ANAND et al., 2009; SWENSON et al., 2007). Para os *S. aureus*, os testes com disco de cefoxitina seriam, no mínimo, comparáveis em acurácia aos testes com disco de oxacilina, porém em geral o primeiro teria leitura mais fácil, devido ao maior halo e à possibilidade de ser lido usando luz refletida, e não transmitida, como no caso do disco de oxacilina. Nesse caso, cabe lembrar que o teste com disco de cefoxitina tem a finalidade de detectar resistência à oxacilina e não a própria cefoxitina. A cefoxitina é um indutor mais eficiente do *mecRI* que a oxacilina ou meticilina (BERGER-BÄCHI & ROHRER, 2002; NCCLS, 2004). Sua acurácia é considerada plenamente satisfatória quando utilizados os pontos de corte, atualmente preconizados pelo CLSI (2011) cujos halos de inibição são considerados resistentes quando  $\leq 21$  mm e sensíveis quando  $\geq 22$  mm.

Outros métodos são utilizados para a detecção do gene *mecA* ou a proteína gerada por sua expressão, a proteína ligante de penicilina alterada (PBP2a), tais como métodos de diluição em Agar e em caldo (macrodiluição e microdiluição) e de gradiente de difusão em Agar (E-test), teste de aglutinação com partículas de látex, como também, equipamentos automatizados (FELTEN et al., 2002; VELASCO et al., 2005).

O E-test é uma técnica para detecção da suscetibilidade antimicrobiana bastante prática, rápida e que não requer equipamentos. Este recurso consiste em uma fita estreita de material plástico contendo concentrações crescentes de antibiótico, que é colocada em placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton de maneira semelhante ao teste de difusão em disco. A fita de E-test é utilizada na mesma temperatura aplicada aos testes de difusão em discos e sua principal vantagem é fornecer o valor da CIM diretamente (NCCLS, 2003).

O método de diluição consiste em diluições seriadas de antibióticos em caldo ou Agar e fornece a CIM de um dado antimicrobiano que sob condições experimentais definidas, inibe o crescimento de uma bactéria (NCCLS, 2000). Com a intenção de aumentar a sensibilidade do teste de detecção dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa resistentes à meticilina, o CLSI recomendou a redução do *breakpoint* de oxacilina para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de  $\geq 4$ µg/ml para  $\geq 0,5$ µg/ml (CLSI, 2011).

O teste de aglutinação em látex para detecção da proteína PBP2a, produto da expressão do gene *mecA*, foi recomendado pelo NCCLS (2002) para caracterização de isolados de SCN resistentes a metilina outros que não *S. epidermidis* envolvidos em infecções em sítios estéreis. Essa foi a alternativa apresentada para os laboratórios que não possuíam a técnica de PCR para detecção do gene *mecA*.

Métodos de PCR baseiam-se na amplificação e detecção de uma sequência de ácidos nucleicos, específica para o patógeno de interesse ou mesmo para um gênero bacteriano específico (GLINN et al., 2006).

A detecção genotípica do gene *mecA* utilizando o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada padrão ouro confirmando a resistência dos isolados à oxacilina incluindo aqueles com resistência heterogênea e por isso é utilizada em vários estudos que analisam a sensibilidade e especificidade de diversos métodos fenotípicos (ALCARÁZ et al., 2003; BROWN, 2001; CAIERÃO et al., 2004; CORSO et al., 2004; FERREIRA et al., 2003; LOUIE et al., 2001; ZBINDEN et al., 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

### **3.1 Amostragem de Estudo**

Foram analisadas no presente estudo um total de 79 cepas previamente caracterizadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, gentilmente fornecidas pela Clínica de Bovinos de Garanhuns, da Universidade Federal de Pernambuco.

As cepas em sua maioria foram isoladas do leite de ovelhas saudáveis (36 cepas) e acometidas de mastite subclínica (33) e um menor número de mastite clínica (10), do Agreste Meridional de Pernambuco.

### **3.2 Procedimentos Laboratoriais**

#### **3.2.1 Confirmação das características culturais e morfo-tintoriais**

As culturas, mantidas em Agar Nutriente Fosfatado (COSTA & HOFER, 1972), foram inoculadas em Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI - Oxoid) e após incubação 18-24h a 37°C, semeadas em Agar Tripticaseína de Soja (TSA - Oxoid) acrescido de sangue de carneiro a 5%, com incubação a 37°C por 18 a 24 horas, para análise da pureza, morfologia colonial (colônias convexas, de coloração variando do branco porcelana a amarelo) e padrão de hemólise.

Simultaneamente, procedeu-se a semeadura em Agar Manitol Salgado contendo 7,5% de Cloreto de Sódio (Oxoid), seguindo as mesmas condições de incubação, para visualização da capacidade de fermentação ou não, do manitol. Colônias fermentadoras do manitol se caracterizam pela produção de ácido e mudando assim a coloração do meio de vermelho para amarelo.

Colônias sugestivas foram submetidas à coloração pelo método de Gram, para confirmação das características morfo-tintoriais.

As colônias classificadas como cocos Gram-positivos foram submetidas às provas da catalase, coagulase e resistência a bacitracina.

#### **3.2.2 Identificação preliminar do gênero *Staphylococcus***

##### **3.2.2.1 Prova da catalase**

Sobre uma lâmina de microscopia, misturou-se uma colônia com uma ou duas gotas de peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de catalase é evidenciada pela ação sobre o peróxido de hidrogênio decompondo-o, podendo ser observada através de uma efervescência rápida e marcante (KONEMAN et al., 2008). Para as famílias Micrococcaceae (*Micrococcus*) e Staphylococcaceae (*Staphylococcus*) a prova é geralmente positiva, enquanto que para a família Streptococcaceae (*Streptococcus*) é negativa.

##### **3.2.2.2 Prova da coagulase**

As cepas confirmadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram diferenciadas em *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa por meio do teste da coagulase livre (em tubo).

A coagulase é uma substância similar à trombina e está presente em filtrados de cultivos. É secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominado Fator de Reação com a Coagulase – CRF, para formar um complexo que, por sua vez, reage com fibrinogênio, formando fibrina (coágulos).

Para realização da prova, foram transferidos 0,1ml de cada cultura obtida em caldo BHI para tubo de 10x100mm, contendo 0,5ml de plasma de coelho. Após homogeneização lenta, a mistura foi incubada a 37° C. A leitura foi efetuada a cada hora por 4 horas e após 24 horas de cultivo, tendo por base a formação e intensidade do coágulo (KONEMAN et al., 2008).

Como controle positivo foi utilizado a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923).

### **3.2.2.3 Resistência a bacitracina**

As cepas coagulase negativas foram submetidas à prova da resistência a bacitracina para diferenciação entre *Micrococcus* spp. (sensíveis) e *Staphylococcus* coagulase negativa (resistentes).

Este procedimento emprega o mesmo disco de bacitracina para a identificação presuntiva de *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A.

Uma suspensão bacteriana em Caldo BHI (Oxoid) apresentando uma turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ( $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ ), com leitura confirmada em espectrofotômetro (UNICO-1100) foi distribuída uniformemente, com o auxílio de um *swab* estéril umedecido, por toda a superfície das placas contendo Agar Mueller-Hinton. Após a secagem, os discos de bacitracina (0,04U – Oxoid) foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação 18 a 24 h a 35°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor dos discos, foram observados e medidos, em milímetros.

Os estafilococos são resistentes e crescem até a borda do disco enquanto os micrococos e espécies relacionadas são sensíveis, produzindo zonas de 10 mm ou mais.

### **3.2.3 Caracterização bioquímica**

Para a caracterização de espécies foram empregadas diferentes provas bioquímicas com base nos resultados da prova da coagulase (KONEMAN et al., 2008).

Nesta etapa, as cepas coagulase positivas foram identificadas através das provas de Voges-Proskauer (VP), fermentação da maltose, redução do nitrato e teste da DNase (ANEXO A).

Para a caracterização de espécies nas cepas SCN foram empregados os testes de fermentação de açúcares (xilose, celobiose, maltose, sacarose, trealose, frutose, lactose e manose), ornitina descarboxilase, redução de nitrato e produção de urease (ANEXO B).

### **3.2.4 Atividade hemolítica**

### 3.2.4.1 Produção de hemolisinas

Todas as cepas foram testadas para a produção de hemólise. Placas de Agar Sangue acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado foram estriadas com os isolados utilizando a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923) como controle. Após incubação a 37<sup>o</sup>C por 24h, a presença de um halo de hemólise total e /ou parcial ao redor do estriamento considerou-se a produção de alfa-hemolisina, beta-hemolisina, ou ambas, respectivamente. Os isolados foram submetidos à refrigeração entre 4 – 8<sup>o</sup>C por 24h, para melhor observação das características hemolíticas.

### 3.2.4.2 Sinergismo hemolítico (SHA)

O SHA foi avaliado através semeadura de *S. aureus* produtor de beta-hemolisina em Agar sangue e as amostras teste foram semeadas perpendiculares a este. Foi considerada SHA positivo a presença de uma zona de hemólise total dentro da zona parcial de beta-hemolisina (DEMO, 1996). Como controle do teste foi utilizada a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923).

## 3.3 Caracterização Fenotípica da Suscetibilidade aos Antimicrobianos

### 3.3.1 Teste de disco difusão

A totalidade das cepas analisadas (79 cepas) foi submetida ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por disco difusão, seguindo as recomendações preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (atualizado anualmente) utilizando 11 fármacos da marca OXOID, representativos das classes de beta-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos, antifolatos e lincosamidas cuja distribuição encontra-se apresentada no Quadro 1.

O critério de escolha tomou por base, os antimicrobianos eletivos no tratamento de infecções por *Staphylococcus* no homem e animais.

De cada amostra, três a cinco colônias crescidas em Agar Nutriente, foram repicadas para Caldo Mueller-Hinton (5 ml/tubo), com incubação a 37<sup>o</sup> C até atingir turbidez comparável ao tubo 0,5 da Escala de McFarland com leitura confirmada em espectrofotômetro (UNICO-1100). Em sequência, os inóculos foram semeados uniformemente, com auxílio de *swab* estéril na superfície do meio de Agar Mueller-Hinton (Oxoid). Após a secagem os discos de antimicrobianos foram depositados no meio, com auxílio de *dispenser* (Disc dispenser Mk111 90 mm for 6 cartridges-Oxoid).

Após incubação a 35<sup>o</sup>C por 18-24 horas, efetuou-se a leitura anotando os diâmetros dos halos de inibição do crescimento com paquímetro (ABSOLUTE DIGIMATIC Calipers - Mitutoyo) e interpretados de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2011), conforme Tabela 1.

Para o controle na qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, *E.coli* ATCC<sup>®</sup> 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup>27853, *Enterococcus faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923) foram testadas sob as mesmas condições de cultivo e incubação, de acordo com o CLSI

**Tabela 1 - Drogas utilizadas para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana e padrões de interpretação (CLSI, 2011).**

Classes	Antimicrobianos	Siglas	Concentração do Disco	Diâmetro da zona de inibição (mm)		
				Sensível	Intermediário	Resistente
Betalactâmicos	Penicilina G	PEN	10 UI	≥ 29	-	≤ 28
	Amoxicilina+Ác. clavulânico	AMC	20 µg/10 µg	≥ 20	-	≤ 19
	Ampicilina	AMP	10 µg	≥ 29	-	≤ 28
	Ceftriaxona	CRO	30 µg	≥ 21	14-20	≤ 13
	Ampicilina+ sulbactam	SAM	10/10 µg	≥ 15	12-14	≤ 11
Tetraciclina	Tetraciclina	TCY	30µg	≥ 19	15-18	≤ 14
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
Lincosamidas	Clindamicina	CLI	2 µg	≥ 21	15-20	≤ 14
Macrolídeos	Eritromicina	ERI	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13
Antifolatos	Sulfametoxazol-Trimetoprim	SXT	2,75 µg/1,25 µg	≥ 16	11-15	≤ 10
Aminoglicosídeos	Gentamicina	GEN	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12

### 3.3.2 Caracterização fenotípica da produção de beta-lactamase

A verificação da produção da beta-lactamase foi realizada na totalidade das cepas (79), através do método da cefalosporina cromogênica em disco (Nitrocefim<sup>®</sup>), que apresenta uma mudança da cor amarela para a vermelha quando o anel beta-lactâmico é hidrolisado. As culturas testadas tinham 24 horas de incubação e foram removidas usando-se alça descartável ao redor do disco de oxacilina, tendo sido aplicadas sobre a superfície do disco de Nitrocefim e observadas por um período de duas horas. O desenvolvimento da cor vermelha foi considerado como reação positiva, indicando produção de beta-lactamase (CLSI, 2011).

Cepas padrões de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 e *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.3.3 Caracterização fenotípica da resistência a oxacilina

#### 3.3.3.1 Oxacilina screen Agar

Neste teste foram utilizadas placas de Agar Muller-Hinton (MHA), contendo 4% de NaCl e 6 µg/ml de oxacilina, divididas em quadrantes. As placas foram estriadas com 10µl de uma suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em cada quadrante e incubadas a 35<sup>o</sup>C por 24 h. A leitura foi efetuada em luz transmitida para todo o crescimento. Qualquer crescimento após 24 h foi considerado resistente à oxacilina (CLSI, 2011).

Como controle do teste foram utilizadas cepas padrão *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213, sensível e *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 43300, resistente.

#### 3.3.3.2 Teste de difusão em disco para suscetibilidade a oxacilina

Todos os isolados foram submetidos ao teste de disco difusão com oxacilina 1µg. Uma suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foi espalhada com auxílio de *swab* sobre a superfície do Agar Muller-Hinton e posteriormente depositado o disco de oxacilina. As placas foram incubadas a 35<sup>0</sup>C por 24h e os diâmetros da zona de inibição foram medidos. A suscetibilidade a oxacilina foi interpretada de acordo com os diâmetros da zona de inibição: Resistente (R) quando  $\leq 10$  mm, Intermediário (I) quando 11-12 mm e Sensível (S) quando  $\geq 13$  mm para oxacilina (CLSI, 2011).

Como controle do teste foram utilizadas cepas padrão *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 – sensível e *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 43300, resistente.

### 3.3.3.3 Teste de difusão em disco para suscetibilidade a cefoxitina

Todos os isolados foram submetidos ao teste de disco difusão com cefoxitina 30µg. Uma suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foi espalhada com auxílio de Drigalsky sobre a superfície do Agar Muller-Hinton e posteriormente depositado o disco de cefoxitina. As placas foram incubadas a 35<sup>0</sup>C por 16-18 h e os diâmetros da zona de inibição medidos. A suscetibilidade a oxacilina foi interpretada de acordo com os diâmetros da zona de inibição (CLSI, 2011). Para *Staphylococcus* coagulase positivo: Resistente (R) quando  $\leq 21$  mm e Sensível (S) quando  $\geq 22$  mm para oxacilina. Para *Staphylococcus* coagulase negativo: Resistente (R) quando  $\leq 24$  mm e Sensível (S) quando  $\geq 25$  mm.

Para o controle do teste, cepas padrão de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923 sensível e *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 43300, resistente.

### 3.3.3.4 Microdiluição em caldo

Neste teste foram utilizadas microplacas contendo 50 µl de caldo Muller-Hinton com 2% de NaCl com concentrações entre 0,25 e 32 µg/ml de oxacilina. Uma suspensão de 50µl correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foi distribuída em cada poço. As microplacas foram incubadas a 35<sup>0</sup>C por 24 h. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos poços. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração de antibiótico presente no caldo MH. O crescimento em concentração  $\geq 4$  µg/ml de oxacilina foi considerado resistente para *Staphylococcus aureus* e para *Staphylococcus* coagulase-negativo, resistente na concentração  $\geq 0,5$  µg/ml (CLSI, 2011).

Para o controle de qualidade, cepas padrões de *S. aureus* meticilina sensível (MSSA) ATCC<sup>®</sup> 29213 e *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) ATCC<sup>®</sup> 43300 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

### 3.3.3.5 Microdiluição em Agar

Neste teste foram utilizadas placas de Agar Muller-Hinton (MHA), contendo 2% de NaCl e concentrações de oxacilina variando entre 0,25 e 64 µg/ml, divididas em quadrantes. As placas foram estriadas com 10µl de uma suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em cada quadrante e incubadas a 35<sup>0</sup>C por 18 h. A leitura foi efetuada em luz transmitida para todo o crescimento. Qualquer crescimento após 18h em concentração  $\geq 4$ µg/ml de oxacilina foi considerado resistente (CLSI, 2011).

Cepas padrões de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 e *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 43300 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

### 3.4 Caracterização Genotípica da Resistência Antimicrobiana através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a caracterização genotípica da resistência a meticilina e da produção de beta-lactamases foi realizada a técnica Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação do gene *mecA* na totalidade das cepas de *Staphylococcus* spp. e do gene *blaZ*, em todas as cepas positivas no teste da cefalosporina cromogênica em disco, respectivamente (ANAND et al., 2009; COELHO, 2007; JONES et al., 2006).

#### 3.4.1 Extração do DNA Cromossômico

A obtenção do DNA cromossômico das cepas para realização das técnicas genotípicas foi realizado por meio da técnica de extração adaptada de Senna et al. (2002).

Cada colônia crescida em Agar BHI foi repicada em 10 ml de caldo BHI. Após 12 horas a 37<sup>0</sup>C uma alíquota de 1 ml foi transferida para microtubos que foram centrifugados a 12000 rpm por 8 min para precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 500µl de solução TE 1x. Após três lavagens foram adicionadas 4U de lisostafina a 100µl de TE contendo o precipitado para a digestão da parede celular e a solução incubada em banho-maria a 37<sup>0</sup>C por 30 min. A membrana celular foi rompida por meio de choque térmico sendo a solução incubada em banho-maria a 100<sup>0</sup>C por 10 min. e após, colocada em freezer a -10<sup>0</sup>C por mais 10 min. Após centrifugação a 12000 rpm por 8 min a solução foi alíquotada em tubos de 20µl e armazenado a -20<sup>0</sup>C até ser utilizada.

#### 3.4.2 Amplificação do gene *mecA*

Para a amplificação do gene, foi preparada uma suspensão utilizando-se:

- 2,0 µl de primer específico para amplificação do gene;

5' AAA CAA GCA ATA GAA TCA TCA GAT AAC 3'  
3' TAA TCA GTA TTT CAC CTT GTC CG 5'

- 2,0 µl de tampão 10x
- 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub>
- 1,6 µl de nucleotídeos
- 0,2 µl de *Taq* polimerase
- 8,0 µl de água

A 15µl deste tampão, foi adicionado um volume de 5µl de DNA extraído. O material utilizado na amplificação foi levado ao termociclador (Bio Rad, Modelo My Cycler), no qual foram realizados 35 ciclos:

- desnaturação inicial a 94<sup>0</sup>C por 5 min
- desnaturação a 94<sup>0</sup>C por 30 segundos;
- anelamento a 55<sup>0</sup>C por 30 segundos;
- extensão a 72<sup>0</sup>C por 1 minuto;

- um ciclo de extensão final a 72°C por cinco minutos.

Um volume de 5 µl do produto da reação foi aplicado em gel de agarose 1,5% para separação do segmento *mecA* através da eletroforese, utilizando o marcador 100pb, para quantificação dos pares de base (pb) do fragmento do gene. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300 com 214 pares de base.

### 3.4.3 Amplificação do gene *blaZ*

- 2,0 µl de primer específico para amplificação do gene

5' TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG 3'

3' CAT TAC ACT CTT GGCGGT TT 5'

5' TCT ATC TCA ATG ACA TAT AG 3'

3' GAG GCT TCA ATG ACA TAT AG 5'

- 2,0 µl de tampão 10x
- 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub>
- 1,6 µl de nucleotídeos
- 0,2 µl de *Taq* polimerase
- 8,0 µl de água

A 15µl deste tampão, foi adicionado um volume de 5µl de DNA extraído. O material utilizado na amplificação foi levado ao termociclador (Bio Rad, Modelo My Cyclor), no qual foram realizados 35 ciclos:

- desnaturação inicial a 94°C por 5 min;
- desnaturação a 94°C por 30 segundos;
- anelamento a 55°C por 30 segundos;
- extensão a 72°C por 1 minuto;
- um ciclo de extensão final a 72°C por cinco minutos.

Um volume de 5 µl do produto da reação foi aplicado em gel de agarose 1,5% para separação dos segmentos através da eletroforese, utilizando o marcador 100pb, para quantificação dos pares de base (pb) do fragmento do gene. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 com 639 e 737 pares de bases.

Após a migração, os produtos foram corados por imersão do gel em solução de brometo de etídio (0,5%), visualizados em sistema de foto documentação (Image Quant 300) e, em seguida, digitalizadas e salvas em banco de dados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Identificação das Espécies

Foram avaliadas 79 amostras obtidas de leite ovino, das quais *Staphylococcus* foram identificados apenas em nível de gênero na Clínica de Bovinos de Garanhuns, Pernambuco, a partir da confirmação das características morfo-tintoriais, culturais, provas da produção de catalase e suscetibilidade a bacitracina. Com base na capacidade de produzir coagulase e em testes bioquímicos complementares, 40 (50,6%) cepas foram identificadas como coagulase-positiva (SPC), correspondendo a três espécies, *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* 39,19% (29/79), *S. intermedius* 12,16% (9/79) e *S. hyicus* a 2,70% (2/79) e 39 cepas (49,4%) totalizando 10 espécies, coagulase negativas (Tabela 2).

Entre as espécies coagulase negativas (SCN) identificadas, *S. chromogenes* correspondeu a 20,27% (15/79), seguido de *S. sciuri* subsp. *sciuri*, 6,76% (5/79), *S. pasteurii*, 5,41% (4/79), *S. xylosum*, 5,41% (4/79), *S. equorum*, 4,05% (3/79), *S. haemolyticus*, 2,70% (2/79) e *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. carnosus*, 1,35% (1/79, cada) e duas cepas (2,70%) não classificadas em nível de espécie porém referidas como SCN.

A maioria dos trabalhos não identifica as espécies coagulase-negativas por requerer muitas provas bioquímicas, referindo-se apenas como SCN. Este grupo apresenta algumas características que necessitam diferenciação com o gênero *Micrococcus* o que torna necessária a utilização de provas adicionais como a suscetibilidade a bacitracina, empregada neste estudo, na qual os *Staphylococcus* são resistentes, permitindo separação destes dois gêneros bacterianos (BANNERMAN & PEACOCK, 2008).

Considerando que o número de cepas analisadas não reflete, sob o ponto de vista epidemiológico, a incidência/prevalência de espécies do gênero *Staphylococcus* nesta espécie animal, pelo fato de que as mesmas são oriundas de diferentes propriedades rurais do Agreste Meridional de Pernambuco e selecionadas aleatoriamente para o presente estudo, procurou-se fazer uma correlação com os dados apresentados por outros autores quanto às diferentes espécies ocorrentes em ovinos, ressaltando sua importância na cadeia alimentar como animal produtor de alimentos.

**Tabela 2 - Frequência e distribuição das espécies de *Staphylococcus* isoladas do leite de ovelha.**

<b>Espécies</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	29	39,19
<i>S. chromogenes</i>	15	20,27
<i>S. intermedius</i>	9	12,16
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	5	6,76
<i>S. pasteurii</i>	4	5,41
<i>S. xylosum</i>	4	5,41
<i>S. equorum</i>	3	4,05
<i>S. hyicus</i>	2	2,70
<i>S. haemolyticus</i>	2	2,70
<i>S. simulans</i>	1	1,35
<i>S. saccharolyticus</i>	1	1,35
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	1	1,35
<i>S. carnosus</i>	1	1,35
SCN	2	2,70
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>100</b>

A maioria do leite ovino produzido no mundo é transformado em diversos tipos de queijos. Na Grécia, um dos maiores produtores de leite ovino do mundo, o iogurte tem alguma importância no mercado. Por esta razão, a qualidade do leite ovino está relacionada com a sua capacidade de ser transformado em derivados lácteos de alta qualidade com alto rendimento de produção (kg de leite/kg de produto), que por consequência, está relacionado com as propriedades de coagulação do leite, e estas são diretamente afetadas pela composição, qualidade microbiológica e pelo processamento dos produtos lácteos (queijos, iogurtes, doces, sorvetes, etc.) fabricados (EMEDIATO, 2008).

A análise microbiológica do leite cru é de extrema importância na qualidade final dos produtos lácteos garantindo a segurança do consumidor e as características adequadas ao produto. Sabe-se que a microbiota do leite é necessária para a produção de queijos tradicionais, por isso a opção por utilizar leite cru. Porém, a contaminação elevada da matéria prima, por micro-organismos indesejados, afeta sua composição e influencia o crescimento das bactérias desejadas no processo de maturação dos queijos, já que haverá competição pelos nutrientes, alterando atributos de qualidade do produto (PEREIRA et al., 2008; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007).

Os micro-organismos patogênicos contaminantes do leite cru podem ter origem fecal ou por excreção direta através do úbere (JAY, 2000; MUEHLHERR et al., 2003). Considerando que o leite não pasteurizado de ovelha e de cabra é utilizado na produção de queijos e que crianças com intolerância ao leite de vaca são consumidores destes produtos, a possibilidade de contaminação torna-se ainda mais preocupante (MUEHLHERR et al., 2003).

A contaminação de produtos lácteos com *Staphylococcus aureus* pode ser de origem animal ou humana (SPANU et al., 2012). Um estudo detectou 12% de cepas positivas para *S. aureus* de 1634 amostras coletadas de 2003 a 2005 em alimentos lácteos e de origem animal na Itália (NORMANO et al., 2007).

Esta espécie bacteriana está entre os maiores agentes causadores de infecção comunitária e hospitalar em todo o mundo, onde a maioria das infecções hospitalares por este micro-organismo pode representar um risco de vida ao indivíduo. Adicionalmente, esta espécie é envolvida em casos de intoxicação alimentar, sendo que numerosos surtos foram descritos e atribuídos a este micro-organismo (FONSECA & SANTOS, 2000).

Na Europa, no período de 1993 a 1998 este patógeno causou 5,1% dos surtos registrados. Porém a incidência desta bactéria é subestimada, já que a maioria dos surtos de gastroenterite não é relatada.

*S. aureus* são encontrados em diversas amostras de alimentos, como em locais de produção de leite já que está associado de forma muito intensa à mastite bovina. (PELES et al., 2007) destacando-se por sua maior ocorrência nos rebanhos mundiais, e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos sendo, inclusive, a espécie mais relevante e mais persistente nas mastites ovinas (MOTA, 2007). Adicionalmente é, também, o micro-organismo patogênico mais frequentemente isolado no leite cru (ZECCONI & HAHN, 2000).

Vautor et al., (2003) avaliando leite de ovelha e queijos produzidos artesanalmente na França, obtiveram 5,5% de positividade para *Staphylococcus aureus* entre as amostras de leite. A produção de queijos usando leite cru, particularmente nos casos de acidificação insuficiente ou lenta da coalhada, pode levar a surtos associados com *Staphylococcus* nestes produtos (ARQUÉS et al., 2005).

O isolamento de *S. aureus* em leite de ovelhas sadias vem sendo notificado por vários autores (ABO ELNAGA et al., 1985; ADWAN et al., 2005; HOLEČKOVÁ et al., 2004; TRÁVNÍČEK et al., 2003) revestindo-se de importância na indústria de laticínios.

No Brasil, Guaraná et al. (2011) em cultivo de leite de ovelhas sadias, obtiveram predominância de SCN. Segundo Bergonier et al. (2003), *Staphylococcus* são os principais agentes envolvidos nas infecções mamárias de pequenos ruminantes, sendo o *Staphylococcus aureus* mais frequente nos casos clínicos. A mastite em ovelhas é importante pelas consequências na saúde pública, como o risco de infecção ou intoxicação dos consumidores por estafilococos presentes no leite, através do consumo de produtos lácteos fabricado com leite cru.

A mastite é a inflamação da glândula mamária que ocorre como resposta, na maioria das vezes, a uma infecção causada por micro-organismos. Na forma subclínica, ao contrário da forma clínica, não ocorrem mudanças visíveis na aparência do leite ou do úbere, embora ocorram alterações na composição do leite e deste possam ser isolados micro-organismos patogênicos (BRAMLEY et al., 1996). A mastite subclínica tem grande impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros porque sua prevalência é maior que a da forma clínica (PHILPOT & NICKERSON, 1991) e, assim, as medidas para o seu controle têm recebido grande atenção.

*Staphylococcus* coagulase-negativos tem sido considerados a maior causa em infecções subclínicas, (HUESTON et al., 1989), porém outros autores reportaram a presença desses agentes no leite de ovelhas sem mastite (BATAVANI et al., 2003; FTHENAKIS & JONES, 1990).

Várias espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas são comumente encontradas nos canais do teto e na pele do teto de ruminantes domésticos e podem ser introduzidas na glândula mamária no ato de sucção, sem, contudo existir infecção do parênquima mamário (BATAVANI et al., 2003; FTHENAKIS & JONES, 1990).

No Brasil, apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles elaborados a partir de leite cru (BRASIL, 1997), a comercialização do queijo Minas

Frescal produzido artesanalmente, tem sido constatada (ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2000). Esses autores obtiveram 50,0% de contagens de *Staphylococcus aureus* acima do valor estabelecido como sendo o limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde para o queijo tipo Minas “frescal” produzido industrialmente com leite bovino.

Em dezoito surtos de DTA ocorridos em Minas Gerais de 1997 a 2002, que tiveram como alimentos implicados o leite e produtos lácteos de origem bovina, *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa enterotoxigênicos foram os principais agentes identificados. O queijo ocupou lugar de destaque entre os produtos lácteos envolvidos nos surtos o que pode ser explicado pelo fato de esse alimento ser muito manipulado, além de agravantes como condições higiênico-sanitárias inadequadas, principalmente em queijos elaborados de forma artesanal e sem inspeção sanitária (VERAS et al., 2003).

Estabelecendo uma correspondência das espécies identificadas no presente estudo, salienta-se que *S. intermedius*, coagulase positivo e a espécie coagulase variável, *S. hyicus* são de particular importância em infecções em animais (OLIVEIRA, 2000).

*S. intermedius* é encontrado como parte da microbiota da pele e de cavidades nasais e orais de cães, visons, equinos e gatos, encontrado em infecções cutâneas, urinárias, ósseas e do sistema nervoso central, em várias espécies animais (KONEMAM et al., 2008). Essa bactéria foi isolada de feridas infectadas em seres humanos, causadas por mordeduras de cães, sendo também isolada em casos de mastite bovina (KONEMAM et al., 2008). No homem tem sido implicado em surtos de intoxicação alimentar (BANNERMAN & PEACOCK, 2007; OLIVEIRA, 2000).

Segundo Watts & Owens (1989) e Bandeira (2001), *S. hyicus* vem sendo encontrado em rebanhos leiteiros com problemas de mastite. Jay (1992) ressalta a capacidade enterotoxigênica desta espécie de estafilococos, fato comprovado por Valle et al. (1990), que verificaram em cepas de *S. hyicus* coagulase positiva isoladas em ovinos, a produção de enterotoxina estafilotóxica.

Já entre os SCN, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* demonstram contaminação do leite pela manipulação do homem, pois essas espécies são encontradas naturalmente na pele e mucosas de humanos e inclusive em infecções como é o caso do *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (KONEMAN et al., 2008).

Alguns autores relatam a prevalência de *S. epidermidis* em leite de ovelhas (ARIZNABARRETA et al., 2002) e cabras (MORONI et al., 2005). No entanto, Chaffer et al. (1999) e Taponen et al. (2007) relataram abundância de outras espécies, como *S. simulans*, *S. chromogenes* e *S. haemolyticus* em bovinos.

Analisando amostras de leite provenientes de 54 criações de ovinos na região leste da Eslováquia, Pilipčincová et al. (2010) identificaram um total de 240 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativo destacando-se *S. epidermidis* (36,3%), *S. caprae* (21,3%), *S. hominis* (6,6%), *S. chromogenes* (6,3%), *S. xylosus* (5,8%), *S. warneri* (5,0%) e *S. capitis* (4,6%) e, em menor frequência, as espécies *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. kloosii*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. auricularis* e *S. lugdunensis*.

Um estudo realizado por Medeiros et al. (2009) em leite de origem bovina, em Pernambuco, apontou entre as amostras de SCP, o isolamento de *S. aureus* (28,9%), *S. intermedius* (12,80%) e *S. hyicus* (3,23%), corroborando com espécies também identificadas no presente estudo.

Espécies como *S. pasteurii* e *S. xylosus* são isoladas de infecções tanto no homem quanto em animais e também encontradas em alimentos como o leite e queijo de cabra. *S. sciuri* é descrita como uma espécie ambiental, amplamente distribuído na natureza e tem sido associados a alimentos, animais de fazenda, seres humanos e animais de companhia, sendo a

subespécie *sciuri* encontrado na natureza e como parte da microbiota transitória da pele em várias espécies de mamíferos e aves (KONEMAN et al., 2008).

*S. chromogenes* anteriormente era uma subespécie de *S. hyicus*, provoca infecções cutâneas no gado bovino, em suínos e ovinos. *S. equorum* é uma espécie de importância patogênica indeterminada. Tem sido isolada primariamente de equinos, bem como do leite e do queijo de cabra (KONEMAN et al., 2008).

Por fazerem parte da microbiota, SCN foram durante muito tempo considerados de pouca importância clínica, entretanto, durante as últimas duas décadas a incidência desses micro-organismos vem aumentando e eles passaram a ser reconhecidos como agentes oportunistas causadores de infecções nosocomiais e comunitárias (BARRETO & PICOLI, 2008).

## 4.2 Produção de Hemólise

A produção de fatores de virulência está envolvida com a patogenicidade do micro-organismo uma vez que contribui para a invasão tecidual e para a resistência a determinados antibióticos (PEREIRA, 2009).

Através da análise da atividade hemolítica em Agar sangue de carneiro, verificou-se que a maioria das cepas não apresentou hemólise correspondendo a 84,8% (67/79) (Figura1). Esses resultados diferem dos encontrados por Morandi et al. (2010) no qual em um estudo realizado com *Staphylococcus* isolados de leite, detectaram a produção de beta-hemólise em 54% das amostras e alfa-hemólise em 40%.

Na figura 2 uma representação dos padrões de hemólise apresentados pelas cepas de *Staphylococcus*.

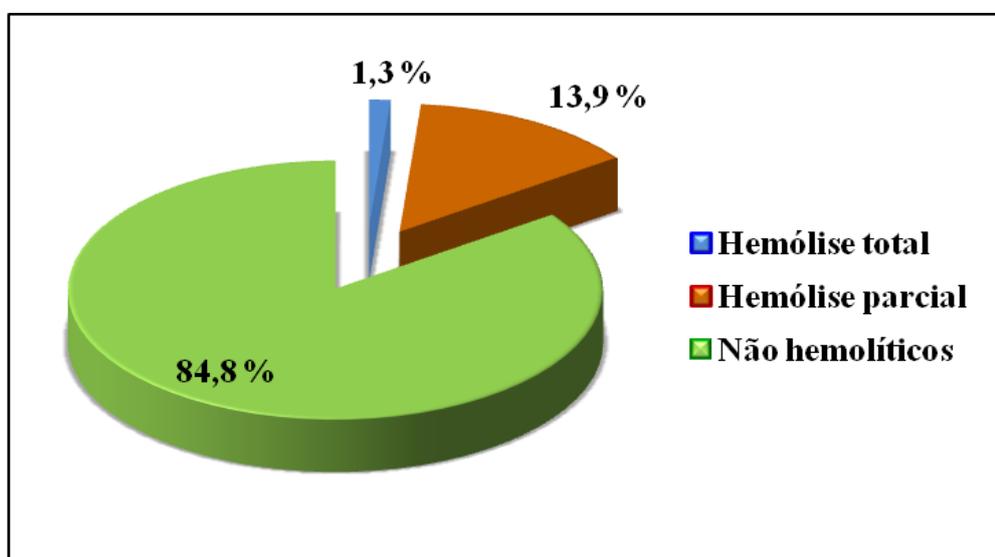
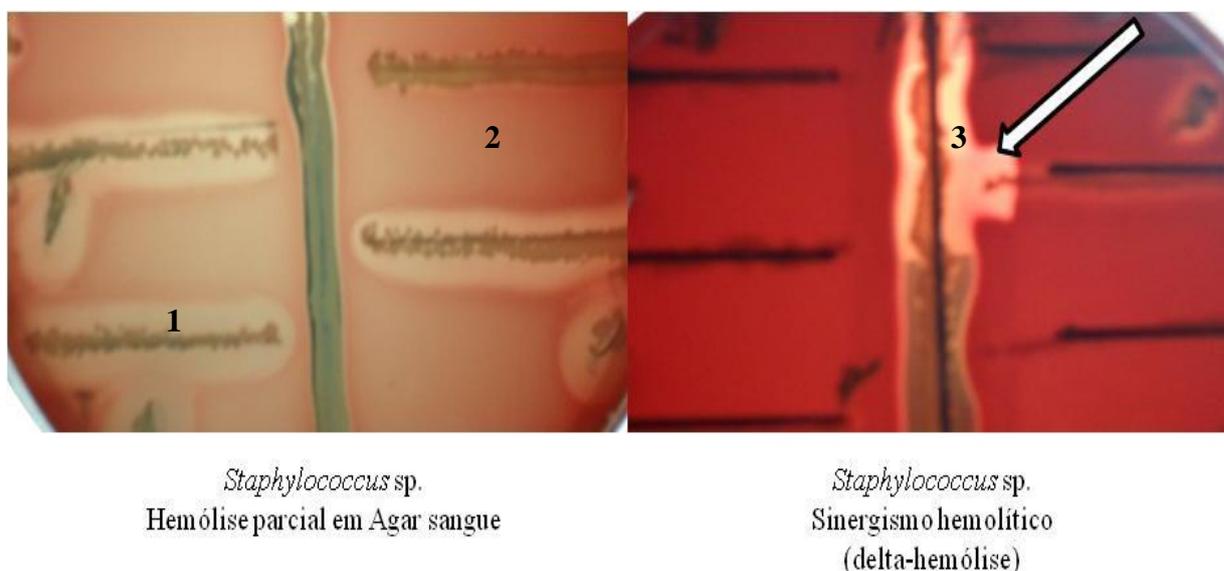


Figura 1- Frequência da produção de hemolisina pelas 79 cepas *Staphylococcus* spp.



**Figura 2 - Imagem de padrões de hemólise apresentados pelas cepas de *Staphylococcus*.**

- \*1 – Hemólise parcial
- 2 – Cepa não apresentando hemólise
- 3 – Delta-hemólise

A produção de hemólise foi observada apenas em *S. aureus* em 11 de 29 cepas (37,9%) sendo que apenas uma cepa produziu hemólise total. Das 2 cepas de *S. hyicus*, uma delas caracterizou-se por produzir hemólise parcial (Tabela 3). Resultado similar foi observado por Salasia et al. (2004) que detectou que 28,5% das amostras de *S. aureus* analisadas foram hemolíticas.

O principal efeito patogênico da alfa-toxina é o dano celular endotelial e a ativação de plaquetas, levando ao comprometimento da microcirculação. Em Agar contendo sangue produz uma ampla zona de completa hemólise ao redor da colônia (CUNHA, 1998).

Segundo Boerlin (2003), *S. aureus* é caracterizado como micro-organismo predominantemente hemolítico e a produção de coagulase e hemólise representa um ótimo critério para a identificação da espécie.

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 (LIASSINE et al., 2004; NISHIYAMA et al., 2002).

Gandra et al. (2005), através da análise da atividade hemolítica em Agar sangue de carneiro, verificou que 72,7 % das cepas de *S. aureus* e 25 % de *S. intermedius* apresentaram reações positivas, não sendo verificada atividade hemolítica para *S. hyicus*, diferente do observado no presente estudo onde esta característica foi observada em uma das duas cepas de *S. hyicus*.

A ausência de capacidade hemolítica em *S. hyicus* também foi corroborada por, Kloos & Jorgensen (1985) e Kibenge et al. (1983).

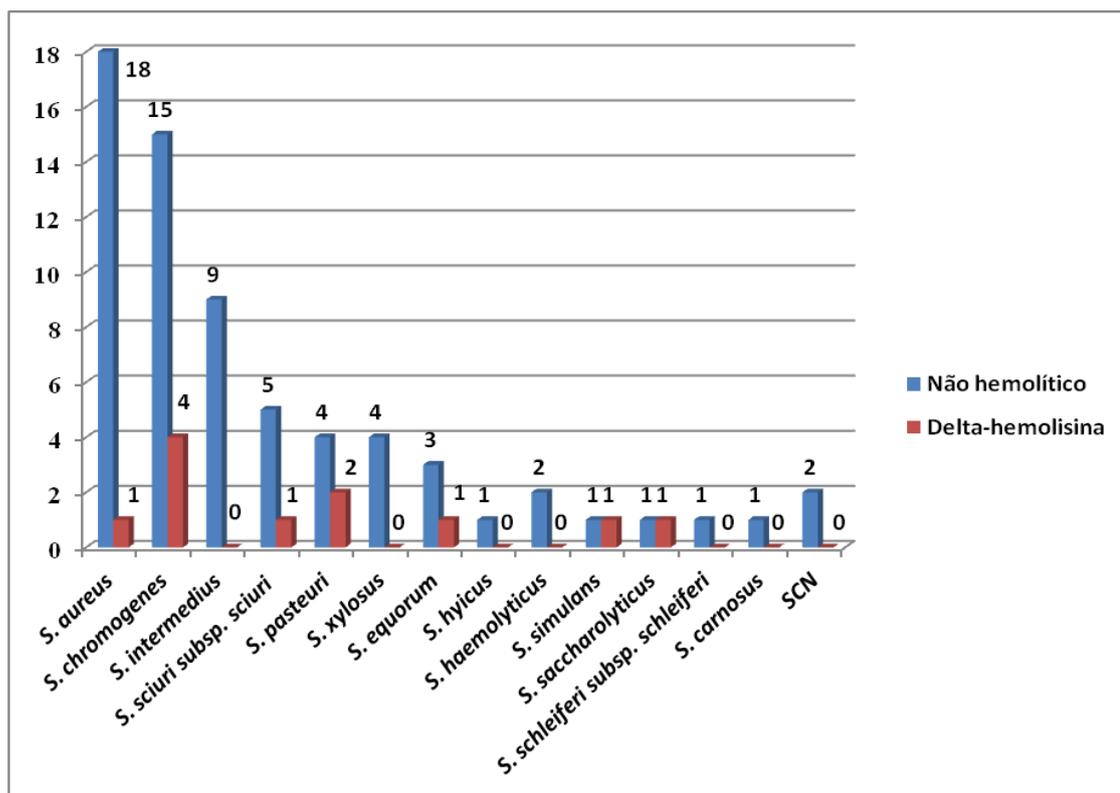
Roberson et al. (1996) descrevem que *S. aureus* e *S. intermedius* são capazes de produzir hemólise em Agar sangue, salientando, entretanto, que se pode encontrar cepas não hemolíticas em ambas as espécies. Kloos & Jorgensen (1985) assinalam que a maioria das

cepas de *S. aureus* apresenta atividade hemolítica, que *S. intermedius* apresenta atividade hemolítica variável e que a maioria das cepas de *S. hyicus* não produzem hemólise em Agar sangue.

**Tabela 3 - Frequência da produção de hemolisina de acordo com as espécies de *Staphylococcus*.**

<b>Espécies</b>	<b>Cepas (n)</b>	<b>Hemólise parcial</b>	<b>Hemólise total</b>	<b>Não hemolíticos</b>
<i>S. aureus</i>	29	10	1	18
<i>S. intermedius</i>	9	0	0	9
<i>S. hyicus</i>	2	1	0	1
<i>S. chromogenes</i>	15	0	0	15
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	5	0	0	5
<i>S. pasteurii</i>	4	0	0	4
<i>S. xylosus</i>	4	0	0	4
<i>S. equorum</i>	3	0	0	3
<i>S. haemolyticus</i>	2	0	0	2
<i>S. simulans</i>	1	0	0	1
<i>S. saccharolyticus</i>	1	0	0	1
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	1	0	0	1
<i>S. carnosus</i>	1	0	0	1
SCN	2	0	0	2
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>67</b>

Posteriormente, os 67 isolados não hemolíticos foram submetidos ao teste de sinergismo hemolítico (SHA), resultando em 11 (16,4%) cepas positivas (Figura 3), destacando-se *S. chromogenes*, *S. pasteurii*, *S. aureus*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. equorum*, *S. simulans* e *S. saccharolyticus* como produtores de delta-hemolisina.



**Figura 3 - Positividade das cepas de *Staphylococcus* no teste do sinergismo hemolítico.**

A literatura relata que isolados não hemolíticos com produção de sinergismo podem ser portadores da delta hemolisina ( $\delta$ -hemolisina), a qual é expressa somente na presença da beta-hemolisina (REINOSO, 2004).

O sinergismo hemolítico parece ser independente da produção de hemolisina, no entanto, sua ação é considerada como um intensificador da capacidade de colonização de *Staphylococcus* (ALI-VEHMAS et al., 2001). A produção de delta-hemolisina é uma propriedade comum de *S. aureus* de origem bovina e possivelmente um fator de virulência na mastite. Admite-se também que cerca de 50 a 70% de estafilococos coagulase-negativo (SCN) produzem esta toxina (FREER & BIRBECK, 1982). A função precisa da delta-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). De acordo com Nordhaug (1993) é a hemolisina mais frequentemente produzida por *Staphylococcus* envolvidos em casos de mastite. O papel provável das hemolisinas em mastite é acelerar a penetração bacteriana e aderência ao tecido do úbere.

A baixa expressão de hemolisinas dos isolados avaliados pode estar relacionada ao tempo e condições de estocagem das cepas. Segundo Sutra & Poutrel (1994) a produção de hemolisinas é dependente do seu crescimento em um meio em particular, e o grau de produção da hemolisina está positivamente correlacionado com o número de células bacterianas.

### 4.3 Perfil de Resistência aos Antimicrobianos Através da Técnica de Disco Difusão

A análise dos 79 isolados de *Staphylococcus* frente aos antimicrobianos revelou que 23 (57,5%) das 40 cepas de SCP e 27 (69,2%) das 39 cepas de SCN foram resistentes a uma ou mais drogas (dados não evidenciados em tabela).

No cômputo geral, maiores percentuais de resistência recaíram para penicilina (PEN - 53,2%) e ampicilina (AMP-45,6%) seguido de tetraciclina (TCY-5,1%), amoxicilina/ác.clavulânico (AMC-2,5%) e ciprofloxacina (CIP) e ceftriaxona (CRO), 1,3%, cada. Níveis intermediários de suscetibilidade foram detectados para ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), clindamicina (CLI) e ceftriaxona (CRO), salientando-se a sensibilidade absoluta para gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e ampicilina-sulbactam (tabela 4).

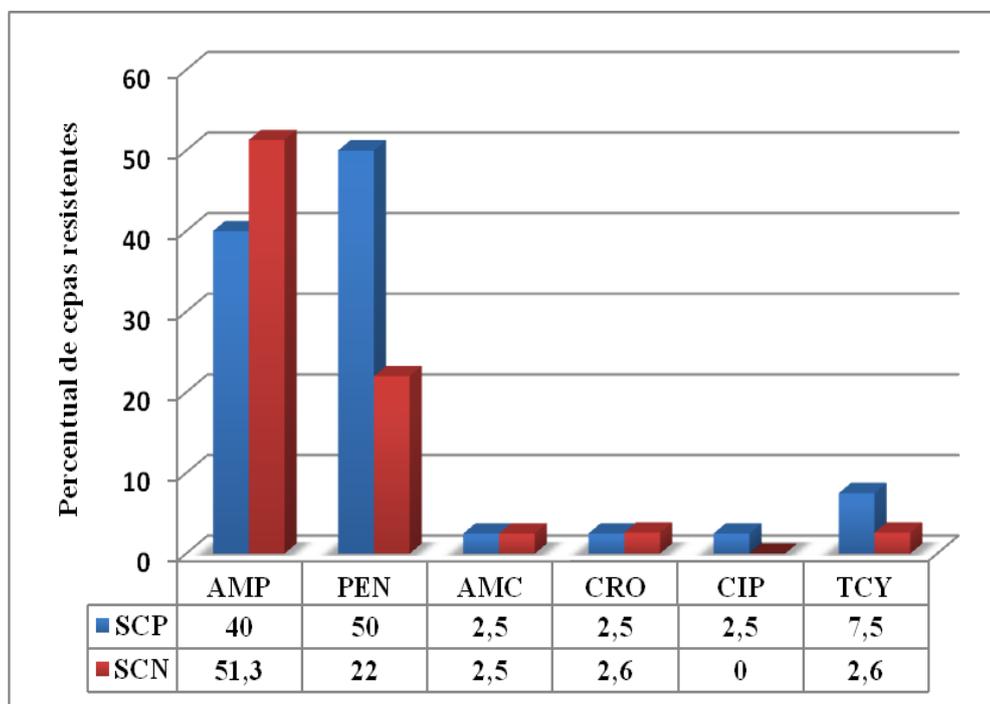
**Tabela 4 - Suscetibilidade aos antimicrobianos apresentada pelas 79 cepas de *Staphylococcus* no teste de Disco-difusão.**

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Resistente %</b>	<b>Intermediário %</b>	<b>Sensível %</b>
Ampicilina	45,6	0	54,4
Penicilina G	53,2	0	46,8
Amoxicilina/Ac.Clavulânico	2,5	0	97,5
Ceftriaxona	1,3	12,6	86,1
Ampicilina/Sulbactam	0	0	100
Ciprofloxacina	1,3	13,9	84,8
Tetraciclina	5,1	0	94,9
Clindamicina	0	19	81
Eritromicina	0	8,9	91,1
Sulfametoxazol/Trimetoprim	0	0	100
Gentamicina	0	0	100

De acordo com o CLSI (2012), a categoria intermediária implica eficácia clínica em locais do corpo onde as drogas são fisiologicamente concentradas (por exemplo, quinolonas na urina), ou quando uma dosagem mais elevada de uma droga pode ser utilizada (por exemplo, beta-lactâmicos).

Considerando-se unicamente a resistência antimicrobiana em relação às cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo (40) e *Staphylococcus* coagulase-negativo (39 cepas) observou-se maior percentual de resistência a PEN (50%) para os SCP enquanto percentual mais elevado de resistência a AMP (51,3%) foi observado para os SCN (Figura 4). Ao se particularizar a distribuição desses marcadores em relação às espécies de *Staphylococcus* identificadas, resistência a PEN e AMP foi detectada em 9 e 11 das 13 espécies,

respectivamente e em uma de duas cepas de SCN, enquanto resistência a CRO foi observada somente em *S. aureus* (Figura 4, Quadro 1), assinalando-se a sensibilidade absoluta de *S. saccharolyticus* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*. Por outro lado, suscetibilidade intermediária foi observada para CLI (15 cepas), CIP (11), CRO (10) e ERI (7), sendo mais frequente em *Staphylococcus aureus* (Quadro 1).



**Figura 4 - Percentuais de resistência apresentados por *Staphylococcus* coagulase-positivo (40 cepas) e *Staphylococcus* coagulase-negativo (39 cepas).**

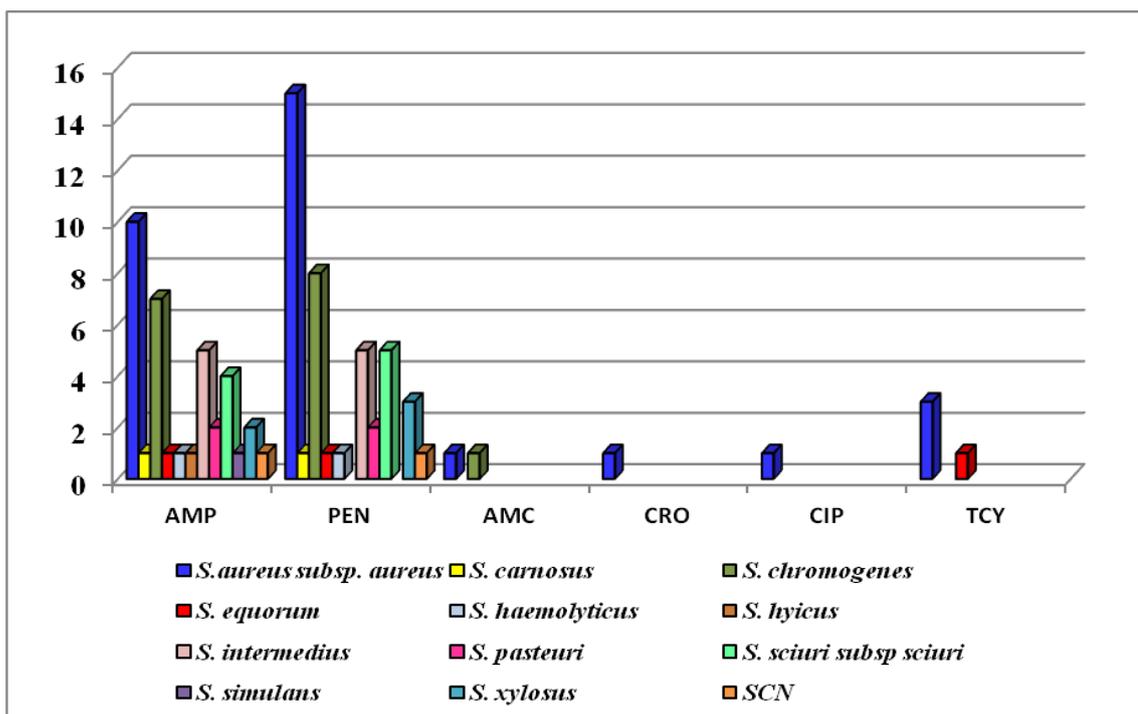
**Tabela 5 - Susceptibilidade das espécies de *Staphylococcus* frente às diferentes drogas antimicrobianas.**

Espécie	Total	AMP		PEN		AMC		CRO		CIP		TCY		CLI		ERI	
		R*	I**	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I
<i>S. aureus</i>	29	10	0	15	0	1	0	1	4	1	6	3	0	0	5	0	3
<i>S. hyicus</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>S. intermedius</i>	9	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>S. carnosus</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	15	7	0	8	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	1	0	1
<i>S. equorum</i>	3	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. pasteurii</i>	4	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	1
<i>S. saccharolyticus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. schleiferi</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri</i>	5	4	0	5	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	2	0	0
<i>S. simulans</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	4	2	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<b>ECN</b>	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Total</b>	79	36	0	42	0	2	0	1	10	1	11	4	0	0	15	0	7

AMP – ampicilina; PEN – penicilina, AMC – Amoxicilina/Ac.Clavulânico; CRO – ceftriaxona; SAM - Ampicilina/Sulbactam; CIP – ciprofloxacina; TCY – tetraciclina; CLI – clindamicina; ERI – eritromicina; SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim; GEN - gentamicina

\* R – Resistente

\*\* I – Intermediário



**Figura 5 - Frequência e distribuição dos marcadores de resistência de acordo com as espécies de *Staphylococcus*.**

Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, Coutinho et al. (2006) analisando amostras de leite de ovelhas com mastite subclínica na Bahia, obtiveram elevados índices de resistência a penicilina e ampicilina (80% cada) em *S. aureus* enquanto as cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo apresentaram índices de 5,3% e 10,6% de resistência a esses fármacos, respectivamente. Os autores reportaram ainda, resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim (26,3%) e a tetraciclina (5,3%).

Lollai et al. (2008) analisaram o perfil e a evolução da resistência antimicrobiana de patógenos da mastite ovina entre o período de 1995 e 2004, obtiveram baixos níveis de resistência a penicilina em *S. aureus* (4,1%) e *Staphylococcus* coagulase-negativa (15,3%) quando comparados aos encontrados por outros autores, índices maiores de resistência foram observados para aminoglicosídeos. Os autores concluíram que o perfil encontrado parece confirmar a menor resistência dos patógenos de ovinos, quando comparados aos de origem bovina.

Percentuais também elevados de resistência a ampicilina e penicilina (66,67% e 63,89%, respectivamente) em *Staphylococcus* isolados de leite caprino no Semi-Árido Paraíbano foram detectados por Junior et al. (2011). Resultados similares foram obtidos por Langoni et al. (2006), que observaram resistência frente à penicilina em amostras de *S. epidermidis* e *S. aureus* (61,5% e 87,5%, respectivamente) isolados de mastite caprina. Para a ampicilina, os mesmos autores verificaram resistência para os mesmos agentes, com índices de 63,2% e 75%, respectivamente.

Spanu et al. (2010), na Itália, analisando 36 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo de leite cru de ovelhas, frente a 16 drogas antimicrobianas obtiveram resistência a ampicilina (36,1%), penicilina (33,3%), tetraciclina (11,1%) e cloxacilina (2,8%) drogas comumente na exploração de ovinos de leite.

O elevado percentual de resistência a penicilina (53,2%) e a ampicilina (45,6%) bem como a resistência simultânea a esses dois fármacos (35,4%), no presente trabalho pode estar associado a provável produção de beta-lactamase, ao uso frequente ou mesmo sub dosagens desses beta-lactâmicos (LI et al., 2007). Segundo Bonna et al. (2007) 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. O uso de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamase é uma alternativa terapêutica no tratamento de infecções por produtores de beta-lactamase (HIRANO & BAYER, 1991). Os antibióticos beta-lactâmicos são preferíveis e muito usados porque atacam a parede celular da bactéria que é um dos componentes mais acessíveis ao antibiótico e essenciais a vida bacteriana (McCALLUM et al., 2010).

Alguns aspectos importantes merecem ser evidenciados neste estudo, entre eles a suscetibilidade intermediária a ciprofloxacina, clindamicina e eritromicina.

Em relação a ciprofloxacina, detectou-se uma cepa de *S. aureus* resistente e 11 cepas apresentando grau intermediário de suscetibilidade, entre estas, seis *S. aureus* e cinco SCN. A resistência do *S. aureus* às quinolonas vem aumentando progressivamente. São antimicrobianos que inibem as enzimas denominadas girases, que atuam na replicação e transcrição do DNA cromossômico. Essas enzimas são constituídas por 4 subunidades, 2 subunidades A e duas B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. O mecanismo mais comum de resistência decorre de mutações cromossômicas espontâneas, ou pontuais (*single mutation*), especialmente no gene *gyrA*, resultando na formação de girases com afinidade reduzida às quinolonas e as fluoroquinolonas. Adicionalmente, um outro mecanismo de resistência encontrado em *S. aureus* é o sistema de efluxo. Codificado pelo gene *norA*, é responsável pelo transporte ativo da droga para o meio extracelular, conferindo menor nível de resistência quando comparado com aquela decorrente das mutações em *gyrA*.

Com sua ampla utilização na terapêutica clínica e conseqüente disseminação da resistência, especialmente entre cepas resistentes à meticilina/oxacilina, seu valor como agentes antiestafilocócicos tornou-se extremamente limitado (HOOPER, 2002).

Do mesmo modo, o encontro de 15 cepas com grau intermediário de suscetibilidade a clindamicina e sete intermediárias a eritromicina neste estudo. Os macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas são antimicrobianos amplamente empregados no tratamento de infecções estafilocócicas. *Staphylococcus aureus* resistentes aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas tem sido detectados e este fenótipo é denominado MLS<sub>B</sub> (APPELBAUM, 2007; PATEL et al., 2006).

Entre as lincosaminas, a clindamicina é o antimicrobiano de escolha utilizada para infecções produzidas por estafilococos resistentes à eritromicina, sobretudo em infecções de pele e tecidos moles, representando, também, alternativa segura para pacientes alérgicos à penicilina, entretanto, estudos demonstram a emergência de amostras comunitárias resistentes a este antimicrobiano (PATEL et al., 2006). Além disso, isolados resistentes a eritromicina podem rapidamente induzir resistência à clindamicina (APPELBAUM, 2007).

A sensibilidade absoluta a gentamicina encontra respaldo na literatura. Segundo Langoni et al. (2000) a gentamicina continua sendo um antibiótico eficaz para o tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana da mesma forma que vários autores verificaram altos índices de sensibilidade de estafilococos isolados do leite em casos de mastite, a este antibiótico (BRITO et al., 2001; BYARUGABA, 2004; COSTA et al., 2000; WATANABE et al., 2001).

Em relação à tetraciclina, Peresi et al. (2001) analisando a qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal artesanal e industrial, revelaram o percentual de resistência de 9,0% em

relação à totalidade dos isolados testados índice discretamente superior quando comparado ao resultado verificado neste estudo (5,1%). Percentual de resistência muito superior (60,0%) foi obtido por Costa et al. (2002), em 20 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva oriundos de amostras de queijo “tipo Coalho” no Maranhão.

A resistência antimicrobiana, considerada o grande desafio à Saúde Pública na atualidade, tem sido amplamente estudada em todos os gêneros bacterianos. Seu monitoramento fornece dados que servirão de suporte para políticas públicas, além de servirem de base para escolha adequada de medicamentos para o tratamento de enfermidades tanto em medicina humana quanto veterinária (DROPA, 2006; SILVA, 2008).

Grande parte desta resistência tem sido associada ao uso de agentes antimicrobianas em animais destinados a alimentação humana, sendo que o principal fator de risco está na utilização como promotores de crescimento ou profilático de doenças. Além disso, o tratamento de animais destinados à alimentação com agentes antimicrobianos que são importantes na terapia humana pode representar um risco em saúde pública pela transferência de genes de resistência.

*Staphylococcus* spp. se destaca pela capacidade de ser ou se tornar resistente a um grande número de antimicrobianos (FREITAS et al., 2005). Ferreira et al. (2006) associou o agravamento da resistência bacteriana ao uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos e aos mecanismos de transferência de resistência entre os micro-organismos. Este fato é comumente observado no campo em surtos de mastite (BRITO et al., 2001).

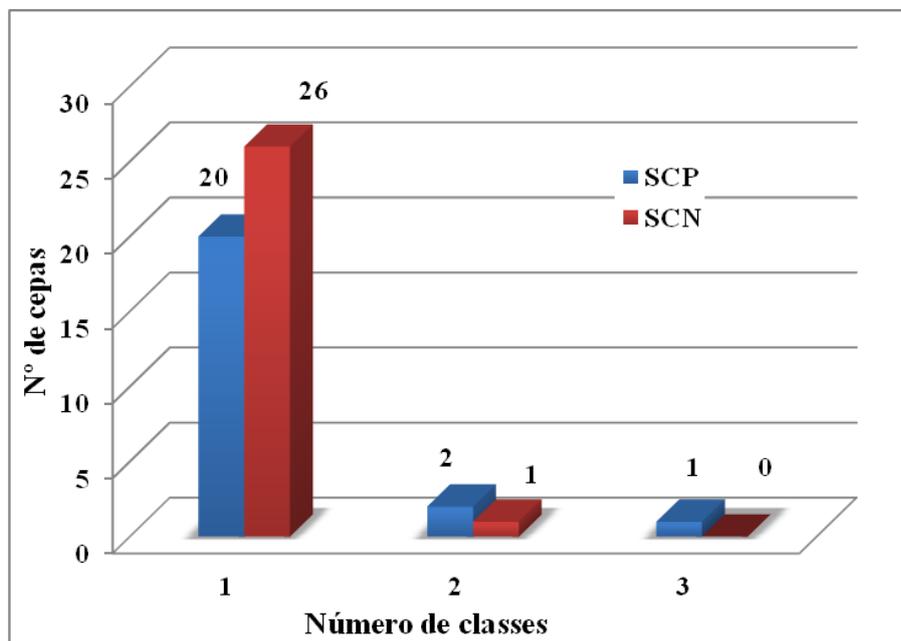
A grande variedade de fatores de virulência produzidos pelo *S. aureus* associado a sua versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos, tornam este micro-organismo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em hospitais. No Brasil, *S. aureus* é o micro-organismo mais comumente isolado em infecções nosocomiais (OLIVEIRA, 2001).

A análise do comportamento das 79 cepas de *Staphylococcus* spp. permitiu reconhecer nove perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos (antibiotipos), sendo oito apresentando resistência a uma ou mais drogas (Tabela 6). O antibiotipo 4 (AMP, PEN) caracterizou-se por sua maior frequência correspondendo a 9 cepas de SCP (*Staphylococcus* coagulase positivo) e 14 SCN (*Staphylococcus* coagulase negativo).

Quando distribuídos por número de classes (Figura 6) aponta-se perfil de multirresistência ( $\geq 3$  classes) em apenas uma cepa (perfil 9) de SCP (*Staphylococcus aureus*).

**Tabela 6 - Modelos de suscetibilidade apresentados pelas 79 cepas de *Staphylococcus* SCP e SCN.**

Antibiotipos	Perfis de Resistência	SCP*	SCN**
1	SENSÍVEL	17	12
2	AMP	3	5
3	PEN	6	6
4	AMP, PEN	9	14
5	PEN, CRO	1	0
6	PEN, TCY	0	1
7	AMP, AMC, PEN	1	1
8	AMP, PEN, TCY	2	0
9	AMP, PEN, CIP, TCY	1	0



**Figura 6 - Distribuição das cepas de *Staphylococcus* de acordo com a resistência a diferentes classes de drogas.**

Nos últimos anos, em nível mundial, *S. aureus* adquiriu grande importância devido ao aumento do isolamento de cepas multirresistentes, agravado ainda pelo fato de que a resistência antimicrobiana contribui para que esses micro-organismos possam se disseminar para o homem pela ingestão de alimentos contaminados ou outros meios sendo um fator preocupante para saúde pública (GERMANO, 2007; RIZEK et al., 2011).

A resistência a múltiplos antimicrobianos aumenta a habilidade do micro-organismo em sobreviver no ambiente hospitalar. Devido a isso, medidas que promovem a prescrição racional e controle do uso de antimicrobianos são alternativas viáveis na tentativa de conter o avanço destes micro-organismos nas unidades hospitalares. Entretanto, a relação entre MRSA e o uso de antimicrobianos é complexa e sua via de desenvolvimento nesses ambientes requer mais investigação (OLIVEIRA, 2001).

Resistência a antimicrobianos tem múltiplas implicações no que diz respeito a surtos. Indivíduos infectados por micro-organismos resistentes, como o MRSA, apresentam elevada mortalidade. Isto é parcialmente devido ao fato de infecções por organismos resistentes estar associado com o início inapropriado de antibioticoterapia, o principal determinante de sobrevivência em infecções sérias. Além disso, o risco aumentado de morte pode ser devido a esses patógenos possuírem inúmeros fatores de virulência. Ainda, patógenos resistentes contribuem para o aumento dos custos hospitalares. Infecções por MRSA, por exemplo, prolongam o período de estadia em hospitais e unidades de terapia intensivas (UTI) (PEREIRA, 2009; SHORR, 2007).

#### 4.4 Avaliação Fenotípica da Produção de Beta-lactamases

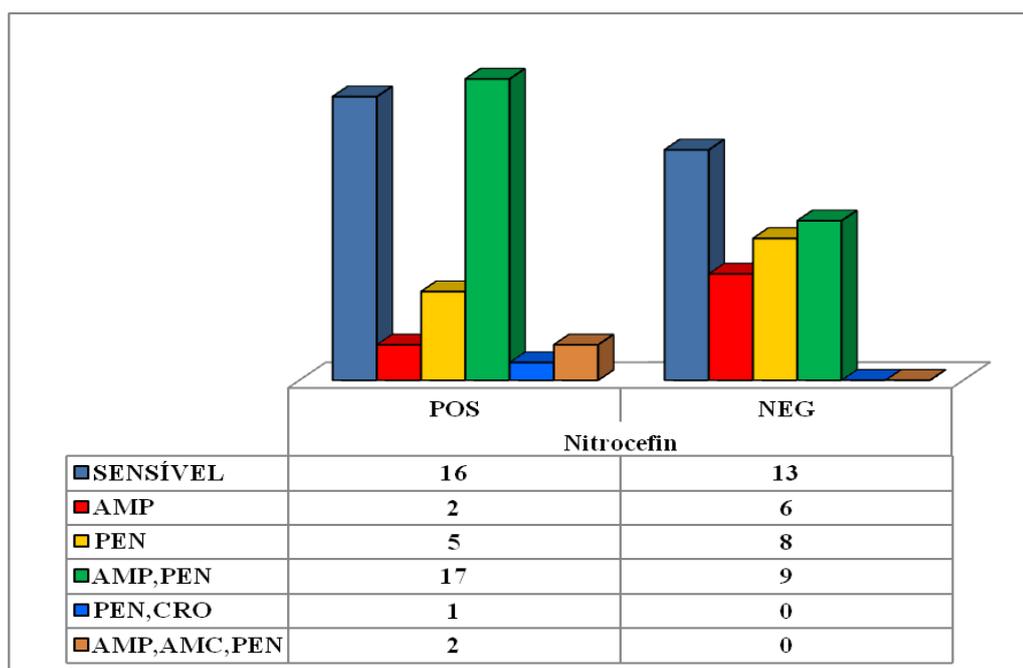
A verificação da produção da beta-lactamase foi realizada na totalidade das cepas (79), através do método da cefalosporina cromogênica em disco (Nitrocefim<sup>®</sup>).

No computo geral, 54,4% (43/79) das cepas foram positivas para a produção de beta-lactamase destacando-se que 11,6% (5/43 cepas) e 4,6% (2/43), eram resistentes a penicilina e ampicilina, respectivamente. O perfil AMP, PEN foi detectado em 39,5% (17/43) isolados positivos e o perfil AMP, AMC, PEN em 4,6% (2/43).

Foi possível observar que 37,2% (16/43) dos isolados positivos para a produção de beta-lactamases, eram sensíveis aos quatro antibióticos beta-lactâmicos (AMP, PEN, AMC e CRO). Por outro lado, entre as cepas nitrocefina-segativas, 23 (63,8%) das cepas eram resistentes a penicilina, ampicilina ou ambas (Figura 7).

Com exceção de *S. carnosus*, as demais espécies foram produtoras de beta-lactamase, (Figura 8) destacando-se entre as espécies sensíveis aos quatro beta-lactâmicos, *S. aureus subesp aureus* 11 cepas), *S. hyicus* (1), *S. xylosus* (1), *S. haemolyticus* (1) *S. pasteurii* (1), *S. equorum* (1), *S. saccharolyticus* (1), *S. schleiferi subsp schleiferi* (1), *S. intermedius* (2), *S. chromogenes* (2) e SCN (1) (dados não tabelados).

O alto índice de resultados positivos encontrados para a produção de beta-lactamase reflete o problema do uso inadequado de beta-lactâmicos, favorecendo o aparecimento de estirpes resistentes, principalmente as produtoras de beta-lactamase.



**Figura 7 - Perfis de suscetibilidades das 79 cepas de *Staphylococcus* spp. em relação a produção de beta-lactamase através do método da cefalosporina cromogênica em disco (Nitrocefim<sup>®</sup>).**

AMP – ampicilina; PEN – penicilina; AMC – amoxicilina+ ac. Clavulânico; CRO - ceftriaxona

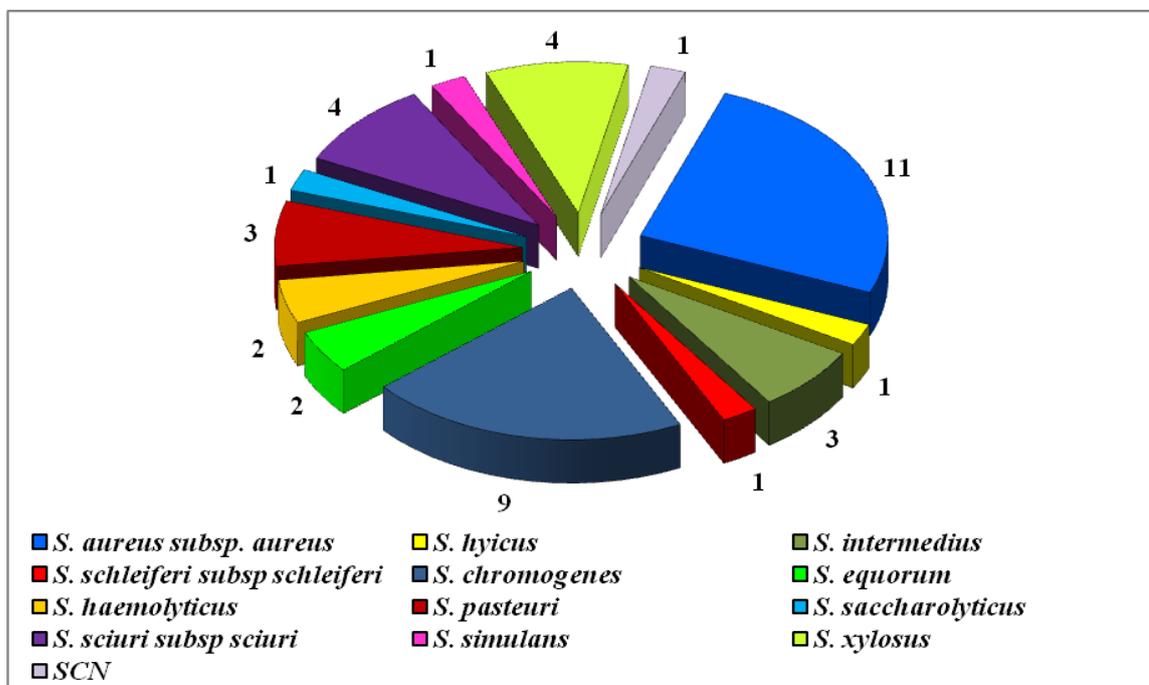
Um fator importante na resistência bacteriana é a produção de enzimas que inativam os antimicrobianos. A beta-lactamase está incluída entre os principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, agentes frequentemente usados para o tratamento de infecções

intramamárias nos animais e amplamente utilizados em infecções humanas. Essa enzima age no anel beta-lactâmico, provocando a hidrólise e a inativação do antibiótico (JUNIOR et al., 2011).

A maioria dos estafilococos são resistentes à penicilina e raramente este fármaco é uma opção para o tratamento de infecções estafilocócicas. Cepas de estafilococos resistentes à penicilina produzem beta-lactamase, sendo preferida para testar a sensibilidade de *Staphylococcus* a todas as penicilinas penicilinase-lábeis, tais como amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina e ticarcilina (CLSI, 2012).

Vários testes para a detecção da produção de beta-lactamases foram desenvolvidos os quais fornecem informações rápidas para o desenvolvimento da resistência. A interpretação do resultado do teste para a produção de beta-lactamase deve considerar a sensibilidade deste para as diferentes classes de enzimas beta-lactamases, os tipos de beta-lactamases produzidas pelos diferentes grupos taxonômicos de micro-organismos e as especificações de substrato das diferentes beta-lactamases. Neste contexto, o método da cefaloesporina cromogênica, o nitrocefim, tem se mostrado eficaz na detecção de todas as beta-lactamases conhecidas, inclusive as penicilinas estafilocócicas (CLSI, 2012; LIVERMORE 1995; MONTGOMERY et al., 1979) e particularmente para os estafilococos coagulase-negativo, incluindo *Staphylococcus lugdunensis*, apenas os testes baseados em nitrocefim são recomendados (CLSI, 2012).

Kiliç e Yalinay Çirak (2006) analisando 323 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativo (240) e *Staphylococcus* coagulase-positivo (83) detectaram 69 cepas (21,4%) penicilina sensíveis, produtores beta-lactamase sendo 52 (16,1%) coagulase-negativo e 17 (5,3%) coagulase-positivo. Segundo os autores, esses isolados podem ser produtores lentos ou a taxa de produção pode ser discreta ou induzível. Embora tais isolados sejam considerados suscetíveis a penicilina pelo método de difusão em disco, podem causar falha no tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo (37,2%).



**Figura 8 - Frequência das espécies de *Staphylococcus* produtoras de beta-lactamase através do método da cefaloesporina cromogênica em disco (Nitrocefim®).**

#### 4.5 Avaliação Fenotípica da Suscetibilidade à Oxacilina

Em uma segunda etapa, todos os isolados de SCP e SCN foram avaliados frente a cinco métodos fenotípicos para a suscetibilidade a oxacilina: disco difusão para oxacilina (1µg) e cefoxitina (30 µg), *Screen Agar*, Microdiluição em Caldo (CIM - Caldo) e Microdiluição em Agar (CIM - Agar).

Entre os métodos utilizados, resistência a oxacilina foi observada apenas no CIM – Caldo em 19 das 79 cepas (24,05%) e no CIM Agar, em 5 cepas (6,32%). Destacou-se sensibilidade absoluta em relação aos demais métodos fenotípicos (Tabela 5).

**Tabela 7 – Percentual de suscetibilidade a oxacilina nos testes fenotípicos.**

	TSA		<i>Screen</i> Agar	CIM	
	OXA (1µg)	FOX (30 µg)		Caldo	Agar
<b>Sensibilidade</b>	100 %	100 %	100 %	76%	94%
<b>Resistência</b>	0	0	0	24%	6%

Considerando a sensibilidade da totalidade dos isolados nos testes de disco-difusão para oxacilina e cefoxitina e no *Screen Agar*, no Quadro 3, procurou-se estabelecer uma correlação da distribuição das cepas de SCP e SCN em função dos perfis de resistência no TSA e os resultados obtidos no CIM (Caldo e Agar). Os 79 isolados apresentaram nove perfis de suscetibilidade (antibiotipos), totalizando 17 cepas de SCN e duas de SCP, resistentes no método de Microdiluição em Caldo e cinco SCN, no CIM-Agar. O antibiotipo 4 (AMP, PEN) predominou tanto no CIM-Caldo (8 isolados resistentes), quanto no CIM-Agar (3 cepas).

Entre os isolados resistentes a oxacilina nos testes de Microdiluição em Caldo e em Agar, 68,4% eram resistentes a penicilina, isolados ou em associação com outro antibiótico, 52,6% a ampicilina e 5,3% a tetraciclina.

A frequência e distribuição das espécies de *Staphylococcus* resistentes nos testes de Microdiluição em Caldo e Microdiluição em Agar são apresentadas na figura 9.

Entre as 13 espécies identificadas neste estudo oito, correspondendo a um total de 19 cepas, apresentaram resistência no CIM-Caldo e destas, apenas cinco cepas foram resistentes em ambos os testes destacando-se *S. sciuri* subsp. *sciuri* (3 cepas), *S. xylosum* (1) e *S. equorum* (1) todos coagulase negativo.

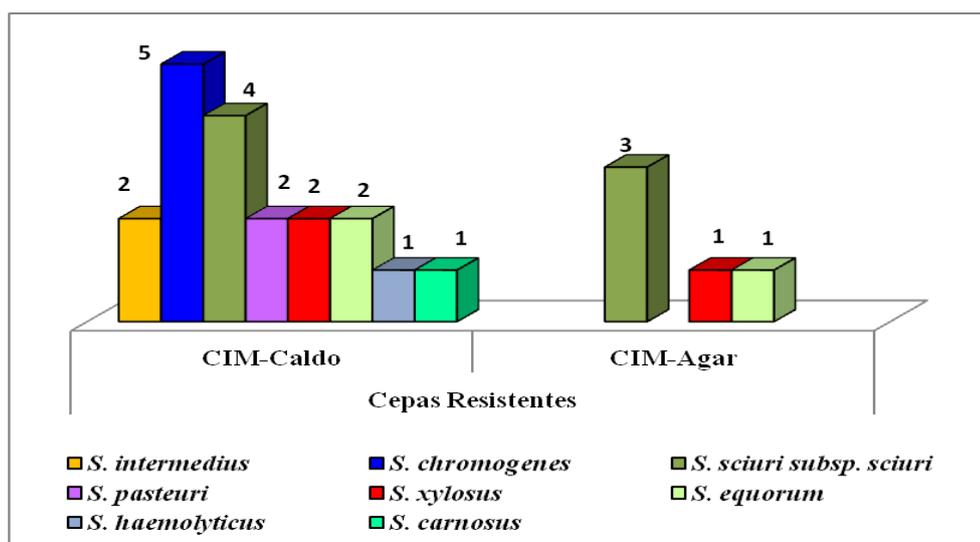
**Tabela 8 - Frequência e distribuição das cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo e *Staphylococcus* coagulase-negativo, de acordo com o antibiotipo e resistência a oxacilina na determinação da Concentração Inibitória Mínima em caldo e em Agar.**

Antibiotipos	Disco-difusão	SCP*	SCN**	N <sup>o</sup> Cepas Resistentes			
				***CIM - Caldo		CIM - Agar	
				SCP	SNC	SCP	SCN
1	SENSÍVEL	17	12	1	4	0	0
2	AMP	3	5	0	1	0	0
3	PEN	6	6	0	3	0	1
4	AMP, PEN	9	14	1	8	0	3
5	PEN, CRO	1	0	0	0	0	0
6	PEN, TCY	0	1	0	1	0	1
7	AMP, AMC, PEN	1	1	0	0	0	0
8	AMP, PEN, TCY	2	0	0	0	0	0
9	AMP, PEN, CIP, TCY	1	0	0	0	0	0
<b>Total</b>		40	39	2	17	0	5

\* *Staphylococcus* Coagulase Positivo

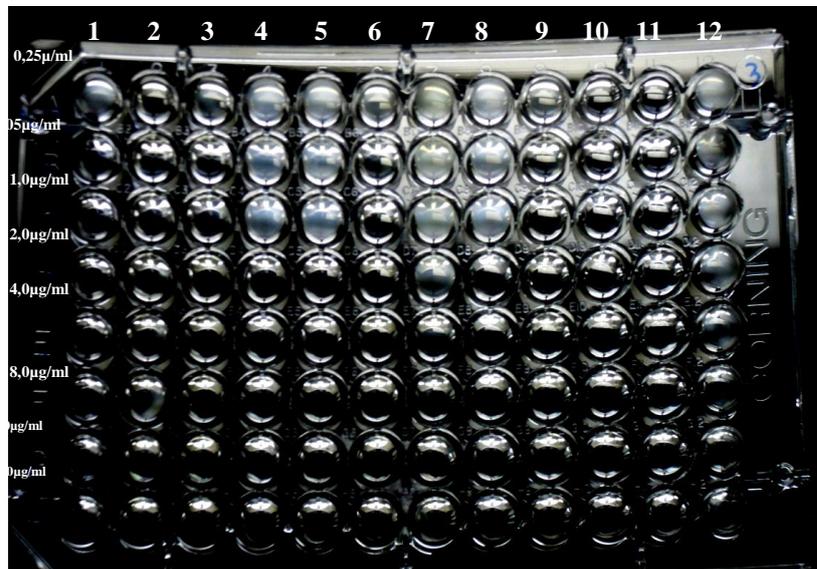
\*\* *Staphylococcus* Coagulase Negativo

\*\*\* Concentração Inibitória Mínima



**Figura 9 - Frequência e distribuição das espécies de *Staphylococcus* resistentes nos testes de Microdiluição em Caldo e Microdiluição em Agar.**

Nas figuras 10 e 11, uma representação da positividade nos testes de Microdiluição em Caldo e Microdiluição em Agar.



**Figura 10 - Imagem de uma placa para microtitulação revelando a Concentração Inibitória Mínima em *Staphylococcus* spp. através da técnica de Microdiluição em Caldo.**

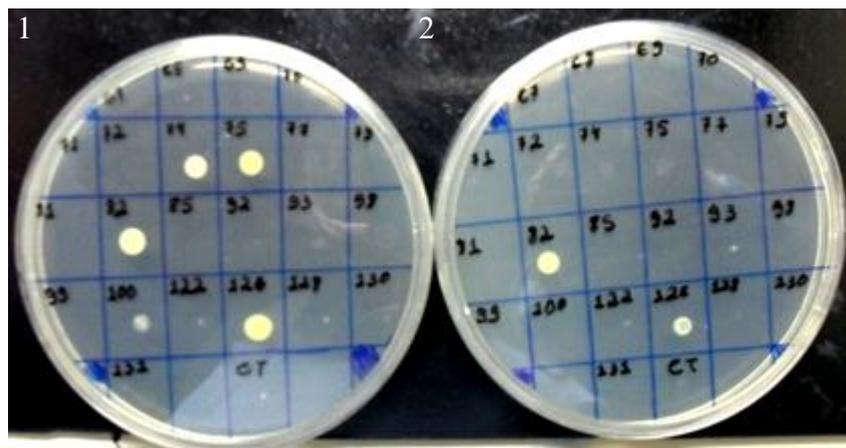
\* 1 – Controle negativo *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213.

2 – Branco.

3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 – Turvação dos poços indicando crescimento bacteriano.

7 – Controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300.

10, 11 – Poços límpidos não indicando crescimento bacteriano.



**Figura 11 - Imagem revelando a Concentração Inibitória Mínima em *Staphylococcus* spp. através da técnica de Diluição em Agar.**

\* 1 Placa de Microdiluição em caldo 0,5µg/ml de oxacilina

2 Placa de Microdiluição em caldo 2,0µg/ml de oxacilina

A importância de *S. aureus* metilina ou oxacilina resistente aumentou a partir da década de 80, sendo considerado, atualmente, o maior problema clínico e epidemiológico em infecções hospitalares (MORENO et al., 2000).

Diferentes métodos fenotípicos vem sendo empregados para detecção rotineira da resistência de *Staphylococcus* à oxacilina destacando-se os testes de disco-difusão como os mais amplamente utilizados. Entre todas as penicilinas penicilinase-estáveis, a oxacilina é a preferida para testes *in vitro* (SAKOULAS et al., 2001) e vem sendo utilizada por várias décadas, no entanto apresenta acurácia variada provavelmente devido à ocorrência do fenômeno da heteroresistência (SWENSON et al., 2001; SWENSON & TENOVER, 2005).

Mais recentemente, o teste de disco-difusão com cefoxitina para o diagnóstico da resistência à oxacilina é comparável em acurácia ao teste com disco de oxacilina, porém em geral o primeiro teria leitura mais fácil, devido ao maior halo e à possibilidade de ser lido usando luz refletida, e não transmitida, como no caso do disco de oxacilina (SWENSON et al., 2001; SWENSON & TENOVER, 2005). A cefoxitina induz a produção de PBP2 e tem uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica, além de ser resistente à ação de beta-lactamases produzidas por *Staphylococcus* (CLSI, 2012).

O *Screen Agar* tem sido utilizado como um dos métodos de confirmação para a resistência à oxacilina em provas de difusão. A literatura aponta que a técnica do *Screen Agar* suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina pode ser utilizado para detecção da resistência com boa acurácia (MIMICA et al., 2007; SHARP et al., 2005), sendo portanto recomendada pelo CLSI (atualizado anualmente).

Em estudo realizado por (SANTOS, 2006), 73,68% das amostras que foram resistentes no teste de disco-difusão foram confirmadas no *Screen Agar*.

No presente estudo em relação aos testes de disco-difusão para oxacilina e cefoxitina e *Screen Agar*, houve concordância quanto a suscetibilidade, onde 100% das cepas analisadas foram sensíveis, porém divergiu dos resultados obtidos no CIM-Caldo e CIM-Agar, como demonstrado na Tabela 5. Nesses dois testes de Microdiluição não houve concordância dos resultados sendo 19 cepas resistentes a oxacilina no CIM-Caldo e destas, houve concomitância de cinco cepas resistentes no CIM-Agar.

Em um estudo realizado por Soares (2010), a técnica da Microdiluição em Caldo foi a técnica menos específica, assinalando que 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. Já, em relação a técnica de Microdiluição em Agar, Ferreira et al. (2003) relatou ser o teste de maior acurácia na detecção da resistência a oxacilina e considera esta técnica mais acurada que a difusão em disco, apresentando fácil interpretação.

De acordo com Santos (2006), Sadoyama (2003) e Ribas (2003) o *Screen Agar* demonstrou ser uma ferramenta útil na identificação de *Staphylococcus* resistentes a oxacilina. Porém, os resultados obtidos por Santos (2006) assinalam que este método não deve ser a única forma de diagnóstico já que, quando comparado ao CIM em duas ocasiões, este teste não foi capaz de demonstrar o crescimento de micro-organismos que demonstraram resistência comprovada pela CIM.

De acordo com Novak (1999) e Soares (2010) 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. Estudos realizados por Aarestrup (2001) relataram que o fenótipo de heteroresistência pode estar relacionado com a temperatura de incubação, tamanho do inóculo

e presença de NaCl, assim como induzida pelos próprios antimicrobianos beta-lactâmicos. Um fenótipo menos frequente é a resistência homogênea, onde toda população de células é altamente resistente. Consequentemente, tendo em vista a dificuldade na avaliação do perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus* spp. à oxacilina o CLSI (atualizado anualmente) preconiza condições distintas de temperatura, concentração de NaCl e a utilização do teste de difusão em disco com cefoxitina, para detecção do fenótipo de resistência à oxacilina.

Segundo o CLSI, entre os métodos que predizem a presença de *mecA*, o método de disco-difusão de cefoxitina é preferível ao homólogo usando a oxacilina, por ser melhor preditor, inclusive em relação ao *Screen Agar*.

Devido a rara ocorrência de mecanismos de resistência a oxacilina, não mediado pelo gene *mecA* em *S. aureus*, podem ser encontradas cepas resistentes a oxacilina, porém *mecA* negativas, geralmente esses testes são cefoxitina suscetível. Além disso, nesses casos os testes de microdiluição (CIM) devem ser relatados como resistentes à oxacilina quando  $\geq 4 \mu\text{g} / \text{ml}$  (CLSI, 2011).

Micro-organismos que exibem resistência às penicilinas resistentes à penicilinase são classificados como *S. aureus* meticilina (oxacilina) resistentes (“MRSA”). Tais micro-organismos são, também, frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (MANDELL et al., 1995). Este aspecto foi observado nos resultados obtidos no presente estudo no CIM somente em relação a TCY (Quadro 3), porém, níveis intermediários de suscetibilidade foram detectados para CLI (5 cepas), CIP (3) e ERI (1) em 8 das 19 cepas resistentes a oxacilina no CIM-Caldo (dados não tabelados).

## **4.6 Caracterização Genotípica da Resistência aos Beta-lactâmicos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

### **4.6.1 Detecção do gene *blaZ* para produção de beta-lactamase**

A análise molecular através da PCR para caracterização do gene *blaZ* foi realizada nas 43 cepas positivas no teste da cefalosporina cromogênica (nitrocefina).

Atualmente, mais de 90% dos isolados de estafilococos nosocomiais e comunitários são produtores de penicilinase e resistentes a outras classes antibióticas como macrolídeos (eritromicina), estreptomicinas e tetraciclina (LOWY, 2003).

A resistência estafilocócica a penicilina é mediada pelo gene *blaZ*, estando associada à produção de beta-lactamase (predominantemente extracelular) sintetizada quando os estafilococos são expostos aos antibióticos beta-lactâmicos. Sob o controle de dois genes regulatórios, o anti-repressor *blaRI* e o repressor *blaI*, o gene *blaZ*, encontra-se localizado em um plasmídeo conjugativo, frequentemente relacionado a genes adicionais de resistência (gentamicina e eritromicina) (LOWY, 2003; MACHADO, 2007).

Pitkala et al. (2007) relataram boa correlação entre o teste de detecção de beta-lactamases através de discos de nitrocefina e a técnica de PCR para detecção do gene *blaZ*. Este aspecto não foi evidenciado no presente estudo onde todos os isolados nitrocefina positivos foram negativos para o gene *blaZ*.

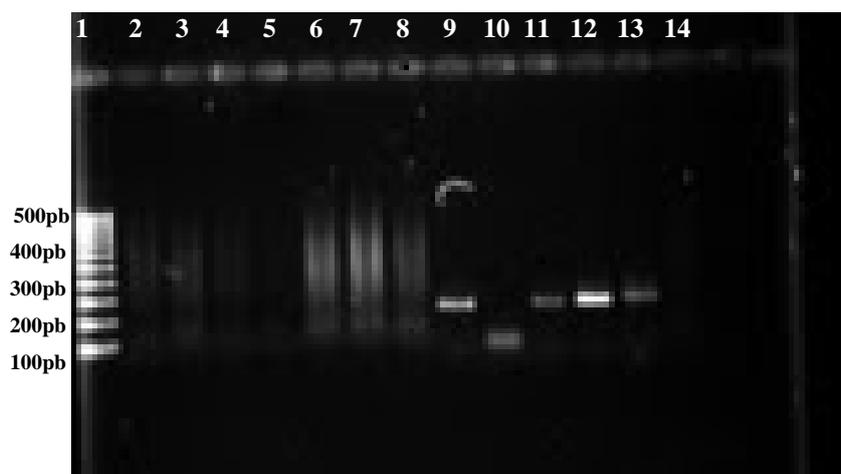
Analisando os resultados obtidos no presente estudo, entre os 43 isolados avaliados não foi possível identificar através da análise genética o provável mecanismo de resistência mediado pelo gene *blaZ*. Tal fato pode ser explicado por outros mecanismos não avaliados neste trabalho, a semelhança do ocorrido em relação ao gene *mecA*, citado mais adiante.

Haveri et al. (2005) relatam 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.

#### 4.6.2 Detecção do gene *mecA* para resistência a meticilina

A análise molecular através da PCR para caracterização do gene *mecA* realizada na totalidade das cepas (79) resultou negativa.

A ilustração abaixo (Figura 12) apresenta o perfil eletroforético em gel de agarose fragmento correspondente ao gene *mecA*.



**Figura 12 - Amplificação do fragmento correspondente ao gene *mecA***

\*1- Marcador de peso molecular 100pb

2 ao 8 – Cepas *mecA* negativas

9, 11, 12, 13 – Controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300

10 – Controle negativo *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213

14 - Braco

A resistência à oxacilina é determinada por um grande elemento genético denominado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), que carrega o gene *mecA*. Este fenótipo de resistência em *S. aureus* é muito frequente em cepas humanas associadas a infecção hospitalar e comunitária e em casos de mastite bovina, ocorrendo alterações das proteínas de ligação através da codificação de uma nova proteína alvo, denominada PBP2a ou PBP2' (GIESBRECHT et al., 1998). A PBP2a é uma proteína que possui alto peso molecular (78kDa), pertence a família das PBPs e é reconhecida por apresentar baixa afinidade aos beta-lactâmicos. Este mutante torna-se resistente à oxacilina, pois permite o crescimento de cepas bacterianas em concentrações de antibiótico que inativariam todas as PBPs. É sem dúvida, o principal mecanismo responsável pela resistência a oxacilina (BERGER-BÄCHI & ROHRER, 2002; RICARDO, 2004).

A regulação da produção da PBP2a e da beta-lactamase pode ser controlada tanto pela expressão do gene *mec* quanto do *bla*, pois ambos possuem um alto nível de homologia (MACHADO, 2007). Alguns genes designados *fem* (*factor essential for methicilin resistance*)

que são independentes do locus *mec* e contribuem para a expressão da resistência aos beta-lactâmicos estando presente no cromossomo de MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente) e MRS (*Staphylococcus spp.* metilina resistente) e participam da síntese de peptidoglicano dos *Staphylococcus* (MOUSSALLEM et al., 2007).

Testes para a detecção do gene *mecA* ou a proteína PBP2, são os métodos mais acurados para predizer resistência a oxacilina (CLSI, 2012).

No presente estudo, considerando a resistência detectada em 19 das 79 cepas (24%) no CIM-Caldo e em cinco destas cepas no CIM-Agar, várias hipóteses podem ser formuladas para a negatividade obtida, através da PCR, para a detecção do gene *mecA* que codifica resistência a metilina. Segundo Nadarajah et al. (2006) e McCallum et al. (2010) a ocorrência de cepas apresentando resistência a oxacilina nos testes fenotípicos porém negativas para o gene *mecA*, outros mecanismos podem estar envolvidos. Destacam a provável substituição do aminoácido na região responsável pela transpeptidação de parede da proteína PBP normalmente produzida. Isto já foi relatado em cepas que não continham o gene *mecA*, porém exibiam uma resistência fenotípica intermediária à oxacilina.

Outro evento já relatado que pode levar a uma resistência fenotípica a essas drogas sem a presença do gene *mecA* é uma super expressão da enzima beta-lactamase produzida por *blaZ*. Essa super expressão estaria relacionada com mais eventos regulatórios além do envolvimento do gene *blaZ* para ocasionar essa resistência (MONTANARI et al., 1996). Em relação a esta possibilidade, assinala-se no presente estudo, a negatividade para o gene *blaZ*, não havendo inclusive uma correlação com a positividade no teste do nitrocefim.

Porém existe ainda a possibilidade de uma soma de diversos fatores: uma PBP alterada no próprio gene intrínseco, super expressão de beta-lactamase, outros fatores regulatórios e a existência de heterogeneidade de expressão onde uma subpopulação se tornou predominante no momento do teste fenotípico. Além destes, outros fatores desconhecidos podem também estar envolvidos no processo (SWENSON, 2005).

Griethuysen et al. (2005) realizaram um estudo onde ficou demonstrado a perda do gene *mecA* em amostras mantidas em armazenamento sob congelamento. Neste estudo, a possibilidade da perda do gene aumentava de acordo com o tempo de estocagem das amostras, ou seja, quanto o maior o tempo de estocagem maior a probabilidade de perda do gene.

No presente trabalho, as amostras conservadas em Agar Nutriente Fosfatado e conservadas em temperatura ambiente foram submetidas aos testes bioquímicos para confirmação de gênero e espécie e mantidas nestas circunstâncias durante todas as etapas laboratoriais. Ressalta-se ainda que o DNA destes isolados foi extraído somente após a realização de todos os testes fenotípicos. O tempo prolongado da estocagem a temperatura ambiente bem como os sucessivos repiques, podem ter contribuído para a baixa taxa de detecção dos genes de resistência.

O aumento de estirpes de *Staphylococcus* resistentes à metilina / oxacilina, inclusive *Staphylococcus* coagulase-negativo, tornou-se um sério problema clínico e epidemiológico (BARBIER et al., 2010; VELASCO et al., 2005). *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) foram identificados principalmente em seres humanos e posteriormente detectados também em animais (LEE et al., 2004).

Os problemas causados por MRSA em ambientes hospitalares já são conhecidos e relatados há mais de 30 anos, contudo, sua presença fora do ambiente hospitalar vem sendo observada, com envolvimento em surtos alimentares e isolamento de diversos tipos alimentos. Esta pode ser uma forma de disseminação desta categoria de micro-organismo para a

população que não possui contato com hospitais ou estabelecimentos de saúde (JONES et al., 2002; KLEVENS et al., 2007).

Price et al. (2012) analisando o genoma de uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA CC398) permitiram conhecer a história evolutiva desta bactéria descoberta no início do ano 2000, a qual vem se disseminando rapidamente, tornando-se uma causa emergente de infecções humanas, na maioria das vezes infectando pessoas com exposição direta a animais destinados à alimentação. Segundo os pesquisadores, a bactéria teve sua origem em humanos como *S. aureus* sensível a meticilina e se tornou resistente à tetraciclina e meticilina como resultado do uso rotineiro de antibióticos na produção animal.

Nos últimos anos, foi registrado o isolamento de MRSA em produtos alimentícios de diferentes origens e em locais de processamento de alimentos. Em 2004, Kitai et al. apresentaram evidências da existência de MRSA em carne de frango no Japão e, em 2006, Lee descreveu MRSA isolados de amostras de leite de vacas leiteiras.

Normano et al. (2007) analisando alimentos de origem animal na Itália, onde a incidência de infecções por MRSA é uma das mais altas da Europa, obtiveram 3,7% de *S. aureus* resistentes a meticilina. Apesar do pequeno número de amostras resistentes os autores apontam para a possibilidade da contaminação extra-hospitalar, o que constitui um grande risco, principalmente para as pessoas imunocomprometidas as quais não são capazes de criar barreiras à colonização e penetração gástrica do MRSA e, sendo assim, a ingestão de alimentos contaminados com *Staphylococcus* multirresistentes pode levar a infecções graves ou fatais.

Vyletělová et al. (2011) reportaram o isolamento de *Staphylococcus* meticilina-resistente no leite e *swab* nasal de vaca e cabra. Nenhuma cepa resistente foi encontrada no leite de ovelha, entretanto seis amostras de *S. epidermidis* resistentes à meticilina foram identificadas a partir de *swab* nasal dessas ovelhas.

Kluytmans (2010) fez uma análise da presença de MRSA em produtos alimentícios. Um dos problemas apontados foi a tolerância na legislação de muitos países, como o caso do Brasil, uma certa quantidade de *S. aureus* nos alimentos prontos para consumo, e o fato de que isto não é visto como um risco para saúde pública. Aponta, ainda, os diversos riscos da presença deste tipo de patógeno em alimentos e que este fato deve ser reconhecido como um problema a ser avaliado.

## 5 CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- A variedade de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo (3 espécies) e *Staphylococcus* coagulase-negativo (10) identificadas, evidencia que esta espécie animal é mais uma fonte de infecção e veiculadora, através de seus produtos, de *Staphylococcus* potencialmente patogênicos para o homem;
- Entre as espécies identificadas, *S. aureus* (29 cepas), *S. chromogenes* (15) e *S. intermedius* (9) ocorreram em maior número que, junto com *S. hyicus* (2 cepas), constituem as espécies de maior importância em alimentos;
- A produção de hemolisinas foi observada em sua maioria, nas cepas de *Staphylococcus aureus* (37,9%);
- O sinergismo hemolítico foi detectado em 16,4% das cepas não hemolíticas;
- O elevado percentual de resistência à penicilina (53,2%) e ampicilina (45,6%) nas amostras analisadas demonstra a limitação ao uso desses antibióticos no tratamento e o risco de veiculação desses através da cadeia alimentar;
- Foram reconhecidos oito perfis apresentando resistência a uma ou mais drogas, destacando-se o perfil de multirresistência (AMP, PEN, CIP, TCY) em apenas uma cepa de *S. aureus*;
- Não foi observada uma correlação entre os testes fenotípicos de resistência a oxacilina, destacando-se a negatividade no *Screen Agar* e nos testes de disco-difusão para oxacilina e cefoxitina e positividade nos testes de Microdiluição em Caldo (19 cepas) e Agar (5 das 19 cepas resistentes no CIM-caldo);
- A caracterização genotípica da resistência mediada pelos genes *blaZ* e *mecA* resultou negativa;
- Não houve correlação entre os testes fenotípicos de CIM e genotípicos para a caracterização da resistência aos beta-lactâmicos mediada pelos genes *blaZ* e *mecA*.

## 6 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.
- ABO ELNAGA, I.G.; HESSAIN, A.; SARHAN, H.R. Bacteria and food poisoning organisms in milk. **Die Nahrung**, v.29, p.375-380, 1985.
- ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk in the North of Palestin. **Turk J Biol**, v.29, p. 229-232, 2005.
- AGVALD-OHMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. Multiresistant coagulase-negative *staphylococci* disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. **Crit Care**, v.8, p.42-47, 2004.
- ALCARÁZ, L.; TALON, D.; BERTRAND, X. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative *staphylococci* isolated from nosocomial specimens. **Brazil Journal of Microbiol**, v.34, p.45-51, 2003.
- ALEIXO, P.C. **Determinação Direta de Fe e Se em Leite por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite**. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2000. Dissertação de mestrado, 123p.
- ALI-VEHMAS, T.; VIKERPUUR, M.; PYÖRÄLÄ, S.; ATROSHI, F. Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. **Microbiol. Res**, v.155, n.4, p.339-344, 2001.
- ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Rev. Saúde Pública**, v.34, n.6, p. 578-580, 2000.
- ALMEIDA, L.M. **Fatores de virulência e genes regulatórios agr de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastites bovina e ovina**. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Farmácia – USP, 2009. Dissertação de Mestrado, 96p.
- ANAND, K.B.; AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; KAPILA, K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian J Med Microbiol.**, v.12, p. 27-29. 2009
- ANNEMULLER, C.; LAMMLER C. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.15, p.217-224, 1999.
- ANVISA. **Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. 2004.
- APPELBAUM, P. C., Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis.**, v.45, suppl.3, p.165 – 170, 2007.

ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; THANASSI, J.A.; PUCCI, M.J. Dissemination among *staphylococci* of DNA sequences associated with methicillin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, p. 447–454, 1994.

ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO, F. Microbiological quality and somatic cell count of ewe Milk with special reference to *staphylococci*. **J Dairy Sci.**, v.85, p.1370-1375, 2002.

ASSENAT, L. **Composición e propiedades**. In: LUQUET, F.M. Leche e productos lácteos: vaca-oveja-cabra. Zaragoza: Acribia, 1991. p.277-313.

ASSUMÇÃO, E.G.; VALLE-PICCOLI, R.H.; ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.3, Belo Horizonte (MG), jun, 2003.

AYLIFFE, G.A. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis**. v.24 (suppl 1), S74-S79, 1997.

BANDEIRA, F. S. **Morfologia e comportamento bioquímico de cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* isoladas em vacas leiteiras**. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BANNERMAN, T.L.; PEACOCK, S.J. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci; In: Murray, P.; Baron, E.; Jorgensen, J.; Landry, M.; Tenover, M. **Manual of Clinical Microbiology**, 9<sup>th</sup> Edition, ASM Press, Chapter 28, 2007.

BANNERMAN, T. M. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase- positive cocci that grow aerobically. In : MURRAY, B.E.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H., editors. **Manual of Clinical Microbiology**, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.384-403, 2003.

BARBIER, F.; RUPPE, E.; HERNANDEZ, D.; LEBEAUX, D.; FRANCOIS, P.; FELIX, B.; DESPREZ, A.; MAIGA, A.; WOERTHER, P.L.; GAILLARD, K. Methicillin-resistant coagulase negative *staphylococci* in the community: high homology of *SCCmec IVa* between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v.202, p.270–281, 2010.

BARRETO, M. F.; PICOLI, S.U. *Staphylococcus* em um Hospital de Porto Alegre (RS) **Rev Bras de Anál Clín.**, v.40 Porto Alegre, 2008.

BATAVANI, R.A.; MORTAZ, E.; FALAHIAN, K.; DAWOODI, M.A. Study on frequency, etiology and some enzymatic actives of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. **Small Rumin. Res.**, v.50, p.45-50, 2003.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in Epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**, v.79, p.1-16, 2003.

- BIRKBECK, H.T.; FREER, J.H. Interaction of *Staphylococcus aureus* .delta.-lysin with phospholipid monolayers. **Biochemistry**, v.21, n.26, p.6879–6883, 1982.
- BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Molecular Biology**. v.55, n.4, p.733-751, 1991.
- BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Wool Technology and Sheep Breeding**, v. 45,p. 182-220, 1997.
- BENCINI, R.; PURVIS, I.W. The yield and composition of milk from Merino sheep. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**,v.8, p.144-147, 1990.
- BERGER-BÄCHI, B.; ROHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in *staphylococci*. **Archives of Microbiology**, v.178, n.3, p.165-171, 2002.
- BERGEY'S. **Manual of determinative bacteriology**. 9ed. Baltimore: M.D. Williams & S.T. Wilkins, 1994. 787p.
- BERMAN, D.S.; EISNER, W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **N Engl J Med.**, v. 329, p. 1896, 1993.
- BOERLIN, P.; KUHNERT, P.; HUSSY, D.; SCHAELLIBAUM, M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in case of bovine mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.767-771, 2003.
- BOISSON, K.; THOUVEREZ, M.; TALON, D.; BERTRAND, X. Characterization of coagulase-negative *staphylococci* isolated from blood infections: incidence, susceptibility to glycopeptides, and molecular epidemiology. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 21, p.660-665, 2002.
- BOHACH, G.; DINGES, M.M.; MITCHELL, D.T.; OHLENDORF, D.H.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins, p. 83–111. In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), **The Staphylococci in human disease**. 1997.
- BOHACH, G.A.; FOSTER, T.J. *S aureus* exotoxins In: FISCHETTI,V.A. et al., Gram-Positive Pathogens. **American Society for Microbiology**. p.367-378, 2000.
- BONNA, I.C.F.; SANTOS, A.P.V.; TEIXEIRA, C.N.; MOTTA, O.V. *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes a drogas isoladas de leite de búfalas (*Bubalus Bubalis*). **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.14, n.2, p.117-121, 2007.
- BOYCE, J.M. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. **Journal Hospital Infection**, v. 48, p.9-14, 2001.
- BRAOIOS, A. **Estudo de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas**. 2005. 102f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara .
- BRAKSTAD, O.G.; MAELAND, J.A. Mechanisms of methicillin resistance in *staphylococci*. **APMIS**, v.105, n.4, p.264- 276, 1997.

BRAMLEY, A.J.; PATEL, H.A. REILLY, M.O. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. **Infect Immuno**. v.57, p.2489, 1989.

BRASIL. **Ministério da Agricultura. Instrução Normativa 51**. Brasília, 2002. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 28 dez 2010.

BRASIL. Portaria n.352, de 4 de setembro de 1997. O Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento institui o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas frescal. In: SANTOS, J.A., ed. **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, diet, light e enriquecidos**. São Paulo: Fonte Comunicações, p.76-78, 1997.

BRITO, M.A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo de ovinos leiteiros em confinamento**. Porto Alegre, 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

BROWN, D.J.F. Detection of methicillin/oxacillin resistance in *staphylococci*. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 48, n.1, p. 65-70, 2001.

BYARUGABA, D.K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.24, p.105-110, 2004.

CAIERÃO, J.; LUND, B.; EDLUND, C. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative *staphylococci* (CSN). **J Med Microbiol**, v.6, p.17-22, 2004.

CALDERÓN-JAIMES, E.; MONTEROS, L. E. E.; AVILA-BELTRÁN, R. Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci* infections. **Salud Pública de México**, v.44, p. 108-112, 2002.

CALLEGAN, M.C.; ENGEL, L.S.; HILL, J.M.; O'CALLAGHAN, R.J. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. **Infect. Immun.** v.62, p.2478, 1994.

CARVALHO, C. E.; BEREZIN, E.M. Monitoramento microbiológico sequencial de secreção traqueal de pacientes intubados em UTI pediátrica. **Journal Pediatric**, Rio de Janeiro, v. 81, p.23-29, 2004.

CEBALLO, P.P. **Meroja de la calidad de leche un factor estratégico en la calidad competitiva del sector lechero**. In: WORKSHOP "SÍNDROME DO LEITE ANORMAL E QUALIDADE DO LEITE." São Paulo: USP, 1999.

CHAFFER, M.; LEITNER, G.; WINKLER, M.; GLICKMAN, A.; KRIFUCKS, O.; EZRA, E.; SARAN, A. Coagulase-negative *staphylococci* and mammary gland infections in cows. **Zentralbl Veterinarmed B.**, v.46, p. 707-712, 1999.

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

CHARLIER, C.; CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v.131, p.30-39, 2009.

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

CLSI/Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically**. CLSI M7 A9 Ed. 9. 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standard—eleventh edition. Wayne, PA: CLSI; 2012. CLSI document M02-A11.

COELHO, S. de M. de O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. de C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. de. 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, janeiro-fevereiro, 2007.

CONTRERAS, A et al. **Significance of pathogens in goat mastitis**. In 7th INTERNATIONAL CONFERENCE IN GOATS, Tours. Anais... Tours editora, 2000. p.753-754.

CORBIA, A.C.G.; NASCIMENTO, M.G.F.; OLIVEIRA, C.Z.F.; NASCIMENTO, E.R. *Staphylococcus aureus*: Importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos. In: EMBRAPA. **Documento Nº 114**, 14 p. 2000.

CORSO, A.; BOOGAARD, L.V.D.; BOELEN, H.A.M.; PETERS, J. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative *staphylococci*. **Diagnost Microbiol and Infect Disease**, v.50, p.223-225, 2004.

COSTA, F.N.; LIMA, R.M.S.; RABELO, R.N. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isoladas de derivados lácteos. **Hig. Aliment.**, v.16, p.80-83, 2002.

COSTA, G.A. & HOFER, E. Isolamento e identificação de enterobactérias. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. 120p. 1972.

COUTINHO, D.A.; COSTA, J.N.; RIBEIRO, M.G.; TORRES, J.A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.7, n.2, p. 139-151, 2006.

CUNHA, M.L. **Significância etiológica e características de estafilococos coagulase-ativo isolados de processos infecciosos em recém nascidos.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina UNESP, Botucatu, 1998.

CUNHA, M.L.; LOPES, C.A.; RUGOLO, L.M.; CHALITA, L.V. Clinical significance of coagulase-negative *staphylococci* isolated from neonates. **J Pediatr**, n.78, p.279-288, 2002.

CUNHA, M.L.; SINZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.D. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *staphylococci*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.8, p.855-860, 2004.

DeLANCASTRE, H.; FIGUEIREDO, A.M.S.; URBAN, C.; RAHAL, J.; TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 632-639, 1991.

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

DEURENBERG, R.H. & STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infect Gen Evol**, n.8, p. 747-763, 2008.

DEVRIESE, L.A. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. **J. Appl. Bacteriol.**, v.56, p.215-220, 1984.

DEVRIESE, L.A.; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicilin (cloxacillin)- resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated from bovine mastitis cases. **Zbl. Vet.B.**, v. 19, p. 598-605, 1972.

DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v. 5, n. 2, p. 3-6, 2002.

DROPA, M. **Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo.** 116p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

EMEDIATO, R.M.S. **Qualidade do leite ovino. 2008.** Disponível em: [www.farmpoint.com.br/.../qualidade/qualidade-do-leite-ovino-43014](http://www.farmpoint.com.br/.../qualidade/qualidade-do-leite-ovino-43014). Acesso em: 12 fev 2012.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*.** 2012. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em 02 fev. 2012.

FARR, B.M. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.17, n.4, p.317-322, 2004.

FDA/CFSAN (2003). **Bad Bug Book**. *Staphylococcus aureus*. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>> Acesso em 03 de janeiro de 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Bacteriological Analytical Manual - BAM**, 2011. 8 ed. Revision A. 1998. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em: 10 jan. 2012.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological and Analytical Manual Online**. USA. 2001. Last Updated: 11/13/2011 Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm>. Acesso em: 10 jan. 2012.

FENG, Y.; CHEN, C.; SU, L. et al. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 32, p. 23-37, 2008.

FELTEN, A.; GRANDRY, B., LAGRANGE, P. H. & CASIN, I. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with ceftiofur and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p.2766–2771, 2002.

FERREIRA, L.M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L.M.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica Bovina. **Ciência Rural**, v. 36, n.4, p. 1228-1234, 2006.

FERREIRA, R.B.R.; GARCIA, P. Coagulase-negative *staphylococci*: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar Screening test by using different concentrations of oxacillin. **J Clin Microbiol**, v.41, p.3609-3614, 2003.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO [2011]. **FAOSTAT – FAO Statistics Division/ProdSTAT: livestock (primary and processed)**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/596/DesktopDefault.aspx?PageID=569>> Acesso em: 25 jan. 2012.

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

FTHENAKIS, G.C.; JONES, J.E. The effect of inoculation of coagulase negative *Staphylococci* into the ovine mammary gland. **J. Comp. Pathol.**, v.102, p.211-219, 1990.

FURTADO, M.M. **Queijos finos maturados por fungos**. São Paulo: Milkbiz, 2003. 128p.

GANDRA, E.A.; SILVA, J.A.; MACEDO, M.R.P.; ARAÚJO, M.R.; MATA, M.M.; SILVA, W.P. Diferenciação bioquímica entre *S. aureus*, *S. Intermedius* e *S. hyicus* isolados em bovinos com mastite subclínica. **Archives of Veterinary Science**, v.10, p.75-81, 2005.

GARCIA-CASTELLANOS, R.; MALLORQUI FERNANDEZ, G.; MARRERO, A.; POTEPA, J.; COLL, M.; GOMIS-RUTH, F.X. On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with its operator. **J Biol Chem**, v.276, n.17, p.17888-17896, 2004.

GARRITY, G.M.; **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2<sup>nd</sup> Edition: v.3: The Low G+C Gram positives. Springer-Verlang, New York. ISBN 0-387-95041-9, 2006.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole; 2007.

GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHO, H.; WECKE, J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.62, n.4, p.1371-1414, 1998.

GLINN, B.; LAHIFF, S.; WERNWCKE, M.; BARRY, T.; SMITH, T.J.; MAHER, M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**, v.59, n.2, p.126-139, 2006.

GOLD, H.S.; MOELLERING, R.C. Antimicrobial-drug resistance. **N Engl J Med**. v.335, p.1445-1453, 1996.

GORDON, R.; LOWY, F.D. Pathogenesis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clin Infect Dis**, n.46, p.350-359, 2008.

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

GRIETHUYSEN, A.van.; LOO, I.van.; BELKUM, A.van.; VANDENBROUCKE-GRAULS, 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**, v.43, n.3, p.1361-1365, 2005.

GUARANÁ, E.L.S.; SANTOS, R.A.; CAMPOS, A.G.S.S.; SILVA, N.S.; AFONSO J.A.B.; MENDONÇA C.L. Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n.10, p.851-858, 2011.

GUSTAFSON, J.E.; BERGER-BACHI, B.; STRASSLE, A.; WILKISON,B.J. Autolysis of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, n.3, p.566-572, 1992.

GWEN, B.; JEFFREY, P.; BARRY, C.S. Community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA MRSA). **Guidelines for clinical management and control of transmission**, Wisconsin Division of Public Health University, 2005.

HACKBARTH, C.J.; CHAMBERS, H.F. *blaI* and *blaRI* regulate beta-lactamase and PBP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.37, n.5, p.1144-1149, 1993.

- HACKBARTH, C.J.; CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistant *staphylococci*: genetics and mechanisms of resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, n.7, p.991-994, 1989.
- HAVERI, M.; S, SUOMINEN.; L, RANTAL.; T, HONKANEN-BUZALSKI.; S, PYORALA. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Vet. Microbiol.*, v.106, p.97–102, 2005.
- HEBERT, G.A.; HANCOCK, G.A. Synergistic hemolysins exhibited by species of *staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, n.3, p.409-415, 1985.
- HENZE, U.; SIDOW, T.; WECKE, J.; LABISCHINSKI, H.; BERGER-BACHI, B. Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v.75, n.6, p.1612-1620, 1993.
- HENZE, U.; BERGER-BACHI, B. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, n.9, p.2121-2125, 1996.
- HIRAMATSU, K.; WATAMABE, S.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; BABA, T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, v.6, n.22, 2004.
- 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.
- HOLEČKOVÁ, B.; KALINÁČOVÁ, V.; GONDOL, J.; FOTTA, M.; HOLODA, E. ; BELIČKOVÁ, E. Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v.48, p. 41-45, 2004.
- HOLTJE, J.V. The alternative to penicillins. **Nat Med**, v.10, p.1100-1101, 2001.
- HOOPER, D.C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. **Lancet Infect Dis, Boston-USA**, v.2, n.9, p. 530-538, 2002 Sep.
- HUANG, S.Y.; TANG, R.B.; CHEN, S.J.; CHUNG, R.L. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility. **J Microbiol Immunol Infect**, n.36, p.51-55, 2003.
- HUESTON, W.D.; BONER, G.J.; BAERTSCHE, S.L. Intra-mammary antibiotic treatment at the end of the lactation for prophylaxis and treatment of intra-mammary infections in ewes. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**,v. 194, p. 1041-1044, 1989.
- HUSEBY, M.; SHI, K.; BROWN, C.K.; DIGRE, J.; MENGISTU, F.; SEO, K.S.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M.; OHLENDORF, D.H.; EARHART, C.A. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.**, vol 189, n.23, p.8719-8726, 2007.
- ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of the pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p.1449-1458, 1999.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n.5, p.1323-1336, 2001.

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

JANDAL, J.M. Comparative aspects of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.22, n.2, p.177-185, 1996.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 4 ed. New York: Chapman & Hall, 1992. cap.22. p.553-582.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6 ed. Maryland: Aspen Publishers, 635 p., 2000.

JOHN, M.A. et al. 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.

JONES, C.H.; TUCKMAN, M.; HOWE, A.Y.M.; et al. Diagnostic PCR analysis of the occurrence of methicillin and tetracycline resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolates from phase 3 clinical trials of tigecycline for complicated skin and skin structure infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.505-510, 2006.

JUNIOR, F.G.; CAMBOIM, E.K.A.; Das NEVES, P.B.; De SÁ, A.V.V.; ALMEIDA, A.P. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. **Arq. Inst. Biol**, v.78, n.1, p.103-107, 2011.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, p.1549-1555, 2000.

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*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.7, p.1955-1963, 2001.

KIBENGE, F.S.B.; ROOD, J.I.; WILCOX, G.E. Lisogeny and other characteristics of *Staphylococcus hyicus* isolated from chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.8, p.411-415, 1983.

KILIÇ, E.; YALINAY ÇIRAK, M. Comparison of Staphylococcal Beta-lactamase Detection Methods. **FABAD J. Pharm. Sci.**, v.31, p.79-84, 2006.

KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; KITAGAWA, H. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. **J Vet Med Sci.**, v.67, p.269–274, 2005.

KLEVENS, M.R. et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. **JAMA**, v.298, n.15, p.63-1771, 2007.

KLOSS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update of clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin Microbiol Rev**, n.7, p.117-140, 1994.

KLOSS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **J Clin Microbiol**, n.1, p.82-88, 1975.

KLOOS, W. E.; JORGENSEN, J. H. *Staphylococci*. In: LENETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 4 Ed. Washington: American Society for Microbiology, Cap.15, p.143-153, 1985.

KLUYTMANS, J.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? **Clin Microbiol Infect.**, v.16, n.1, p.11-15, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6a ed. 2008.

LAMPLANTE, K.L.; RYBAK, M.J.; AMJAD, M.; KAATZ, G.W. Antimicrobial susceptibility and staphylococcal chromosomal cassette *mec* type in community- and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmacotherapy**, v. 27, p.3-10, 2007.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **R Bras Cienc Vet.**, v.13, p.51-54, 2006.

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

LARSEN, H.D. et al. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v.71, n. 1-2, p.89-101, 2000.

LEE, J.H.; JEONG, J. M.; PARK, Y. H. et al. Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. **J. Clin. Microbiol.**, Jun., v. 42, n. 6, p. 2780-2782, 2004.

LEE, J.H. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **App Environm Microbiol.**, v.69, n.11, p.6489-6494, 2003.

LEITE, Z.T.C.; VAITSMAN, D.S.; DUTRA, P.B. Leite e alguns dos seus derivados - da antiguidade à atualidade. **Quim. Nova.**, v.29, n.4, p.876, 2006.

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

LIASSINE, N.; AUCKENTHALER, R.; DESCOMBERS, 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.825-828, 2004.

LIM, T.T.; COOMBS, G.W.; GRUBB, W.B. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. **J Antimicro Chemother**, v.50, n.6, p.819-824, 2002.

LINEHAN, D.; ETIENE, J.; SHEEHAN, D. Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially purified β-like toxin from *Staphylococcus schleferi*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v 36, p.95-103, 2003.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in *staphylococci*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, p.3-10, 2000.

LIVERMORE, D.M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.8, n.4, p.557-584, 1995.

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

LOUIE, L.; KARLSSON, C.; WISTROM, F. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **J Clin Microbiol**, v.39, p.4149-4151, 2001.

LOLLAI, S.A.; ZICCHEDDU, M.; MAUROB, C.D.; MANUNTA, D.; NUDDAB, A.; LEORI, G. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 249-254, 2008.

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

LYON, B.R; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiol Rev**, v. 51, n.1, p.88-134. Review, 1987.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco**. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

MACEDO Jr., G.L. **Influência de Diferentes Níveis de FDN Dietético no Consumo, Digestibilidade Aparente e Comportamento Ingestivo de Ovelhas Santa Inês**. Dissertação (mestrado). Zootécnica. Área de Concentração: Nutrição de Ruminantes. Universidade Federal de Lavras - MG, 2004, 127p.

MACHADO, A.B.M.P. **Resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA* nos *Staphylococcus spp* coagulase negativa.** 2010. 162 P. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

MANDELL, G.; DOUGLAS, J.; BENNETT. R. **Principles and practices of infectious diseases.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

MARANAN, M.C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci*: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infect Dis Clin N Am**, v. 11, p. 813-49, 1997.

MARSHALL, S.A.; WILKE, W.W.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci* from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.30, n.3, p.205-14, 1998.

MA, X.X.; ITO, T. TIENSASITORN, C.; JAMKLANG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S.; HIRAMATSU, K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* indentified in community-acquird methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46, n.4, p.1147-1152, 2002.

McCALLUM, N.; BERGER-BACHI, B.; SENN, M.M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Int J Med Microbiol**, v.300, p.118-129, 2010.

McDOUGAL, L.K.; THORNSBERRY, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **J Clin Microbiol**, v.23, n.5, p.832-839, 1986.

McKUSICK,B.C.;THOMAS,D.L.;BERGER,Y.M. et al. Effect of milking interval on alveolar versus cisternal milk accumulation and milk production and composition in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.9, p.2197-2206, 2002.

MEDEIROS, E.S et al. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus spp*. isoladas de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, vol.29, n.1 p. 71-75, 2009.

MEDEIROS, J.X. **Agronegócio e o trabalho cooperativo.** In: WORKSHOP SOBRE CAPRINOS E OVINOS TROPICAIS. 1998, Fortaleza. Relatório... Fortaleza: BNB, 1998, p.8.

METAN, G.; ZARAKOLU, P.; UNAL, S. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. **J. Hosp. Infect.**, v. 61, p. 93-99, 2005.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, vol.43, n.6, p. 399-406, 2007.

MIYAZAKI, N.H.T.; ABREU, A.O.; MARIN, V.A.; REZENDE, C.A.F.; MORAES, M.T. B.; BÔAS, M.H.S.V. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n.4, p. 539-540, june, 2007.

MONTANARI, M.P.; MASSIDDA, O.; MINGOIA, M.; VARALDO, P.E. Borderline Susceptibility to Methicillin in *Staphylococcus aureus*: A New Mechanism of Resistance? **Microbial Drug Resistance**, v.2, n.2, p. 257-260, 1996.

MONTGOMERY, K.; RAYMUNDO JR, L.; DREW, W.L. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. **J Clin Microbiol.**, v.9, n.2, p. 205–207, 1979.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. **International of Journal Microbiology**, v.2009, p.1-7, 2010.

MORONI, P.; PISONI, G.; VIMERCATI, C.; RINALDI, M.; CASTIGLIONI, B.; CREMONESI, P.; BOETTCHER, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chronically infected dairy goats. **J Dairy Sci.**, v.88, p. 3500-3509, 2005.

MOTA, R.A. **Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos.** Disponível em: [http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca\\_v2\\_n3\\_set/tca08\\_aspectos\\_epid.pdf](http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v2_n3_set/tca08_aspectos_epid.pdf) Acesso em: 12 fev. 2012.

MOUSSALLEM, B. C.; KURY, C.M.H.; ACOSTA, E.M. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus spp.* Isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 2. Rio de Janeiro, 2007.

MUEHLHERR, J.E.; ZWEIFEL, C.; CORTI, S.; BLANCO, J.E.; STEPHAN, R. Microbiological Quality of Raw Goat's and Ewe's Bulk-Tank Milk in Switzerland. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 12, p. 3849-3856, 2003.

NADARAJAH, J.; LEE, M.J.S.; LOUIE, L.; JACOB, L.; SIMOR, A.E.; LOUIE, M.; MCGAVIN, M.J. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with *borderline* oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. **J Med Microbiol.**, v.55, p.1675-1683, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; (Approved Standard - fifth edition M7-A5) supplemental tables M11-S10, V.20 (2), january 2000, Wayne, Pennsylvania, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** Twelfth information supplement. NCCLS document M100-S12, Wayne, Pennsylvania, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M7-A6. NCCLS, Wayne, Pa. 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fourteenth Information Supplement M100-S14, NCCLS, Wayne Pennsylvania, USA, 2004.

NISHIYAMA, A.; GUERRA, M.A.; 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, p.328-35, 2002.

NORDHAUG, M.L. **Immunization against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle and sheep**, 1993.

NORMANO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A.L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food of animal origin product in Italy. **Int J Food Microbiol.**, v.117, p.219-222, 2007.

NOVAK, F.R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999, 102 p.

NUDDA, A.; BENCINI, R.; MIJATOVIC, S. et al. The yield and composition of milk in Sarda, Awassi and Merino sheep milked unilaterally at different frequencies. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.11, p.2879-2884, 2002.

NUNES, E.L.C. **Deteção molecular do determinante genético da resistência a mupirocina em *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina**. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000. 72p.

OLIVEIRA, J.J. 2000. A solução é palpar o úbere da Santa Inês. O Berro, Uberlândia, nov./dez. Disponível em <[http://www.zebus.com.br/zootecnia3\\_40\\_berro.htm](http://www.zebus.com.br/zootecnia3_40_berro.htm)> Acesso em 07 fev. 2012.

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

O'SULLIVAN, M.V.; CAI, Y.; KONG, F.; ZENG, X.; GILBERT, G.L. Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. **J Clin Microbiol**, v.44, p.4072-4076, 2006.

OTSUKA, T.; ZARAKET, H.; TAKANO, T.; SAITO, K.; DOHMAE, S.; HIGUCHI, W.; YAMAMOTO, T. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. **Clin Microbiol Infect.**, v.13, n.3, p.325-327, 2007.

PARK, P.W.; FOSTER, T. J.; NISHI, E.; DUNCAN, S.J.; KLAGSBRUN, M.; CHEN, Y. Activation of Syndecan-1 Ectodomain Shedding by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin and  $\beta$ -toxin. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n.1, p.251-258, 2004.

PATEL, M et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 7, p. 2481-2484, 2006.

PEETERS, R. et al. Milk yield and milk composition of Flemish Milkshewp, Suffolk and Texel ewes and their crossbreds. **Small Ruminant Research**, v.7, p.279-288, 1992.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER, K.; KERESZTÚRI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **Int J Food Microbiol.**, v.118, n.2, p.186-193, 2007.

PEREIRA, C.I.; GOMES, E.O.; GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Proteolysis in model portuguese cheeses: effects of rennet and starter culture. **Food Chem.**, v.108, p. 862-868, 2008.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Satphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v.26, p.278-282, 2009.

PERESI, J.T.M.; GRACIANO, R.A.S.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; RIBEIRO A.K.; CARVALHO, I.S. Queijo tipo Minas Frescal artesanal e industrial: qualidade microbiológica e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. **Hig Aliment.**, v.15, n.83, p.63-70, 2001.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; SADER, H.S.; KUGLER, K.C.; BEACH, M.L. et al. Survey of bloodstream infections due to gram-positive cocci: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.33, p.283-297, 1999.

PICOLI, S.U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT,V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, p.1, p.64-69, jan-mar, 2006.

PILIPČINCOVÁ, I.; BHIĐE, M.; DUDRIKOVÁ,E.; TRÁVNÍČEK, M. Genotypic Characterization of Coagulase-negative *Staphylococci* Isolated from Sheep Milk in Slovakia. **Acta vet. brno**, v.79, p. 269-275, 2010.

PINHO, M.G.; De LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant *staphylococci*. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, n.19, p.10886-10891, 2001.

PITKALA, A.; SALMIKIVI, L.; BREĐBACKA, P.; MYLLYNIEMI, A.L.; KOSKINEN, M.T. Comparison of tests for detection of beta-lactamase-producing *staphylococci*. **J Clin Microbiol**, v.45, p.2031–2033, 2007.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter attack**. Country Farm Drive Naparville, 1991. 150 p.

PPM/IBGE. 2011. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2002&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1). Acesso em: 25 jan. 2012.

PRICE, L.B.; STEGGER, M.; HASMAN, H. et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. **mBio**. (mbio.asm.org). v.3, p.1-7. 2012.

PULINA, G.; NUDDA, A. Milk production. In: PULINA, G. (Ed). **Dairy sheep nutrition**. CABI Publishing, 2004, chap. 1, p. 11-27.

RAJALA-SCHULTZ, P.J.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. et al. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Vet. Microbiol.**, v.102, p.33-42, 2004.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PIRISI, A.; CRÉMOUX, R.; GONZALO, C. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. **Small Rum. Res.**, v. 68, p.126-144, 2007.

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, Argentina. 199p. 2004

REMONATTO, G.; CARDOSO, C. M.; MARQUES, C. G. de; SILVA, A. E. B. da; GELATTI, L. C.; LEITE, C. F. M. CA-MRSA: um patógeno emergente. **News Lab.**, ed. 80, 2007.

RIBAS, R.M.; GONTIJO-FILHO, P.P; DARINI, A.L.C. Testes convencionais versus moleculares (Multiplex PCR e PCR gene *mecA*) na detecção de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. **Braz. J. Microbiol.** vol.34 suppl.1, 2003.

RICARDO, S.B. Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na Comunidade. **Prática Hospitalar**, v. 5, n. 34, julho-agosto, 2004.

RIZEK, C.F.; MATTÉ, M.H.; DROPA, M.; MAMIZUKA, E.M.; ALMEIDA, L.M.; LINCOPAN, N.; MATTÉ, G.R.; GERMANO, P.M.L. Identification of Carrying the A Gene in Ready-to-Eat Food Products Sold in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p.561-563, 2011.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. Prevalence of coagulase-positive *Staphylococci*, other than *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 57, p. 54-58, 1996.

ROGOLSKY, M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Rev**, v.43, p.320, 1979.

ROHENKOHL, J.E.; CORRÊA, G.F.; AZAMBUJA, D.F. et al. [2011]. **O agronegócio de leite de ovinos e caprinos**. Disponível em: [www.pucrs.br/eventos](http://www.pucrs.br/eventos). Acesso em: 19 de jan. 2012.

ROSA, J.O. **Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes a oxacilina isolados da saliva de profissionais da saúde de um hospital universitário.** Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, 2008. Dissertação de Mestrado, 84p.

SABER, H.S.; STREIT, J.M.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002–2004). **Clin Microbiol Infect.** v.12, p.844–852, 2006.

SADOYAMA, G. **Aspectos epidemiológicos de infecções relacionadas a cateteres vasculares centrais em pacientes cirúrgicos internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2003. 99p.

SALASIA, S.I.O.; KHUSNAN, Z.; LAMMLER, C.; ZSCHOCK, M. Comparative studies on pheno and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science,** v.5, n.2, p.103-109, 2004.

SAKAI, H.; PROCOP, G. W.; KOBAYASHI, N., et al. 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.

SAKOULAS, G. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. **J. Clin. Microbiol,** v.39, p. 3946-51, 2001.

SAMPIMON, O.C.; ZADOKS, R.N.; DE VliegHER, S.; SUPRE, K.; HAESEBROUCK, F.; BARKEMA, H.W.; SOL, J.; LAM, T.J.G.M. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology,** v.136, p.300-305, 2009.

SANTOS, C.D.M. ***Staphylococcus sp* e Enterobactérias Isoladas de Mastite Recorrente em Oito Rebanhos da Região de Uberlândia-MG: Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos.** Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG, 2006. Dissertação de Mestrado, 53p.

SANTOS, T.M.N. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana da Própolis Verde Frente a *Staphylococcus spp* Isolados de Mastite Caprina.** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE, 2007. Dissertação de mestrado, 86p.

SARAVOLATZ, L.D.; MARKOWITZ, N.; ARKING, L.; POHLOD, D.; FISHER, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. **Ann Intern Med.** v.97, p.325-329, 1982.

SCHEFFERS, D.J.; PINHO, M.G. Bacterial cells wall synthesis: new insights from localization studies. **Microbiol Mol Biol Rev,** v.69, n.4, p.585-607, 2005.

SCHRADER-FISCHER, G.; BERGER-BACHI, B. The AbcA transporter of *Staphylococcus aureus* affects cell autolysis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.2, p.407-412, 2001.

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* hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2254-2256, 2002.

SEVI, A.; ALBENZIO, M.; MARINO, R et al. Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. **Small Ruminant Research**, v.51, n.3, p.251-259, 2004.

SHARP, S.E.; WARREN, J.A.; THONSON, R.B. Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated and utility in the clinical laboratory. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, n.1, p.69-71, 2005.

SHORR, A.F. Epidemiology of Staphylococcal Resistance. **Clin Infect Dis.**, v.45, Supplement 3, S171-S176, 2007.

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

SILVA, W.P. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitis milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.31, p.103-106, 2000.

SILVA, F.V.; LOPES, G.S.; NÓBREGA, J.A.; SOUZA, G.B. & NOGUEIRA, A.R.A. Study of the protein-bound fraction of calcium, iron, magnesium and zinc in bovine milk. **Spectrochim. Acta Part B**, v.56, p.1909, 2001.

SILVA, M.G.C.M. **Produção de caprinos**. Lavras: UFLA - FAEPE, 2003. 56p.

SILVA, E.R. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis from Northeast of Brazil, **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.55, n.1-3, p.45-49, 2004.

SILVA, W. P. & GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, n.122, v.18, p. 32-39, 2004.

SKOV, R.; SMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A.R.; FRIDMONT-MOLER, N.; OLSSON-LILJEQUIST, B.E.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother**, v.46, n.3, p.879-881, 2003.

SOARES, L.C. **Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência de *Staphylococcus spp.* coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 82p., 2010.

SOUZA, A.C.K.O.de; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.da S.; OLIVEIRA, N.M. de; VAZ, C.M.S.; SOUZA, M.; CORRÊA, G.F.R. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. **Bras. Agrociência**, v.11, n.1, p.73, 2005.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E.P.L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 53–57, 2012.

SPANU, V.; SVIRDIS, S.; SCARANO, C.; COSSU, F.; DE SANTIS, E.P. L.; COSSEDDU, A.M. Antibiotic resistance assessment in *S. aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **Vet Res Commun**, v.34 (Suppl 1):S87–S90, 2010.

STANFORD, T.L.M. et al. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus spp.* isolated of milk in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.26, n.1, ene/mar. 2006.

STEFANI, S.; VARALDO, P.E. Epidemiology of methicillin-resistant *staphylococci* in Europe. **Clin. Microbiol. Infect**, v.9: p.1179-1186, 2003.

STYERS, D.; SHEEHAN, D.J.; HOGAN, P.; SAHM, D.F. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. **Ann Clin Microbiol. Antimicrob.** v.5, p.2, 2006.

SUTRA, L.; B, POUTREL. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v.40, p.79–89, 1994.

SWENSON, J.M.; LONSWAY, D.; MCALLISTER, S.; THOMPSON, A.; JEVITT, L.; PATEL, J.B. Detection of *mecA*-mediated resistance using cefoxitin disk diffusion (DD) in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing *borderline* oxacillin MICs. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.58, p.33-39, 2007.

SWENSON, J.M. et al. Performance of eighth methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. **J Clin Microbiol**, v.39, p. 3785-3788, 2001.

SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C. Cefoxitin disk study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus spp.* **J Clin Microbiol**, v.43, p.3818-23, 2005.

TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; MAARIT, H. et al. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative *staphylococci* identified with API or AFLP. **Vet. Microbiol.**, v. 115, n. 1-3, p. 199-207, 2006.

TIMPERLEY, C.; NORMAN, C. **O livro de queijos**. São Paulo: Manole, 1997, 119p.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; LENCASTRE, H.M.; JABES, D.; McDOUGAL, L.; BILLE, J. New Mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, p.1869-1874, 1989.

TRÁVNÍČEK, M.; DUDRÍKOVÁ, E.; PILIPČINCOVÁ, I. Ewes mastitis and their control. **Slov. Vet. Cas**, n.27, p.30-35, 2003.

- VALLE, J. et al. Enterotoxin production by *staphylococci* isolated from healthy goats. **Appl Environ Microbiol**, v.56, p.1323-1326, 1990.
- VAN BELKUM,A.; MELLES,D.C.; NOUWEN,J.L.; VAN LEEUWEN,W.B.; VAN,W.W.; VON,M.C.; WERTHEIM,H.J.; VERBRUGH,H.A. Co-evolutionary aspects of human colonization and infection by *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol**, n.9, p.32-47, 2009.
- VANDENBROUCKE-GRAULS, C. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Netherlands. **Rev. Med. Microbiol.** v.9, p.109-116, 1998.
- VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J.M.; HUARD, C.; PEPIN, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Vet. Microbiol.**, v.96, p.69–79, 2003.
- VELASCO, D.; TOMAS, M. DEL MAR.; CARTELLE, M.; BECEIRO, A.; PEREZ, A.; MOLINA, F.; MOURE, R.; VILLANUEVA, R. & BOU, G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.55, p.379-382, 2005.
- VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. **Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais**, Brasil. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 1.; CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7., 2003, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Associações de classe, 2003.
- VINCENT, J.L.; BIHARI, D.J.; SUTER, P.M.; BRUINING, H.A.; WHITE, J.; NICOLAS-CHANOINE, M.H. et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. **JAMA**. v. 274, p.639-644, 1995.
- VON EIFFI, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *staphylococci*. **Lancet Infect Dis**, n.2, p.677-685, 2002.
- VYLETĚLOVÁ, M.; HANUŠ, O.; KARPIŠKOVA, R.; ŠŤASTKOVA, Z.: Occurrence and antimicrobial sensitivity in *staphylococci* isolated from goat, sheep and cow's milk. **Acta univ. agric. et silvic.**, n. 3, p. 209–214, 2011.
- WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.B.; G ARINO JUNIOR, F.; COSTA, E.O. Avaliação in vitro e in vivo da eficiência dos antimicrobianos no tratamento de casos de mastite clínica bovina. **Revista Napgama**, v.4, n.1, p.9-14, 2001.
- WATTS, J.L.; OWENS, W.E. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. **Res Vet Sci.**, v.46, n.1, p.1-4, 1989.
- WELLER, T.M.A. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in *staphylococci* expressing resistance to methicillin. **J Antimicrob Chemother**, v.43, p.15-22, 1999.
- WERTHEIM, H.J.; MELLES, D.C.; VON, M.C.; van, L.W.; van, B.A.; VERBRUGH, H.A.; NOUWEN, J.L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect Dis**, n.5, p.751-762, 2005a.

WIESER, M.; BUSSE, H.J. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1087-1093, 2000.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, n.4, p.321-325, 2000.

ZAMIRI, M.J.; QOTBI, A.; IZADIFARD, J. Effects of daily oxytocin injection on milk yield and lactation length in sheep. **Small Ruminant Research**, v.40, n.2, p.179-185, 2001.

ZBINDEN, R.; HUGHES, J.; LAMONT, G.L.; LOSTY, P.D. Detection of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative *staphylococci*. **J Clin Microbiol**, v. 39, p.421-420, 2001.

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

ZHANG, H.Z.; HACKBARTH, C.J.; CHANSKY, K.M.; CHAMBERS, H.F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in *staphylococci*. **Science**, v.291, p.1962-1965, 2001.

ZLOMEK, H. A. Community-associated MRSA. **Adv Nurse Pract.** v.15, p.59-64, 2007.

## ANEXOS

### Provas Bioquímicas para Identificação de *Staphylococcus* spp.

#### ANEXO A

##### 1 Provas Bioquímicas para Identificação de *Staphylococcus* coagulase positivos

###### 1.1 Teste de Voges Proskauer (VP) - MAC FADDIN (1976).

Princípio: Determinar a habilidade do microrganismo em produzir um composto neutro, o acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir da fermentação da glicose.

###### a) Composição do Meio (Meio de Clark e Lubs)

Peptona tamponada	7,0g
Fosfato dipotássico	5,0g
Glicose	5,0g
Água destilada	1.000ml

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Os tubos foram mantidos à 4°C até o momento do uso.

- Composição do Reativo de Barrit (MAC FADDIN, 1976).

###### Solução de alfa-naftol 5%

Alfa-naftol (5,0 gramas) e álcool etílico absoluto (100mL). Dissolveu-se o alfa-naftol no álcool etílico e armazenou-se em um frasco âmbar na geladeira a 4°C.

###### Solução de hidróxido de Potássio 40% q.s.p

Foram dissolvidas 40 gramas de hidróxido de potássio em 100mL (q.s.p) de água destilada e a solução foi armazenada em frasco escuro sob refrigeração.

###### b) Técnica

A cultura da bactéria foi inoculada no meio utilizando a alça de platina e incubar a 37°C por 18 a 24 horas.

###### c) Resultado e interpretação

No momento da leitura adicionar os seguintes reativos de Barrit nesta ordem:

- 0,6ml de uma solução de alfa-naftol a 5%;

- 0,2ml de uma solução de KOH a 40%;
- Agitar o tubo suavemente para oxigenar o meio, a fim de oxidar a acetoína e obter uma reação de cor;
- Deixar descansar o tubo por mais ou menos 10 a 15 minutos na tes de iniciar a interpretação.

A positividade da prova era demonstrada pelo aparecimento de um anel róseo na parte superior do meio de cultura. A formação do anel ocorre pela reação da acetoína, formada a partir da glicose presente no meio, com o KOH, tendo como produto o diacetil que, por sua vez, reage com o  $\alpha$ -naftol (catalizador) e com arginina, resultando em um produto (grupo granidina-diacetila) de cor variando entre o rosa e o vermelho. A ausência deste halo, com a manutenção da cor original do meio, indicava resultado negativo (CHAPIN & MURRAY, 1999).

## 1.2 Teste da utilização aeróbia dos carboidratos (Maltose e Trealose)

### a) Princípio

Determinar a capacidade do microrganismo de hidrolisar a maltose e trealose incorporada a um meio base com produção de ácido.

### b) Composição do Meio

Estes testes foram realizados em Caldo Vermelho de Fenol (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), suplementado com 1% do respectivo carboidrato (o carboidrato foi adicionado no meio após ter sido filtrado em membrana de diâmetro 0,45 $\mu$  poro).

### c) Técnica

Foi inoculado o microrganismo a ser testado no meio suplementado com o carboidrato específico e incubado em estufa bacteriológica a 35-37° C por até 24 horas.

### d) Resultado e Interpretação

Leitura: Prova positiva: multiplicação do microrganismo com viragem do pH do meio de cultura (vermelho para amarelo). Prova negativa: multiplicação do microrganismo sem alteração de cor. (MAC FADDIN, 1976; MURRAY et al., 1999; APHA, 2001).

## 1.3 Redução de nitrato

### a) Princípio

Determinar a habilidade do microrganismo de reduzir o nitrato (NO<sub>3</sub>) a nitrito (NO<sub>2</sub>) ou gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) (denitrificação).

### b) Composição do Meio

Foi utilizado meio comercial caldo contendo nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>).

- Reagentes para Revelação da Reação

#### Solução A

Ácido sulfanílico 0,8g  
Ácido acético 5N 100m

### **Solução B**

N,N-dimetil-1-naftalina      0,6g  
Ácido acético 5N              100ml

c) Técnica

Inocular a cultura com auxílio da alça de platina e incubar 35-37 °C por 18-24h.

d) Resultado e Interpretação

Adicionar 5 gotas dos reagentes A e B no meio, sem homogeneizar. Se houver desenvolvimento de cor vermelho tijolo significa que a bactéria reduziu nitrato a nitrito.

Se após a adição dos reagentes A e B o tubo continuar incolor e houver turvação do meio considera-se o resultado negativo.

### **1.4 Prova da DNase:**

a) Princípio

Alguns microrganismos são capazes de utilizar o DNA presente no meio como fonte de energia, através da produção da enzima DNase.

b) Composição do Meio

Meio comercial Agar DNase

c) Técnica

No meio com DNA deve ser feita uma estria simples (reta) ou um spot (ponto de semadura) central com o micro-organismo em estudo. Incubar a 37°C por 24 horas e adicionar ao meio HCl 1N e aguardar a turvação do meio.

d) Resultado e Interpretação

Lembrando que o DNA é material protéico e que o HCl, como ácido, tem poder desnaturante sobre as proteínas, a turvação do meio é apenas a precipitação do DNA desnaturado. Se a bactéria produzir DNase, todo o DNA ao seu redor terá sido degradado, então ao adicionar o HCL não haverá turvação nesta área. Portanto, se houver um halo claro ao redor do crescimento bacteriano, o resultado é positivo.

## ANEXO B

### 1 Provas Bioquímicas para Identificação de *Staphylococcus* coagulase negativos

#### 1.1 Prova de fermentação de açúcares (xilose, sacarose, trealose, maltose, lactose, frutose e manose)

(KONEMAN et al., 2008).

a) Princípio

Determinar a capacidade do microrganismo de hidrolisar os açúcares incorporados a um meio base com produção de ácido.

b) Composição do Meio

Estes testes foram realizados em Caldo Vermelho de Fenol (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), suplementado com 1% do respectivo carboidrato (o carboidrato foi adicionado no meio após ter sido filtrado em membrana de diâmetro 0,45 $\mu$  poro).

c) Técnica

Foi inoculado o microrganismo a ser testado no meio suplementado com o carboidrato específico e incubado em estufa bacteriológica a 35-37° C por até 24 horas.

d) Resultado e Interpretação

Leitura: Prova positiva: multiplicação do microrganismo com viragem do pH do meio de cultura (vermelho para amarelo). Prova negativa: multiplicação do microrganismo sem alteração de cor. (MAC FADDIN, 1976; MURRAY et al., 1999; APHA, 2001).

#### 1.2 Teste de produção de Urease

(KONEMAN et al, 2008).

a) Princípio

Determinar a habilidade do microrganismo em degradar, enzimaticamente, a ureia pela urease, com formação de duas moléculas de amônia.

b) Composição do meio

(Uréia Agar base- Christensen)

Peptona	1,0g
Glicose	1,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dipotássio	2,0g
Vermelho-de-fenol	0,012g
Agar	12,0g
Água destilada	1.000ml

A uréia é acrescentada após esterilização por filtração

c) Técnica

Inocula-se a cultura fazendo estrias na superfície do agar, utilizando a alça de platina.

d) Resultado e Interpretação

O teste positivo (rosa-escuro) significa que a bactéria possui a enzima urease, que hidrolisa a uréia em amônia, alcalinizando o meio e virando o indicador de vermelho de fenol de amarelo (pH 6,8) para rosa-escuro (pH 8,0).

No teste negativo, o meio permanece amarelo, mas com crescimento, porque a bactéria se utiliza da peptona presente no meio.