

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

**DISSERTAÇÃO**

**CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA E A BACTERIOCINAS EM  
*STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE CASOS DE  
MASTITE BOVINA OCORRIDOS NO ESTADO DO RIO DE  
JANEIRO**

**Bruno Rocha Pribul**

**2011**



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

**CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA E A BACTERIOCINAS EM *STAPHYLOCOCCUS*  
SPP. ISOLADOS DE CASOS DE MASTITE BOVINA OCORRIDOS NO  
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**BRUNO ROCHA PRIBUL**

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

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2011

636.208987

1 Pribul, Bruno Rocha, 1985-  
P945c Correlação entre o perfil de  
T resistência antimicrobiana e a  
bacteriocinas em Staphylococcus SPP  
isolados de casos de mastite bovina  
ocorridos no estado do Rio de  
Janeiro / Bruno Rocha Pribul - 2011.  
80 f.

Orientador: Miliane Moreira  
Soares de Souza.

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

Bibliografia: f. 45-63

1. Mastite - Teses. 2. Drogas -  
Resistência em microorganismos -  
Teses. 3. Infecções estafilocócicas  
- Teses. 4. Mastite - Rio de  
Janeiro (Estado) - Teses. I. Souza,  
Miliane Moreira Soares de, 1970-.  
II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.  
III. Título.

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

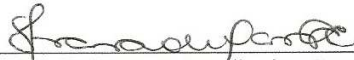
BRUNO ROCHA PRIBUL

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2011.



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



Shana de Mattos de Oliveira Coelho Dsc. UFRRJ



Dália dos Prazeres Rodrigues Dsc. FIOCRUZ

**Ofereço este trabalho ao meu  
pai, pelos valores transmitidos,  
por me ensinar a ultrapassar  
barreiras, pelo amor e apoio  
incondicional e exemplo  
de superação.**

## AGRADECIMENTOS

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

A Deus por guiar meus passos e por tornar isto tudo realidade.

A minha orientadora Professora Dra MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA por ter possibilitado imenso crescimento profissional e pessoal através deste trabalho e do convívio desde minha graduação. Em especial a sua confiança e por me deixar fazer parte desta família que é o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As Professoras Dra SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO e Dra IRENE DA SILVA COELHO por terem me auxiliado a superar os obstáculos que apareceram no caminho com toda paciência e dividirem seus conhecimentos comigo.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por toda amizade e apoio nos momentos em que mais precisei. Em especial a Dra. INGRID ANNES PEREIRA, Dra. LIDIANE SOARES DE CASTRO, MARCELO SANTOS DE OLIVA e TATIANI ABREU DE ALENCAR por serem o que são em minha vida.

Ao Curso de PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ e aos seus funcionários, meu sincero agradecimento pelo apoio em materiais e pelas excelentes condições que recebemos para trabalhar.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por serem disponíveis para auxílio nos experimentos e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos funcionários da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que desde o início ajudaram para que este trabalho se tornasse realidade.

Aos Professores FRANCISCO DE ASSIS BARONI, SÉRGIO GASPAR DE CAMPOS e DOUGLAS MCINTOSH que serviram de inspiração e fonte inesgotável de conhecimento.

A minha família por acreditar em tudo o que quis realizar até agora e apoiar incondicionalmente minhas opções. Em especial ao meu pai CLAUDIO GOMES PRIBUL que a cada dia passa a me dar mais motivos para crer que tudo é possível, basta querer.

A minha esposa CAROLINE MOURA RAMIREZ PRIBUL pelo amor, compreensão, apoio, paciência e parceria que auxiliaram esta conquista.

A minha amada Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que me acolhe já fazem 7 anos e fez minha vida mudar completamente.

A todos que auxiliaram a execução deste trabalho e que tiveram presentes neste momento: obrigado.

Agradeço ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (Cnpq), pela bolsa agraciada durante o mestrado. E a FUNDAÇÃO CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) pelo apoio em equipamentos ao laboratório de bacteriologia da UFRRJ.

## RESUMO

PRIBUL, Bruno Rocha. **Avaliação da Resistência a Vancomicina e do Perfil de Suscetibilidade a Bacteriocinas de *Staphylococcus* spp Isolados de Mastite Bovina da Região Sul do Estado do Rio de Janeiro.** 41p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre as mais implicadas na etiologia das mastites. Uma dificuldade adicional no controle das infecções bacterianas por este gênero é representada por sua freqüente resistência aos antimicrobianos. Os glicopeptídeos, como a vancomicina, aparecem como uma alternativa terapêutica devido ao crescente aumento de cepas estafilocócicas resistentes aos betalactâmicos, que são os fármacos de eleição nestas infecções. Desse modo, a resistência aos glicopeptídeos representa uma ameaça ao futuro da terapia antimicrobiana em humanos e animais. O presente trabalho buscou avaliar o perfil de resistência à vancomicina em isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite de vacas com mastite. Todos os 150 isolados estudados (50 *Staphylococcus aureus*, 50 *Staphylococcus intermedius* e 50 *Staphylococcus* spp. coagulase negativos), foram avaliados através dos testes de difusão em disco simples, microdiluição em ágar e detecção dos genes *vanA* e *B*. O teste de suscetibilidade antimicrobiana revelou elevada resistência aos beta-lactâmicos para todos os grupos avaliados. No ensaio de difusão em disco, os isolados coagulase-positivos apresentaram um perfil de resistência de 24% a teicoplanina (24/100) e 23% a vancomicina (23/100). No teste de microdiluição em ágar para detecção da CIM, 16% dos isolados apresentaram resistência à vancomicina (16/100). Entre os isolados resistentes no teste de microdiluição em ágar, 56,25% dos isolados (9/16) apresentaram valores de CIM que variaram entre 4-8µg/ml. Os *Staphylococcus* coagulase-negativos não apresentaram resistência aos glicopeptídeos. Os genes de resistência à vancomicina foram detectados em 37,5% dos isolados vancomicina-resistentes (6/16). Para se buscar uma correlação entre a presença de resistência aos glicopeptídeos e a capacidade de formação de biofilme foram realizados os testes de caracterização de crescimento em ágar vermelho congo e detecção de biofilme pelo teste de aderência em microplacas, onde foram detectados 66,66% e 90,00% respectivamente, de isolados produtores de biofilme. A produção de “slime” não apresentou correlação estatística com a resistência aos glicopeptídeos. O perfil de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi avaliado frente as bacteriocinas produzidas pelos *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum*. As bacteriocinas que apresentaram maior capacidade de inibição frente aos *Saphylococcus* spp. testados foram as produzidas pelos *Lactobacillus paracasei*

**Palavras-chave:** *Staphylococcus* spp. Mastite. Resistência a vancomicina. Bacteriocinas.



## ABSTRACT

PRIBUL, Bruno Rocha. **Evaluation of Vancomycin Resistance and Susceptibility Profile Bacteriocins of staphylococci isolated from bovine mastitis in Southern State of Rio de Janeiro.** 41p Thesis (Master of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Bacteria of the genus *Staphylococcus* are among the most implicated in the etiology of mastitis. An additional difficulty in controlling bacterial infections by this genus is represented by its frequent resistance to antibiotics. The glycopeptides (eg vancomycin) appear as an alternative therapy because of the increasing strains of staphylococci resistant to beta-lactams, which are the drugs of choice in these infections. Thus, glycopeptide resistance represents a threat to the future of antimicrobial therapy in humans and animals. This study aimed to evaluate the profile of vancomycin resistance pheno-genotypically in *Staphylococcus* spp. milk samples from cows with mastitis. All 150 isolates (50 isolates of *Staphylococcus aureus*, 50 isolates of *Staphylococcus intermedius* and 50 isolates of Coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CNS) were evaluated using the tests of disk diffusion, agar microdilution and detection of *vanA* e *vanB* genes. The antimicrobial susceptibility test showed high resistance to beta-lactam antibiotics for all groups. In the disk diffusion test, 24% of coagulase-positive isolates showed resistance to teicoplanin (24/100) and 23% to vancomycin (23/100). In the agar microdilution test for detection of CIM, 16% of the isolates were resistant to vancomycin (16/100). Among the resistant isolates in the agar microdilution testing, 56.25% of the isolates (9 / 16) had MIC values ranging from 4-8µg/ml. *Staphylococcus* coagulase-negative showed no resistance to the evaluated glycopeptides. Genes for resistance to vancomycin were detected in 37.5% of vancomycin-resistant isolates (6 / 16). To seek a correlation between the presence of glycopeptide resistance and the ability of producing biofilm, tests were performed to characterize growth in Congo red agar and also detection of the biofilm adherence test in microplates. It were detected 66.66% and 90, 00%, respectively, of isolates producing biofilm. The production of "slime" presented no statistical correlation with resistance to glycopeptides. The sensitivity profile of *Staphylococcus* spp. was assessed against the bacteriocins produced by *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus fermentum*. *Lactobacillus paracasei* bacteriocins presented the highest inhibition capacity.

**Key words:** *Staphylococcus* spp. Mastitis. Vancomycin resistance. Bacteriocins.

## LISTA DE ABREVIACOES

AVO = avoparcina

BHI = infusão de cérebro e corao

CCS = contagem de células somáticas

CIM = concentrao inibitória mínima

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute

CMT = "California Mastitis Test"

CRA = gar Vermelho Congo

DNA = cido desoxiribonuclico

GEN = Gentamicina

GISA = *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária ao glicopeptídeo

hVISA = *S. aureus* com resistência intermediária heterognea a vancomicina

mL = mililitros

mm = milímetros

mM = milimolar

Kb = quilobase

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente  meticilina

NCCLS = National Committee for Clinical Laboratory Standards

OXA = Oxacilina

pb = pares de base

PBP = Proteína de ligao a penicilina

PBP2a = proteína de ligao  penicilina de baixa afinidade

PCR = Reao em Cadeia de Polimerase

PEN = Penicilina

pH = potencial hidrogeniônico

PIA = polissacarídeo de adesão intercelular

PNAG = N-acetilglicosamina polimérica

rpm = rotação por minuto

TE = Tris-HCl e EDTA

TEC = Teicoplanina

TEM = microscopia eletrônica de transmissão

TSB = Trypticase-Soja

UI = unidade internacional

VAN = Vancomicina

VISA = *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina

VRE = enterococos vancomicina-resistentes

VRSA = *S. aureus* resistente a vancomicina

VSSA = *S. aureus* sensível a vancomicina

μg = micrograma

μL = microlitro

°C = graus Celsius

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura molecular, fórmula química e peso molecular da vancomicina.	6
<b>Figura 2</b>	Biossíntese da parede celular bacteriana e sua inibição por fármacos.	8
<b>Figura 3</b>	Esquema de mecanismo de resistência a Vancomicina – Substituição do D-alanil-D-alanina por D-alanil-D-lactato.	9
<b>Figura 4</b>	Esquema do mecanismo de resistência a glicopeptídeos codificado pelo Tn 1546.	11
<b>Figura 5</b>	Mecanismo de Resistência – prevenção da entrada de moléculas de vancomicina.	13
<b>Figura 6</b>	Método de difusão em disco simples.	24
<b>Figura 7</b>	Gráfico apresentando o percentual de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp. (n=150) isolados de amostras de mastite bovina.	24
<b>Figura 8</b>	Teste de microdiluição em ágar BHI, com as concentrações utilizadas em µg/ml.	28
<b>Figura 9</b>	Colônia crescida em ágar BHI com 6 µg/mL de vancomicina demonstrando resistência à este antimicrobiano.	31
<b>Figura 10</b>	Genes <i>vanA</i> (732 pb) e <i>vanB</i> (635 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. em gel de agarose (1,5%).	32
<b>Figura 11</b>	Gráfico apresentando o percentual de detecção dos genes de resistência à vancomicina em relação as diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positivos estudados.	32
<b>Figura 12</b>	Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina crescidas em ágar Vermelho Congo.	35
<b>Figura 13</b>	Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina.	36
<b>Figura 14</b>	Gráfico apresentando o percentual dos diferentes graus de produção de “slime” dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. estudados.	36

<b>Figura 15</b>	Gráfico apresentando o percentual dos diferentes graus de produção de “slime” dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.resistentes à vancomicina.	37
<b>Figura 16</b>	Teste de suscetibilidade às bacteriocinas. A estria central representa o crescimento do <i>Lactobacillus</i> spp. produtor da bacteriocina e as estrias perpendiculares os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. avaliados.	38
<b>Figura 17</b>	Gráfico apresentando o percentual de sensibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. oriundos de amostras de mastite bovina frente as bacteriocinas dos <i>Lactobacillus</i> spp. avaliados.	39
<b>Figura 18</b>	Gráfico do percentual de sensibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. frente as bacteriocinas produzidas pelos <i>Lactobacillus</i> spp. estudados.	40
<b>Figura 19</b>	Gráfico apresentando o percentual de sensibilidade dos isolados vancomicina-resistentes frente as bacteriocinas produzidas pelos <i>Lactobacillus</i> spp. estudados.	42

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados frente à isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	20
<b>Quadro 2</b>	Iniciadores empregados no ensaio de amplificação dos genes de resistência à vancomicina.	22

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Perfis de resistência aos antimicrobianos testados dos <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positivos avaliados.	26
<b>Tabela 2</b>	Percentual de resistência em relação ao intervalo de CIM das diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positivos oriundos de amostras de mastite bovina.	29
<b>Tabela 3</b>	Avaliação da validade do teste de difusão em disco simples em relação à microdiluição em ágar.	34
<b>Tabela 4</b>	Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do teste de difusão em disco simples à vancomicina em <i>Staphylococcus</i> spp.	34
<b>Tabela 5</b>	Perfis de sensibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. às bacteriocinas produzidas por <i>Lactobacillus</i> spp. (Bacteriocinotipos).	41
<b>Tabela 6</b>	Perfis de sensibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. intermedius</i> vancomicina-resistentes frente as bacteriocinas produzidas pelos <i>Lactobacillus</i> spp. estudados.	42

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 Mastite	3
2.2. Gênero <i>Staphylococcus</i>	4
2.3. Resistência antimicrobiana em <i>Staphylococcus</i> spp.	4
2.4. Resistência aos glicopeptídeos em isolados oriundos de animais de produção	5
2.5 Vancomicina	6
2.5.1. Composição química da vancomicina	6
2.5.2 A síntese da parede celular em bactérias e o mecanismo de ação da vancomicina	7
2.5.3. Resistência à vancomicina	9
2.5.4 Mecanismo de resistência à vancomicina	9
2.5.5. Padronização dos métodos de avaliação da resistência a vancomicina	14
2.6. Produção de biofilmes por <i>Staphylococcus</i> spp.	14
2.7. Probióticos	15
2.7.1. Bacteriocinas	16
2.7.1.1. Bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas	16
<b>3. OBJETIVOS</b>	18
3.1. Geral	18
3.2. Específicos	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	19
4.1. Isolados bacterianos	19
4.2. Reativação dos Isolados bacterianos	19
4.3. Detecção Fenotípica da Resistência aos Antimicrobianos	19
4.3.1. Preparo do inóculo	19
4.3.2. Difusão em disco	19
4.3.3. Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)	20



4.3.4. Ágar “screen”	20
4.4. Produção de “slime”	20
4.4.1. Teste do Ágar Vermelho Congo	21
4.4.2. Produção de “slime” em microplacas	21
4.5. Detecção de genes de resistência	21
4.5.1. Extração do DNA bacteriano	21
4.5.2. Amplificação dos genes de resistência através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	22
4.6. Testes de suscetibilidade às bacteriocinas	22
4.7. Análise estatística	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	24
5.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos <i>Staphylococcus</i> spp.	24
5.2. Testes fenotípicos de suscetibilidade à vancomicina e gene <i>vanA</i>	28
5.2.1. Determinação da CIM	28
5.2.2. Detecção dos genes de resistência à vancomicina	31
5.2.3. Correlação dos resultados dos testes de difusão em disco simples e a microdiluição em Agar	34
5.3. Produção de “slime”	35
5.4. Perfil de suscetibilidade dos <i>Staphylococcus</i> spp. às bacteriocinas produzidas por <i>Lactobacillus</i> spp.	38
<b>6. CONCLUSÕES</b>	44
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	47
<b>ANEXO</b>	64

## 1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina representa um grande problema para a produção leiteira, acarretando significativas perdas econômicas devido às alterações na quantidade/qualidade do leite. Adicionalmente, o impacto desta doença se estende a custos financeiros de um programa de controle baseado em estratégias terapêuticas, serviços laboratorial e veterinário.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre as mais implicadas na etiologia das mastites. Nas décadas mais recentes, uma dificuldade adicional no controle das infecções bacterianas é representada por sua freqüente resistência aos antimicrobianos (AARESTRUP et al., 2001).

Os fármacos de eleição utilizados nas infecções mastíticas por estafilococos estão compreendidos em três principais grupos:  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos. Até alguns anos atrás, os  $\beta$ -lactâmicos apresentavam eficácia terapêutica no tratamento das infecções estafilocócicas, atualmente, no entanto, inúmeros trabalhos vêm relatando a disseminação de cepas resistentes, nas quais a produção de  $\beta$ -lactamases e modificação das PBPs são os mais importantes mecanismos descritos (AARESTRUP et al., 2001).

Em estudo realizado anteriormente por Coelho e colaboradores (2007) para se avaliar a presença de estafilococos resistentes à oxacilina em amostras de mastite bovina, foi detectado um percentual considerável de resistência à vancomicina, impulsionando a realização do presente trabalho, visto que os glicopeptídeos aparecem como uma alternativa terapêutica à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. A emergência mundial de clones bacterianos de origem animal resistentes a glicopeptídeos, em especial os enterococos vancomicina-resistentes (VRE), representa uma ameaça significativa ao futuro da terapia antimicrobiana em humanos e animais.

Considera-se que o crescimento da resistência aos antimicrobianos se dá pelo uso inapropriado destes e, também, por práticas equivocadas utilizadas na pecuária bovina, ampliando a gama de bactérias resistentes (JOHN et al., 2002). No caso específico dos VREs, a explicação apontada para a seleção dos clones resistentes foi a utilização de antibióticos como promotores de crescimento em rações animais. A utilização do glicopeptídeo avoparcina em rações destinadas aos suínos e aves foi apontada como fator de pressão de seleção para a disseminação dos genes de resistência à vancomicina. Adicionalmente, estudos conduzidos recentemente apontam para um possível intercâmbio de genes entre VREs e *Staphylococcus* spp, contribuindo para a disseminação da resistência à vancomicina neste gênero bacteriano. O isolamento de cepas de *Staphylococcus* spp apresentando simultaneamente os genes *mecA* e *vanA* preocupou os sistemas de vigilância em vários países (CHANG et al., 2003 ; SAHA et al., 2008).

A diminuição da eficácia dos antimicrobianos tem estimulado a busca por alternativas ao controle dos patógenos. A microbiota saprófita é composta de espécies que exercem influência significativa sobre o equilíbrio de um determinado nicho ecológico, através da prevenção do crescimento e da invasão por bactérias patogênicas. O papel protetor desta microbiota se dá por meio de exclusão competitiva, competição por nutrientes e liberação de bacteriocinas. As bacteriocinas são compostos de natureza protéica com atividade antimicrobiana (PASCUAL et al., 2008). As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas são peptídeos catiônicos com menos de 60 resíduos de aminoácidos, que atuam como permeabilizadores da membrana plasmática e cuja ação tóxica pode inibir o crescimento de cepas proximamente relacionadas, como também de espécies não-relacionadas. As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas são classificadas baseado na estrutura primária, massa molecular, estabilidade térmica e organização molecular. O gênero *Lactobacillus* por causa de sua diversidade de espécies e habitat é considerado o principal produtor de bacteriocinas deste grupo (PASCUAL et al., 2008). A inibição do

crescimento de patógenos por bacteriocinas aponta para uma alternativa de controle biológico em determinados processos infecciosos (PASCUAL et al., 2008).

Desse modo, o objetivo desse estudo é avaliar de modo mais aprofundado a resistência à vancomicina, detectada anteriormente pela técnica de difusão em disco, em isolados de *Staphylococcus* spp. a partir de quadros de mastite bovina, como também o perfil de suscetibilidade desse isolados frente a bacteriocinas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mastite

O sistema agroindustrial do leite tem grande importância social por se tratar de uma atividade praticada em todo o território nacional, em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gerou na última década, acima de três milhões de empregos e agregou mais de seis bilhões à agropecuária nacional (CARVALHO, 2009). Uma das principais causas de prejuízos econômicos para o produtor é a inflamação da glândula mamária, ou mastite, que pode ser causada por diversos microorganismos (FOURICHON et al., 2001; JONG et al., 2001). Os prejuízos ocorrem devido à redução na produção de leite, aos custos com medicamentos e veterinários, à morte ou descarte precoce de animais e às multas pagas pelos produtores em alguns países. (LANGONI, 1999; YALCIN et al., 1999; PRESTES et al., 2003). A mastite é ainda considerada um problema de Saúde Pública, pois resulta na contaminação do leite e derivados antes e durante o processamento (MARTINS et al., 2010).

A mastite, inflamação da glândula mamária pode ser classificada em duas formas: clínica e subclínica. A mastite subclínica apresenta prevalência muito maior que a forma clínica e caracteriza-se por alterações na composição do leite, tais como aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores e caseína, lactose e gordura (FONSECA; SANTOS, 2000). Prestes e colaboradores (2003) relatam que a forma subclínica é mais prejudicial que a forma clínica, pela falta de sintomas ou sinais determinando perdas econômicas maiores devido a frequência de persistência do processo.

A mastite pode ainda ser classificada quanto à forma de transmissão, em primária (contagiosa) e secundária (ambiental) (SOMMERHÄUSER et al., 2003).

O “California Mastitis Test” (CMT), idealizado por Schalm e Noorlander (1957), é capaz de detectar o processo inflamatório na glândula mamária e é aceito internacionalmente para o diagnóstico da mastite subclínica no campo (COSTA, 1998). Campos (2000) acrescenta que esse é um bom teste preditivo positivo.

Os agentes etiológicos da mastite contagiosa necessitam do animal para a sobrevivência, pois se multiplicam na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele. A mastite é transmitida de uma vaca infectada para outra sadia, principalmente, durante a ordenha (PRESTES et al., 2003). As mastites contagiosas se caracterizam por apresentar alta incidência de casos subclínicos, tendência a cronicidade e alta contagem de células somáticas (CCS) (FIGUEIREDO, 1995).

A mastite ambiental é causada por agentes que vivem preferencialmente no habitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e matéria orgânica (FIGUEIREDO, 1995; FREITAS et al., 2005). Este tipo de mastite caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, frequentemente, com manifestação aguda e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato. A infecção ocorre preferencialmente no período entre as ordenhas (ERSKINE; EBERHART, 1990).

Os *Staphylococcus* spp. são considerados patógenos contagiosos, disseminando-se rapidamente na granja leiteira, sendo um dos mais frequentes agentes etiológicos da mastite bovina (SOMMERHÄUSER et al., 2003). Apesar de décadas de pesquisas com o intuito de controlar este patógeno, ele permanece como problema econômico para produtores de leite em geral, determinando perdas econômicas significativas em todo o mundo (AARESTRUP et al., 1995; BUZZOLA et al., 2001; NAGASE et al., 2002; ZADOKS et al., 2002). O principal reservatório de *S. aureus* parece ser a glândula mamária infectada e a transmissão entre as vacas ocorre durante a ordenha (AKINEDEN et al., 2001).

Segundo Prestes e colaboradores (2003) a mastite é considerada de impossível erradicação, porém, passível de controle.

## 2.2. Gênero *Staphylococcus*

A denominação *Staphylococcus* foi primeiramente utilizada para designar células bacterianas de forma circular (cocóide) em arranjos irregulares semelhantes a cachos de uva observadas em um abscesso por Dr. Ogston em 1881. No entanto, foi somente quatro anos mais tarde que o gênero *Staphylococcus* foi adequadamente descrito por Rosenbach (GARRITY; HOLT, 2001).

Até 1999 este gênero pertencia à Família Micrococcaceae, a qual incluía também os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Aerococcus* (GARRITY; HOLT, 2001). Foi somente na última década, com o avanço da biologia molecular, estudos genéticos, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S que o gênero *Staphylococcus* foi incluído numa nova família: Staphylococcaceae (GARRITY; HOLT, 2001). Atualmente já são 40 espécies descritas no gênero (BANNERMAN, 2003; EUZÉBY, 2007), a maioria coagulase-negativo, caracterizando-se a exclusividade da síntese desta enzima aos *S. aureus*, *S. schleiferi* subsps. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN, 2003).

Todas as espécies do gênero *Staphylococcus* são produtoras da enzima catalase e se reproduzem por fissão binária em todos os planos espaciais. A divisão celular em vários planos espaciais resulta em um agrupamento das células bacterianas em conformações que lembram cachos de uvas, o que é característico e evidente especialmente quando as células são cultivadas *in vitro* e observadas por microscopia óptica (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

As espécies do gênero *Staphylococcus* conseguem crescer em meios hipertônicos (em concentrações de até 15% de NaCl), numa ampla gama de pHs (de 4,2 a 9,3) e em temperaturas entre 7°C e 48,5°C (KONEMAM et al., 2008), e se encontram amplamente distribuídas no ambiente e como microbiota anfibiótica de seres humanos e de animais, além de serem também responsáveis por uma variedade de infecções (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Os *Staphylococcus* spp. são um importante agente etiológico de infecções em animais domésticos de companhia e de animais destinados à produção de alimentos (SEGUIN et al., 1999; AARESTRUP et al., 2000; ZADOKS et al., 2000). É o agente bacteriano mais comumente isolado de casos de mastite bovina, sendo apontado pelo International Dairy Federation como sendo o principal patógeno neste processo (BRITO; BRITO, 1998; LANGONI, 1999).

## 2.3. Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp.

A resistência à penicilina em *Staphylococcus* spp. foi observada em apenas um ano após a sua introdução e, no início de 1950, três quartos das cepas de *S. aureus* em grandes hospitais de muitos países se tornaram resistentes à penicilina. Atualmente, 90 à 95% de estirpes clínicas de *S. aureus* em todo o mundo são resistentes à penicilina. Em 1959, a primeira meticilina-penicilina antiestafilocócica foi introduzida. Dentro de dois anos, a primeira cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) emergiu (PARKER; JEVONS, 1964; NOSKIN et al., 2005).

Este padrão tem sido continuado entre os agentes mais novos. Linezolida foi introduzida clinicamente no ano de 2000, sendo que o primeiro isolado MRSA resistente à linezolida foi descrito na literatura, um ano após sua introdução (TSIODRAS et al., 2001).

O perfil de multirresistência apresentado por amostras MRSA hospitalares tornou a vancomicina o fármaco de escolha para o tratamento de infecções por este microorganismo, resultando no uso acentuado desse antimicrobiano tendo em vista o grande aumento nas taxas de resistência à oxacilina (CASEY et al., 2007). A conjunção desses fatores resultou no cenário perfeito para o surgimento, primeiro, de amostras com resistência intermediária à vancomicina (VISA) (HIRAMATSU et al., 1997) e, logo depois, amostras resistentes (VRSA) (CDC, 2002). Porém a vancomicina, ao contrário da maioria dos antimicrobianos

antiestafilocócicos, apresentou uma grande eficácia no combate de cepas MRSA, visto que o primeiro isolado de *S. aureus* resistente a este agente levou quase 40 anos para ser reconhecido, sendo classificado como o primeiro *S. aureus* com resistência intermediária ao glicopeptídeo (GISA).

O aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos acarreta diversos problemas clínicos e terapêuticos, sendo o principal deles o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade. A crescente prevalência de bactérias multirresistentes resulta na utilização de agentes antibacterianos de uso reservado como agentes de primeira linha, que muitas vezes apresentam toxicidade elevada (LIVERMORE, 2000).

Embora vários estudos reportem a existência de cepas de *S. aureus*, isoladas de mastite bovina, com resistência a vários agentes antimicrobianos, ainda é possível detectar isolados suscetíveis a diferentes classes destes agentes, mostrando que o monitoramento deve ser realizado constantemente com o intuito de avaliar a circulação de genes de resistência possibilitando a adoção de medidas de controle que dificultem a disseminação desses genes (AARESTRUP et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000; STEPHAN et al., 2001; TOLLERSRUD et al., 2000; GENTILINI et al., 2000; RABELLO et al., 2005).

#### **2.4. Resistência aos glicopeptídeos em isolados oriundos de animais de produção**

Considera-se que o crescimento da resistência aos antimicrobianos se dá pelo uso inapropriado destes e, também, por práticas equivocadas utilizadas na pecuária bovina, ampliando a gama de bactérias resistentes (JOHN et al., 2002). No caso específico da resistência à vancomicina, a explicação apontada para a seleção dos clones resistentes foi à utilização de antibióticos como promotores de crescimento em rações animais. A utilização do glicopeptídeo avoparcina em rações destinadas a suínos e aves foi apontado como fator de pressão de seleção para a disseminação dos genes de resistência a vancomicina (CHANG et al., 2003; SAHA et al., 2008), principalmente pela disseminação de clones de enterococos vancomicina-resistentes (VRE). Os enterococos são ubíquos e ocorrem na água do solo e da superfície, em plantas e legumes e permanecem como parte da microbiota normal de alimentos provenientes de várias fontes (FRANZ et al., 1999). Os enterococos também representam uma parte natural da microbiota intestinal, tanto em seres humanos e espécies animais diferentes, e são utilizados como indicadores de contaminação fecal de água e alimentos. Durante os últimos 15 anos, os enterococos têm emergido como uma importante causa de infecções hospitalares, bem como a capacidade de enterococos de adquirir genes de resistência tornando-o assim um desafio terapêutico. Enterococos resistente à vancomicina (VRE) são de interesse particular, desde que o glicopeptídeo vancomicina está sendo usado como o último recurso para o tratamento de infecções causadas por enterococo e estafilococos multiresistentes.

O uso ao longo prazo da avoparcina (AVO) como aditivo em alimentos (promotor de crescimento) para engorda de suínos, aves e bovinos em muitos países, excluindo os Estados Unidos e o Canadá (DONNELLY et al., 1996), resultou na seleção de VRE na microbiota intestinal dos animais de produção. Uma associação entre o uso de avoparcina e a ocorrência de VRE em ambientes de criação de animais foi confirmada em 1995 na Dinamarca, Alemanha e Noruega (AARESTRUP, 1995; KLARE et al., 1995; KLARE et al., 1995; KRUSE et al., 1999). Como consequência, a avoparcina foi proibida na Noruega e na Dinamarca em 1995 e na Alemanha em 1996. Em 1997, avoparcina foi proibida na UE, sendo retirada do mercado pela sua fabricante, a Roche Vitaminas (RAGG, 1999). Alimentos de origem animal são considerados a via mais provável de transmissão de VRE do reservatório de animais para humanos, e vários estudos têm documentado a presença de VRE em alimentos (CHADWICK et al., 1996; KIRK et al., 1997; WEGENER et al., 1997; KLEIN et al., 1998; QUEDNAU et al., 1998; VAN DEN BRAAK et al., 1998). Entretanto, no Brasil,

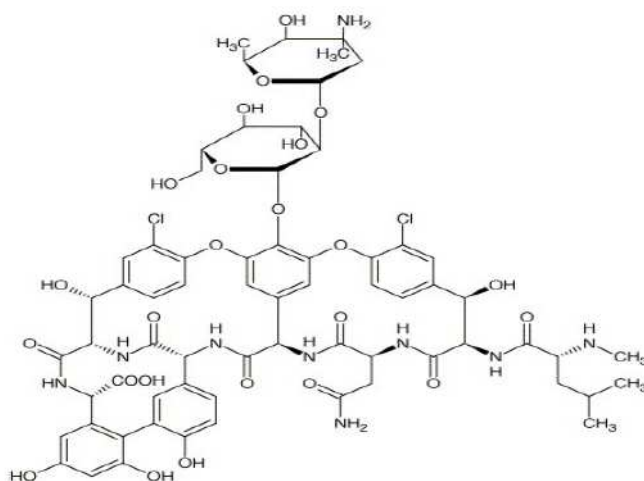
este monitoramento ainda não é realizado de modo articulado, seja pela dimensão continental do país como pelas discrepâncias entre as características geopolíticas das diferentes regiões. Estudos conduzidos recentemente apontam para um possível intercâmbio de genes entre VREs e *Staphylococcus* spp, contribuindo para a disseminação da resistência a vancomicina neste gênero bacteriano (SAHA et al., 2008).

Tendo em vista que a vancomicina é o antimicrobiano de eleição frente a isolados resistentes aos betalactâmicos, torna-se de fundamental importância o estudo da circulação de isolados resistentes aos glicopeptídeos no ambiente de produção animal, visto que no Brasil estes isolados são reportados apenas no ambiente hospitalar. Desta forma pode haver a marginalização de uma possível fonte de veiculação de genes de resistência à vancomicina através de produtos de origem animal. Embora o uso da avoparcina como promotor de crescimento esteja proibido, no Brasil desde 1998, não se pode negligenciar os possíveis impactos do uso deste glicopeptídeo na disseminação de resistência (LEME et al., 2000).

## 2.5 Vancomicina

### 2.5.1 Composição química da vancomicina

A vancomicina é um antibiótico da classe dos glicopeptídeos tricíclicos, produzido pelo *Streptococcus orientalis* (Figura 1) (MARTINDALE, 1999).



**Figura 1.** Estrutura molecular, fórmula química e peso molecular da vancomicina (MARTINDALE, 1999).

É utilizada para o tratamento de pacientes alérgicos a  $\beta$ -lactâmicos acometidos por infecções estafilocócicas sistêmicas e para infecções por enterococos e pneumococos resistentes à penicilina, estafilococos resistentes à oxacilina (TAVARES, 2002), ainda sendo destacável seu papel como antibiótico de escolha para tratamento de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) (MANDELL; PETRI, 1996).

### 2.5.2 A síntese da parede celular em bactérias e o mecanismo de ação da vancomicina

Para entender o mecanismo de ação desta classe de antibióticos é fundamental entender como a parede celular é formada e mantida nas células bacterianas.

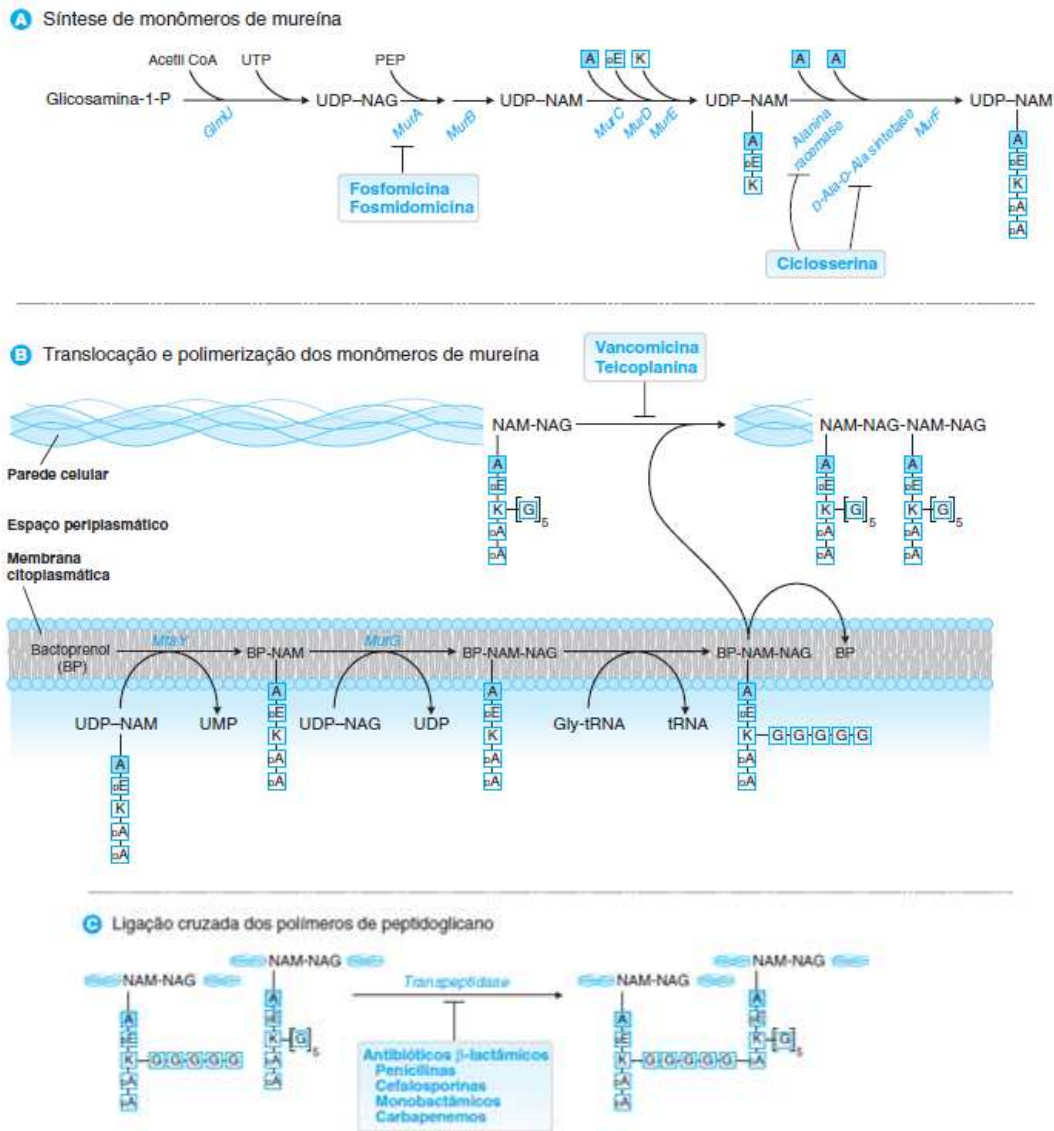
A parede celular é uma estrutura que apresenta função primordial em bactérias. A pressão osmótica interna na maioria das bactérias é entre 5 e 20 atmosferas e a resistência da parede celular é que torna viável a célula bacteriana ser estável (HIRAMATSU, 1998).

A biossíntese da parede celular ocorre em três fases principais. A primeira delas consiste na síntese intracelular (citoplasma) de monômeros de mureína a partir de aminoácidos e de unidades de açúcares; a segunda fase consiste na polimerização dos monômeros de mureína em polímeros de peptidoglicano lineares sendo mediada por lipídeos e ocorrendo na membrana celular; e a terceira consiste na ligação cruzada dos polímeros em redes bidimensionais e redes tridimensionais no espaço periplasmático (entre membrana celular e camada de mureína já existente). A maior parte da síntese da parede celular bacteriana consiste em remodelagem, isto é, as bactérias acrescentam novos componentes de parede celular a uma parede celular previamente existente (GOLAN et al., 2009).

O peptidoglicano ou mureína é formado por dois açúcares aminados (N-acetilglucosamina e N-acetil murâmico) e 10 aminoácidos. A síntese deste no citoplasma começa com a produção inicial de um monômero de N-acetilmurâmico e cinco aminoácidos (L-alanina, ácido D-glutâmico, L-lisina e duas D-alanina). Posteriormente, a seqüência inicial é transportada para a superfície externa por um canal de lipídios, mas, antes de chegar ao seu destino, este canal acrescenta a estrutura o componente de N-acetilglucosamina e cinco resíduos de glicina. Neste momento a glicosiltransferase gera ligações entre os dois açúcares aminados polimerizando assim as cadeias nascentes de peptidoglicano e a transpeptidase, também conhecida como proteína de ligação a penicilina (PBP), reconhece os resíduos de D-alanil-D-alanina, para posteriormente levar a um corte entre esses dois tipos de resíduos, permitindo a ligação entre o penúltimo resíduo da cadeia de D-alanina com pentaglicina do segundo monômero, desta forma liga as cadeias de peptidoglicano recém-formadas às cadeias de peptidoglicano já existentes nas células de *S. aureus* (ligação cruzada). Esta seqüência de ações permite o crescimento do peptidoglicano e, portanto, maior estabilidade estrutural da parede bacteriana (Figura 2) (HIRAMATSU, 1998).

Qualquer uma destas três fases é passível de servir de alvo para inibição por fármacos, porém apenas algumas etapas bioquímicas são bloqueadas pelos fármacos disponíveis (GOLAN et al., 2009) (Figura 2).





**Figura 2.** Biossíntese da parede celular bacteriana e sua inibição por fármacos (GOLAN et al., 2009)

A vancomicina inibe a síntese da parede celular pela ligação, com elevada afinidade, ao terminal D-alanil-D-alanina das unidades precursoras da parede celular (monômero de mureína). O bloqueio da síntese do peptideoglicano também facilita a entrada do aminoglicosídeo, conferindo sinergismo entre vancomicina e gentamicina (PALMER-TOY, 2000).

O monômero de mureína ligado à vancomicina não serve como substrato para a enzima glicosiltransferase. Há duas classes de sítios de ligação da vancomicina na célula do *S. aureus*: 1) os resíduos de D-alanil-D-alanina nas camadas completadas de peptideoglicano ou na cadeia nascente de peptideoglicano; e 2) os monômeros de mureína localizados na membrana citoplasmática que servem de substrato para a enzima glicosiltransferase. A ligação dos glicopeptídeos aos sítios alvos já formados (D-alanil-D-alanina nas camadas completadas de peptideoglicano) não inibe a síntese de novos peptideoglicanos, embora elas possam interferir na formação da ponte cruzada mediada pelas PBP. Por outro lado, a ligação dos glicopeptídeos

aos monômeros de mureína na membrana citoplasmática inibe completamente a síntese do peptidoglicano e a célula para de se multiplicar (RODRÍGUES; VESGAS, 2005).

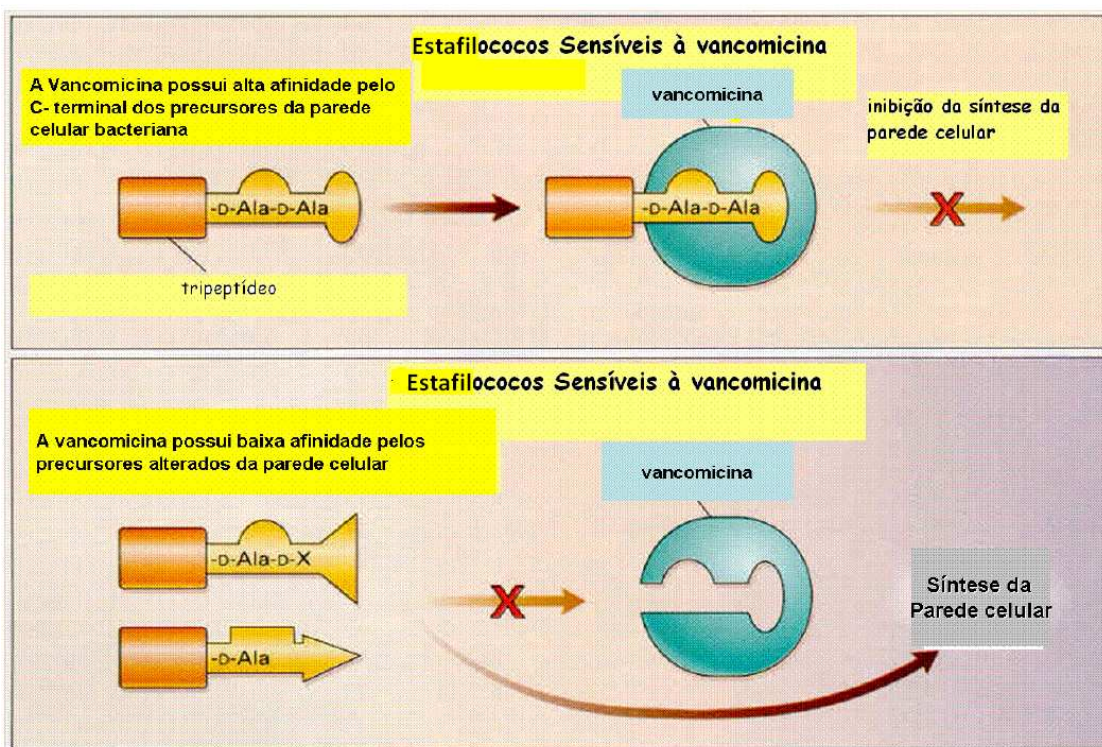
### 2.5.3. Resistência à vancomicina

O primeiro caso clínico de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) com suscetibilidade reduzida a vancomicina (conhecido atualmente como *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina – VISA) foi no Japão em 1996 e isto evidenciou um agravamento na questão de saúde pública relacionada a resistência de estafilococos (HIRAMATSU et al., 1997). Após este achado foram descritos três casos nos Estados Unidos (SMITH et al., 1999). Há descrição de VISA em muitos países como Brasil (OLIVEIRA et al., 2001; BAIOCCHI et al., 2003; KURODA et al., 2001), Coréia (KIM et al., 2000), França (PLOY et al., 1998) e Tailândia (TRAKULSOMBOON et al., 2001); com isto deve-se ressaltar que esta já é uma questão global (HIRAMATSU, 2001).

### 2.5.4. Mecanismo de resistência à vancomicina

A hipótese para aquelas cepas que são VRSA, ou seja, apresentam resistência completa a vancomicina, podem estar respaldadas em uma modificação que consiste no peptídeo final do terminal D-alanil-D-alanina passar a D-alanil-D-lactato (Figura 4) (FONSECA, 2005; LOWY, 2003).

Este peptídeo tem menor afinidade pela vancomicina e não altera a síntese da parede celular. O mecanismo responsável por este fenótipo de resistência é relacionado a conjugação, pelo *S. aureus*, de um plasmídeo carreador gene *vanA* proveniente do *Enterococcus faecalis* (FONSECA, 2005; LOWY, 2003; CHAVERS et al., 2003).



**Figura 3.** Esquema de mecanismo de resistência a Vancomicina – Substituição do D-alanil-D-alanina por D-alanil-D-lactato (MURRAY, 2000).

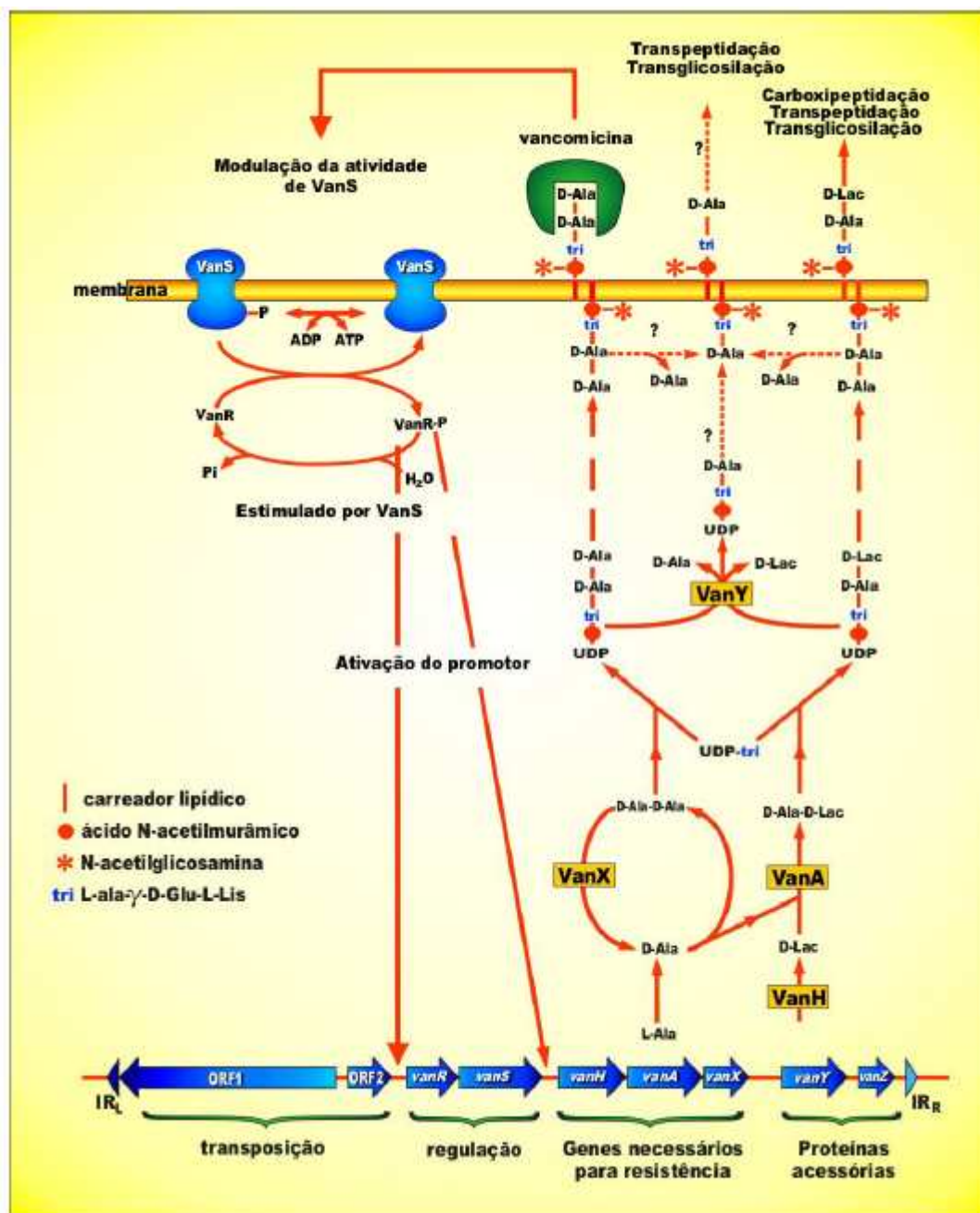
Os enterococos possuem muitos sistemas de conjugação que faz com que sejam disseminadores de genes de resistência para outras bactérias. Podem ser citados plasmídeos

que replicam em Bactérias Gram-positivas (estafilococos e estreptococos) e um transposon especial (elemento que pula de um sitio do DNA para intracelularmente) de conjugação (pode ser transferido de forma intercelular para outras bactérias e se integrar ao genoma) (MURRAY, 2000; WOODFORD, 1998).

Genes de resistência já foram encontrados nestes dois elementos, o que confirma esta possibilidade de transferência de resistência (LECLERQ; COURVALIN, 1997; MURRAY, 2000; CDC, 2002). No primeiro caso documentado de VRSA dos EUA observou-se infecção concomitante por Enterococos resistente a vancomicina (ERV). O isolado de VRSA continha o gene *vanA*, o que sugere que a resistência poderia ter sido adquirida do ERV (CDC, 2002).

O fenótipo de resistência *vanA* é o melhor descrito e se constitui numa proteína de 39kDa, homologa as ligases bacterianas (EDMOND, 1997; NICAS et al., 1989). Essas ligases cromossômicas são codificadas pelo gene *ddl* e são as responsáveis pelo di-peptídeo D-alanil-D-alanina, que compõe o final dos precursores de peptídeoglicano que vão para a superfície bacteriana (ARTHUR et al., 1996; CETINKAYA et al., 2000; FACKLAM et al., 2002; CEREDA, 1999). O *vanA* faz a mesma ligação porém entre D-alanina e D-lactato, gerando o D-alanil-D-lactato no lugar da D-alanil-D-alanina (FACKLAM et al., 2002). A ligação da vancomicina a este novo terminal é de baixa afinidade e então a polimerização da parede ocorre normalmente não sendo impedida pelo glicopeptídeo em questão (LECLERQ; COURVALIN, 1997). As enzimas cromossômicas que produzem os precursores não modificados da parede da célula ainda são funcionais na espécie resistente a vancomicina e os seus produtos modificados (depsipeptídeos) na síntese dos precursores modificados e não modificados do peptídeoglicano (FACKLAM et al., 2002). Os graus de resistência a vancomicina dependerão das respectivas proporções de cada tipo de precursor (ARTHUR et al., 1996). A bactéria só será resistente quando obtiver baixa quantidade de precursores sensíveis (ARTHUR et al., 1996). Este fenótipo é representado por linhagens com altos níveis de resistência a vancomicina devido a expressão de genes contidos em um transposon da família Tn3, Tn1546 (ARTHUR et al., 1993). Este transposon com 10.851 pb é carregado por um plasmídeo conjugativo (PALAZZO et al., 2006) e apresenta o conjunto de genes necessários e suficientes para expressar a resistência aos glicopeptídeos (Figura 5).





**Figura 4.** Esquema do mecanismo de resistência a glicopeptídeos codificado pelo Tn 1546 (ARTHUR et al., 1996).

Os genes *vanRS* regulam a resposta a presença do glicopeptídeo, logo, ativa os demais genes que codificam a resistência em si (ARTHUR et al., 1996; CETINKAYA et al., 2000; DEPARDIEU et al., 2003). O gene *vanS* codifica uma proteína sensora, transmembrana e com um domínio externo que capta a presença do glicopeptídeo e outro domínio citoplasmático que fosforila a proteína *VanR*. A proteína *VanR* fosforilada ativa os promotores R e H, que por sua vez ativam a transcrição dos genes *vanRS* e *vanHAXYZ* (CETINKAYA et al., 2000; DEPARDIEU et al., 2003).

O gene *vanH* codifica a D-hidróxi ácido desidrogenase que produz o D-lactato a partir do piruvato, e este D-lactato ocupará o lugar da D-alanina no peptídeo que compõe a parede celular (ARTHUR et al., 1996; CETINKAYA et al., 2000).

O gene *vanX* codifica uma D,D-dipeptidase que cliva o radicais D-alanil-D-alanina para incorporação de D-alanil-D-lactato (ARTHUR et al., 1996; CETINKAYA et al., 2000).

O gene *vanY* codifica uma D,D-carboxipeptidase que cliva o radical D-alanil-D-alanina que não foi clivado pela D,D-dipeptidase descrita anteriormente (ARTHUR et al., 1996; CETINKAYA et al., 2000).

O gene *vanZ* ainda não foi totalmente esclarecida, no entanto parece estar associada a resitência a teicoplanina em algumas linhagens de enterococos de fenótipo *vanA* e não é bem esclarecida em estafilococos com o mesmo fenótipo (ARTHUR et al., 1996; ARTHUR et al., 1995; COURVALIN, 2006).

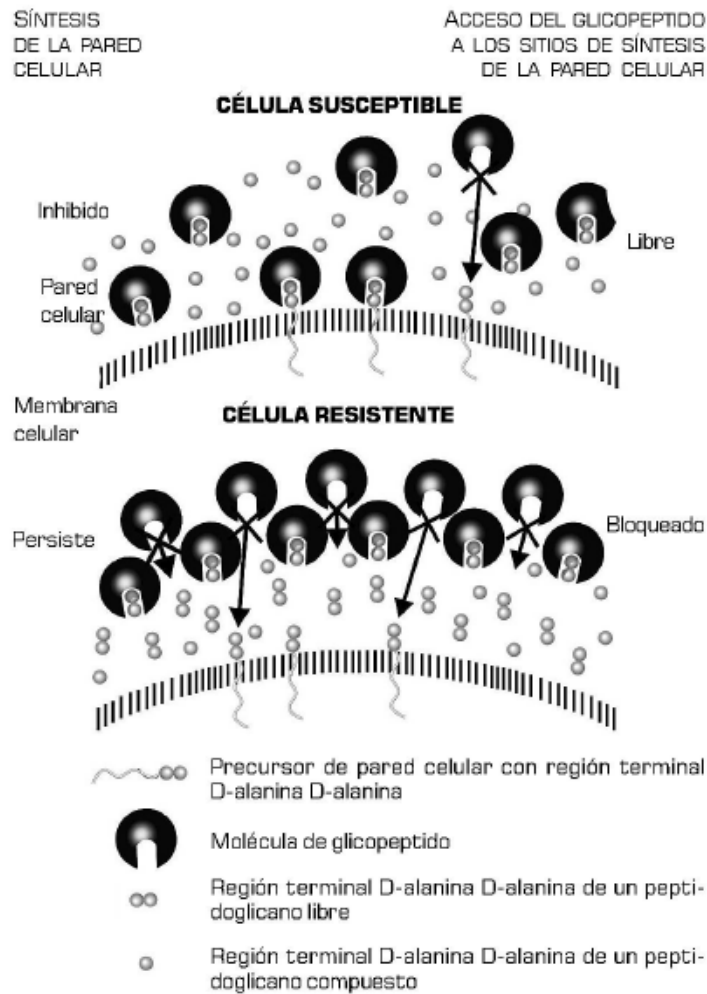
O fenótipo *vanB* é representado por linhagens com níveis diversos de resistência a vancomicina (ARTHUR et al., 1996). A expressão deste fenótipo se dá pelo transpon Tn 1547 de 64 Kb. No entanto também há relatos relacionando os transposon Tn1549 e Tn 5382 (QUINTILIANI; COURVALIN, 1996; CARIAS et al., 1998; GARNIER et al., 2000).

O fenótipo C é representado por linhagens com baixa resistência a vancomicina (NAVARRO; COURVALIN, 1994) sendo espécie específico para enterococos. Além destes fenótipos há descrições de *vanD*, *vanE* e *vanG*, mas são pouco freqüentes (DEPARDIEU et al., 2003; ABADIA et al., 2002; DERPADIÉU et al., 2003). Sendo que os genes *vanD* e *vanE* não são transferíveis por conjugação, logo não acometem estafilococos (ABADIA et al., 2002; DEPARDIEU et al., 2003) e o fenótipo *vanG* também é representado por linhagens com baixa resitência a vancomicina, no entanto tem o diferencial de estes genes poderem ser transferidos por conjugação (ABADIA et al., 2002; DERPADIÉU et al., 2003).

A avaliação do mecanismo de resistência intermediária à vancomicina foi realizada em dois isolados clínicos conhecidos como Mu50 e Mu3. Na análise genética destes os autores observam que não havia o gene de resistência encontrado em Enterococos resistentes a vancomicina (gene *vanA*, *vanB* e *vanCI-3*) (HANAKI et al., 1998). No entanto os dois isolados produziam PBP em maior quantidade que os controles negativos (VISA resistentes ou não a meticilina) (HANAKI et al., 1998). Através de provas bioquímicas e da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) chegaram a hipótese que estes isolados produzem quantidades maiores de peptídeoglicano, já que foram observados mais monômeros de mureína e maior número de camadas de peptídeoglicano compondo a parede celular (aproximadamente de 30 a 40 camadas) (HANAKI et al., 1998).

Neste estudo também foram observadas diferenças entre os isolados Mu50 e Mu3. O Mu50 possuía mais muropeptídeos não-aminados e menor número de ligações cruzadas entre os peptídeoglicanos associada ainda a uma redução na relação dímero/monômero de muropeptídeo. Além disso, observaram que a parede celular deste isolado era capaz de reter mais moléculas de vancomicina que o isolado Mu3 e os controles negativos supracitados (HANAKI et al., 1998). Baseado nisto Hanaki e colaboradores (1998) avaliaram que este mecanismo pode contribuir para resistência a vancomicina, já que desta forma são consumidas mais moléculas de vancomicina e assim a quantidade de moléculas ativas que alcançam a membrana citoplasmática é reduzida (HANAKI et al., 1998). As moléculas glicopeptídeo ficam retidas nas camadas de peptídeoglicanos e não chegam ao seu principal sitio de ação, a membrana citoplasmática, logo, uma maior concentração de vancomicina é necessária para preencher a maioria dos sítios de ligação na parede celular e alcançar o alvo (HIRAMATSU, 2001).

Há ainda evidências que as camadas externas da parede celular misturadas com a vancomicina seriam destruídas pelas próprias moléculas de vancomicina retida, com isto há prevenção da entrada de vancomicina na parte mais interna da parede celular (Figura 3) (CUI et al., 2000).



**Figura 5.** Mecanismo de Resistência – prevenção da entrada de moléculas de vancomicina (CONTRERAS et al., 2005).

Baseado em diversos estudos alguns autores assumiram que a parede celular mais espessa é característica fundamental para a resistência (HIRAMATSU, 2001). Isto pode ser confirmado pelo fato que cepas VISA quando cultivadas em meio sem vancomicina, apresentam, após algumas passagens diminuição do espessamento da parede celular; e estas mesmas cepas quando semeadas em meios com altas concentrações de vancomicina voltam a apresentar espessamento da parede celular (CUI et al, 2003).

Outra forma de se espessar a parede celular além de produzir maior quantidade de peptidoglicano é diminuir a redução de camadas externas mais velhas de peptidoglicano que formam a parede celular. O processo normal é que enzimas autolíticas degradem as camadas externas mais velhas conforme camadas mais novas são produzidas na superfície da membrana citoplasmática, se este mecanismo é interrompido há um maior espessamento da parede celular (HIRAMATSU, 2001).

Com o aumento da produção de mureína, os níveis intracelulares de glutamato caem. A glutatima é consumida pelo aumento da atividade da enzima glicosamina 6-fosfato sintetase para síntese de mureína. Com tudo isto se tem monômeros de mureína com estrutura alterada sem amina, e desta forma não é possível haver a ligação cruzada realizada pela PBP. Logo, resíduos D-alanil-D-alanina em quantidade muito maior ficam expostos na parede celular, retendo a vancomicina nesses terminais livres. Estima-se que esta alteração pode levar a retenção de três a seis vezes mais vancomicina que uma cepa VSSA (HIRAMATSU, 2001).

### 2.5.5. Padronização dos métodos de avaliação da resistência a vancomicina

Há uma certa divergência entre as nomenclaturas utilizadas para diferentes linhagens de *S. aureus* em relação a sua resistência com a vancomicina pelo mundo.

Em 2001, a British Society for Antimicrobial Chemotherapy definiu que *S. aureus* com MIC da vancomicina de 4 mg/L eram considerados sensíveis (VSSA) e com MIC igual a 8 mg/L da vancomicina como resistentes à vancomicina (VRSA) (TENOVER et al., 2001). Em 2002, o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) definiu como sensível (VSSA) os estafilococos inibidos por concentrações inibitórias mínimas (MIC) de 4 mg/L de vancomicina, intermediário (VISA) por concentrações de 8 a 16 mg/L, e resistente (VRSA) por concentrações de 32 mg/L (NCCLS, 2002). Na mesma época, o “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française Microbiologie” da França publicou parecer similar ao estabelecido pelo NCCLS.

Em 2006, o CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute – anteriormente denominado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)], reduziu o ponto de corte de suscetibilidade da vancomicina para o *S. aureus* de 4µg/mL para 2µg/mL já que alguns estudos apresentavam descrição de isolados com eficácia reduzida da vancomicina com CIM  $\geq$  4µg/mL. O corte de resistência também foi reduzido de 32µg/mL para 16µg/mL, pois alguns isolados com CIM  $\geq$  16µg/mL já eram totalmente resistentes a vancomicina. Após estes achados, a resistência intermediária também teve que ser reavaliada, variando entre 4 a 8 µg/mL, porém os valores anteriores foram mantidos para os *Staphylococcus* spp. coagulase negativos, já que não existiam dados clínicos que motivassem esta alteração (RICARDO, 2008; CLSI, 2006).

Este novo padrão de classificação da suscetibilidade a vancomicina vem se mantendo, como pode ser observado no boletim atualizado do CLSI (2010).

### 2.6. Produção de biofilmes por *Staphylococcus* spp.

Nas últimas duas décadas diversas publicações têm apontado o gênero *Staphylococcus* como um gênero bacteriano capaz de formar biofilme, causando um novo tipo de infecção, as quais poderiam ser agrupadas e melhor definidas como: “infecções crônicas associadas a biopolímeros” (GÖTZ, 2002).

Costuma-se definir o termo biofilme como uma comunidade microbiana inserida em uma matriz constituída de uma substância polimérica extracelular composta de polissacarídeos. Esta comunidade apresenta um fenótipo diferenciado, com variações na expressão gênica e síntese protéica, quando comparada com a população de células planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Através de microscopia eletrônica de varredura, foi observado que tal polissacarídeo tem a propriedade de se aderir em superfícies plásticas e, quando produzido em abundância, parece mediar a formação de uma estrutura constituída de múltiplas camadas de células bacterianas sobre a superfície de polímeros utilizados em dispositivos médicos implantáveis, resultando em um filme biológico ou, simplesmente, biofilme (CHRISTENSEN et al., 1985).

A formação do biofilme parece ocorrer em duas etapas: adesão da bactéria a uma superfície e adesão intercelular, formando múltiplas camadas de células bacterianas (GÖTZ, 2002).

Tem sido sugerido que o desenvolvimento do biofilme parece estar associado à resposta da bactéria aos sinais (variações) ambientais tais como temperatura, pH, osmolaridade, concentração de oxigênio e de nutrientes, o que sugere que o biofilme deva estar sob fina regulação gênica. Estudos recentes indicam que devam existir, pelo menos, dois tipos de mecanismo de formação de biofilme nos estafilococos: o biofilme *ica*-dependente, mediado pelo polissacarídeo de adesão intercelular, também conhecido como N-acetilglicosamina polimérica (MACK et al., 1996; GRINHOLC et al., 2007) e o *ica*-

independente, este parecendo mais complexo, e cujo mecanismo envolvido em sua formação não se encontra ainda, totalmente, esclarecido (O'GARA, 2007).

O *quorum-sensing* dos *S. aureus* é um sistema de comunicação bacteriana sobre a densidade de células presentes nos biofilmes, e o locus responsável é o locus *agr* que consiste em 4 genes (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*), sendo que este locus é ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a fase estacionária por um mecanismo autorregulatório que envolve um peptídeo modificado que sinaliza a densidade celular (VOUNG et al., 2000).

Há um consenso de que o biofilme contribua para a persistência bacteriana em sítios infecciosos ou para infecções crônicas, pois dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos. Além disto, o biofilme confere uma maior capacidade de ligação dos microorganismos a diferentes superfícies. (CRAMTON et al., 1999; CUCARELLA et al., 2001).

Em infecção experimental de glândulas mamárias de ovinos, amostras de *S. aureus* foram capazes de produzir biofilme e apresentaram maior capacidade de colonização quando comparadas com variantes não produtoras deste material (BASELGA et al., 1993). O papel do biofilme na aderência de amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina também pode ser observado em cultura de células, o que fornece evidências de seu possível papel na colonização da glândula mamária. A adesão de *S. aureus* ao epitélio glandular mamário é considerada a primeira etapa crítica na patogênese da mastite (AGUILAR et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003).

Estudos “in vitro” demonstraram que as bactérias nos biofilmes tornaram-se de 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células livres das mesmas estirpes (AMORENA et al., 1999; OLSON et al., 2002; CONLEY et al., 2003). Os mecanismos responsáveis pela resistência dos microrganismos nos biofilmes aos agentes antimicrobianos são: demora na penetração de agentes antimicrobianos através das matrizes dos biofilmes, taxa de multiplicação alterada de organismos nos biofilmes, mudanças fisiológicas com o crescimento dos biofilmes incluindo as células persistentes. A matriz de exopolissacarídeo funciona como barreira aos agentes antimicrobianos (STEWART; CONSTERTON, 2001).

## 2.7. Probióticos

No início do século 20, foi proposto que bactérias específicas exerciam benefícios à saúde do hospedeiro. Elie Metchnikoff, prêmio Nobel por sua descoberta da fagocitose e diretor do Instituto Pasteur, lançou a idéia de que as bactérias lácticas presentes no iogurte exerciam efeito benéfico ao organismo receptor, após observar que camponeses búlgaros, cuja dieta incluía a ingestão diária de iogurte, apresentavam uma vida mais prolongada e saudável em relação às populações que não consumiam iogurte. A partir de então, vários estudos foram desenvolvidos para esclarecer a relação destas bactérias na promoção da saúde do hospedeiro (SHORTT, 1999).

A palavra probiótico foi citada pela primeira vez por Lilley e Stillwell em 1965, caracterizando substâncias secretadas por um microrganismo, as quais estimulavam o crescimento de outro (VANBELLE et al., 1990; FULLER, 1992).

A definição atual aceita internacionalmente descreve que probióticos se tratam de microorganismos vivos, não patogênicos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).



### 2.7.1. Bacteriocinas

Através da evolução alguns microorganismos vêm desenvolvendo diferentes estratégias para competir por nutrientes em seu meio ambiente. Por exemplo alguns tem melhorado seus sistemas de quimiotaxia (DE WEERT et al., 2002) e outros tem elaborado compostos antimicrobianos para inibir outros membros do ambiente (JACK et al., 1995; RILEY et al., 2001; SAHL; BIERBAUM, 1998).

O estudo da inibição observada entre bactérias, já ocorria no final do Século XIX, quando Pasteur e Joubert relataram a ocorrência de interações antagonísticas entre bactérias, ao observar que um isolamento bacteriano (talvez *E. coli*) era capaz de interferir com o crescimento de *Bacillus anthrax*. (TAGG et al., 1976; HENG et al., 2007). Da mesma forma, Babes observou, em 1985, a inibição de *Corynebacterium diphtheriae* por um isolamento de *Staphylococcus* sp., isolamento esse que passou a ser utilizado no tratamento de difteria na época, sob forma de nebulizadores para aplicação nasal (FLOREY, 1946).

Os estudos pioneiros de Pasteur geraram um método de controle de infecções, a então chamada “estratégia de interferência bacteriana”, visando conter a proliferação de patógenos. Alexander Fleming, em 1929, descobriu as propriedades antibióticas da penicilina, substância produzida pelo fungo do gênero *Penicillium*, que promovia o controle eficaz das infecções por estafilococos, pneumococos e estreptococos (MADIGA et al., 2004).

Contudo, foi o trabalho pioneiro de Gratia (1925) o primeiro claramente elucidativo sobre bacteriocinas, ao encontrar que um isolamento de *E. coli* produzia, em meio líquido de cultura, uma substância termoestável e dializável, capaz de inibir, em baixas concentrações, o crescimento de outro isolamento da mesma espécie. É possível que esse tenha sido o passo inicial para o estudo das bacteriocinas (JACK et al., 1995).

Desde a introdução na medicina humana, os antibióticos têm promovido um enorme impacto no tratamento das doenças infecciosas e no sucesso de procedimentos médicos invasivos, como cirurgias, e também no tratamento de doenças de origem veterinária. Contudo, o aumento da resistência microbiana aos antibióticos contrapõe-se às vantagens de seu emprego (HANCOCK, 2001). Deste modo, o interesse na descoberta de novas substâncias que possuam ação antimicrobiana vem sendo cada vez maior.

Diversas são as substâncias antagônicas que os microorganismos produzem contra outros organismos. A função principal destas substâncias é a de promover uma vantagem em relação a organismos competidores que ocupam o mesmo nicho ecológico (JACK et al., 1995; CRUPPER; IANDOLO, 1996). Os antibióticos de amplo espectro (SAADOUN et al., 1999), produtos do metabolismo como ácidos orgânicos (LAVERMICOCCA et al., 2000), sideróforos (MIRLEAU et al., 2000) e bacteriocinas (TAGG et al., 1976) são exemplos destes compostos.

Até 1995, mais de 100 bacteriocinas de bactérias lácticas foram identificadas (CHEN et al., 1997). Elas são, em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, que apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado, características anfipáticas; variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e às suas propriedades bioquímicas. (KAISER; MONTVILLE, 1996; VERHEUL et al., 1997).

#### 2.7.1.1. Bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas

Bactérias lácticas são cocos ou bastonetes *Gram*-positivos, não esporogênicos, fermentadores, produtores de ácido láctico como resultado final da fermentação de carboidratos, e apresentam metabolismo e características fisiológicas semelhantes (AXELSSON, 1993).

Muitas espécies de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), utilizadas na produção de alimentos fermentados, têm

apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo as do mesmo gênero e/ou patógenos (MCMULLEN; STILES, 1996).

Além de inibir o crescimento de patógenos nos alimentos fermentados, acredita-se que as bactérias lácticas proporcionem efeitos benéficos à saúde. Esta crença fortaleceu o *marketing* de muitos alimentos contendo culturas vivas de bactérias lácticas, incluindo leite não fermentado, leite fermentado, iogurte, culturas secas, bebidas e doces. Esses alimentos com bactérias promotoras de benefícios à saúde são denominados probióticos (RICHARDSON, 1996).

Segundo Bruno e Monteville (1994) e Eijsink e colaboradores (1996), as bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas e exibem propriedades antimicrobianas contra espécies intimamente relacionadas com o organismo produtor.

A ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas, dependendo mais dos fatores relacionados à espécie bacteriana, como a fase de crescimento celular, e de suas condições de crescimento, do que uma característica relacionada a sua própria molécula. Podem, dessa forma, promover um efeito letal bactericida, sem lise celular (DAVEY, 1981; CARMINATI et al., 1989; CILANO et al., 1991) ou com lise celular (bacteriolítico) (HARRIS et al., 1989; KOJIC et al., 1991) ou, ainda, inibir a multiplicação microbiana, com efeito bacteriostático (CILANO et al., 1991). As bacteriocinas reagem com sítios específicos ou inespecíficos de ligação na bactéria sensível e apresentam modo de ação similar, desestabilizando a força protônica da membrana da célula sensível.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil dos isolados de *Staphylococcus* spp a partir de quadros de mastite bovina clínica e subclínica nas regiões Metropolitana e Sul-Fluminense do Rio de Janeiro quanto à resistência à vancomicina, como também a suscetibilidade a bacteriocinas produzidas por cepas de *Lactobacillus* spp.

#### 3.2. Específicos

- Avaliar por métodos fenotípicos o perfil de resistência à vancomicina de isolados de *Staphylococcus* spp. previamente identificados fenotipicamente e caracterizados por amplificação do DNAr;
- Detectar os genes *vanA* e *vanB* através das técnicas de reação em cadeia de polimerase e eletroforese em gel.
- Buscar correlação entre as análises genotípicas e fenotípicas de resistência antimicrobiana.
- Buscar uma possível correlação entre a capacidade de produção de “slime” como uma possível barreira mecânica impedindo a ação dos glicopeptídeos.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade destes isolados de *Staphylococcus* spp a bacteriocinas produzidas por espécies de *Lactobacillus* spp.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Isolados bacterianos

Foi avaliado um total de 150 isolados de *Staphylococcus* spp previamente identificados através de provas fenotípicas estabelecidas por Konemam e colaboradores (2008) e através da identificação genotípica após a amplificação do *DNAr* (STRAUB et al., 1999) para os isolados da espécie *Staphylococcus aureus* e detecção dos genes *nuc 3* e *4* (SILVA et al., 2003) para os isolados da espécie *Staphylococcus intermedius*. Os isolados foram divididos em grupos de 50 *Staphylococcus aureus*, 50 *Staphylococcus intermedius* e 50 *Staphylococcus coagulase-negativos*. Todos os isolados foram oriundos de quadros de mastite bovina clínica ou subclínica em propriedades leiteiras das regiões metropolitana e sul do Estado do Rio de Janeiro. A coleta das amostras foi realizada no período de 2007 a 2010, estocadas por congelamento à -20°C em caldo infusão de cérebro e coração (BHI).

### 4.2. Reativação dos Isolados bacterianos

Os isolados mantidos congelados em caldo (BHI) a -20°C foram reativados a partir da semeadura em ágar Trypticase-Soja (TSB) e incubação a 37°C por 24 horas.

### 4.3. Detecção Fenotípica da Resistência aos Antimicrobianos

#### 4.3.1. Preparo do inóculo

Os isolados foram inoculados em Caldo Trypticase-Soja (TSB) e incubados por 2 a 6 horas a 35°C até se obter uma turvação entre 8 a 10% de absorvância num comprimento de onda de 625nm no espectrofotômetro equivalente à 0,5 da escala McFarland, correspondendo à concentração aproximada  $1,5 \times 10^8$  microorganismos/mL. Amostra de cepa padrão utilizada como controle foi a *S. aureus* ATCC25923 fornecida pelo INCQS – FIOCRUZ.

#### 4.3.2. Difusão em disco

Os testes de difusão em disco foram efetuados para as amostras identificadas segundo a metodologia recomendada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010), onde 100 µL da suspensão bacteriana (0,5mL) foram distribuídos por toda a superfície das placas contendo ágar Mueller Hinton (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 35°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (KOHNER et al., 1999).

Foram testados dois betalactâmicos de eleição, penicilina (10UI) e oxacilina (1µg), dois glicopeptídeos, vancomicina (30µg), teicoplanina (30 µg), e um macrolídeo, a gentamicina (10µg). O quadro 1 especifica as zonas de inibição do diâmetro avaliado em milímetros dos antibióticos utilizados.

**Quadro 1.** Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados frente à isolados de *Staphylococcus* spp.

Antimicrobianos	Zonas de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Gentamicina (10µg)	≤12	13-14	≥15
Penicilina (10UI)	≤28	-	≥29
Oxacilina (1µg)	≤10	11-12	≥13
Vancomicina (30µg)	-	-	≥15
Teicoplanina(30µg)	≤10	11-13	≥14

#### 4.3.3. Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)

O método da microdiluição em ágar permitiu a avaliação da menor concentração de vancomicina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de vancomicina (1,0mg/mL) foi diluída em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1,0µg/mL; 2,0µg/mL; 4,0µg/mL; 8,0µg/mL; 16 µg/mL; 24 µg/mL e 32 µg/mL em ágar BHI.

As suspensões bacterianas crescidas por 24h a 37°C em caldo BHI, foram diluídas até  $10^{-3}$ , a fim de obter-se uma quantidade final de, aproximadamente,  $10^6$ UFC/mL. Os isolados foram repicados no ágar BHI contendo as distintas concentrações de vancomicina e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi avaliado através do crescimento da colônia no ágar. Logo, o valor da concentração do ágar posterior ao que apresentou o último crescimento bacteriano, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da vancomicina (KOHNER et al., 1999). Os *Staphylococcus* spp. coagulase positivos que apresentaram crescimento entre 4 à 8 µg/mL foram considerados com resistência intermediária à vancomicina. Já os isolados que apresentaram crescimento em ágar contendo valores de CIM maiores ou iguais a 16,0µg/mL foram considerados resistentes, segundo parâmetros estabelecidos pelo CLSI, 2010.

#### 4.3.4. Ágar “screen”

O desenvolvimento desta técnica se fez através da diluição da vancomicina (1,0 mg/mL) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de meio de cultura (BHI). Os isolados foram semeados com o auxílio de um micropipetador onde foram depositados 10 µL da suspensão bacteriana. Após 24 horas de incubação a 37°C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (CLSI, 2010).

#### 4.4. Produção de “slime”

Os testes a seguir foram realizados com o intuito de se detectar uma possível correlação entre a capacidade de produção de biofilme entre os isolados bacterianos e a resistência aos glicopeptídeos, visto que estes podem atuar como uma barreira mecânica contra a ação de alguns antimicrobianos, principalmente os de alto peso molecular como a vancomicina.

#### 4.4.1. Teste do Ágar Vermelho Congo

A produção de “slime” foi determinada pelo cultivo no Ágar Vermelho Congo (CRA), preparado a partir de 0,8g de corante vermelho congo (Sigma) para 1 L de Ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Sigma) e 36 g de sacarose (Sigma). (FREEMAN et al., 1989). Para tanto as placas de Ágar Vermelho Congo foram inoculadas e incubadas à 37°C por 24 horas, seguido por uma incubação à temperatura ambiente por 48 horas. A produção de colônias rugosas e pretas foi utilizada para diferenciar de estirpes não produtoras de biofilmes, as quais apresentaram colônias lisas e vermelhas (ARCIOLA et al., 2001).

Foram utilizadas também as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e (ATCC 12228), para fins de controle positivo e negativo, respectivamente.

#### 4.4.2. Produção de “slime” em microplacas

As estirpes de *Staphylococcus* spp. foram cultivadas individualmente, por uma noite, no TSB a 37°C e diluídas 1:200 no TSB contendo 0,25% de glicose. Aliquotas de 200µL de células em suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo "U" e incubou-se por 24 horas à 37°C sem agitação (CUCARELLA et al., 2001). Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) secos à 60° C por 1 hora logo após foram corados com 1% de solução de safranina por 1 minuto.

Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 490nm (Biorad model 680). Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco. Cada estirpe para produção de “slime” foi testada em duplicada e o teste foi repetido 3 vezes, foram consideradas produtoras de biofilmes estirpes com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al, 2000). As cepas controles utilizadas foram ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva).

Os isolados foram classificados quanto ao potencial de produção de “slime” em fraco produtor, produtor moderado, forte produtor, através da intensidade de coloração apresentada na placa e os valores obtidos pela absorbância.

### 4.5. Detecção de genes de resistência

#### 4.5.1- Extração do DNA bacteriano

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

A extração do DNA bacteriano foi realizado segundo protocolo de Coelho e colaboradores (2007) onde cada colônia crescida em ágar tripticase de soja (Merck) foi repicada em 10 mL de caldo BHI (Britania). Após 12hs a 37°C, uma alíquota de 1,0 mL do caldo contendo o inóculo foi transferida para microtubos que foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 min. Após três lavagens com tampão TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA – ph 8.0) foram adicionadas 4U de lisostafina (Sigma) a 210µl de TE contendo o precipitado. Após incubação à 37°C por 30 minutos, os microtubos foram levados ao banho-maria a 100°C por 10 minutos e resfriados em gelo imediatamente. O lisado bacteriano foi centrifugado a 1.400 rpm por 8 minutos e 15µl do sobrenadante contendo o DNA foi retirado e utilizado para técnica de PCR.

#### 4.5.2- Amplificação dos genes de resistência através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para detecção dos genes de resistência à vancomicina foi utilizada a técnica de PCR-multiplex, onde as concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 10X (10 mM Tris\_HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 1mM de cada iniciador (Bioneer- Seul, Coréia do Sul), 0,2 mM de dNTP (Fermentas- Burlington, Canadá) e 2 U de *TAQ* polimerase (Fermentas- Burlington, Canadá) em um volume total de reação de 20µl contendo 5µl do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002). Para reduzir a formação de produtos de extensão não específicos, foi utilizado um protocolo de aquecimento inicial (hot-start). As misturas de PCR foram submetidas a ciclos térmicos. Para detecção dos genes de resistência à vancomicina os “primers” utilizados (quadro 2) foram tratados a partir do programa de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento de 54°C por 1 minuto e extensão de 72 °C por 1minuto; extensão final de 72 °C por 10 minutos. Da mistura de reação amplificada pela PCR, 15 µL foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-borato-EDTA (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) a 12 V/cm<sup>2</sup>, por 30 minutos. Os géis foram visualizados em um transiluminador ultra-violeta sob luz UV 254nm após serem banhados em brometo de etídio (0,5 mg/mL) e documentados pelo programa QuantiOne (BioRad). Os tamanhos dos amplicons foram estimados por comparação, com uma escala padrão de tamanho molecular 100-bp.

**Quadro 2.** Iniciadores empregados no ensaio de amplificação dos genes de resistência à vancomicina.

Gene	Iniciadores (5' - 3')	Fragmentos
<i>vanA</i>	GGC AAA ACG ACA ATT GC GTA CAA TGC GGC CGT TA	732 pb
<i>vanB</i>	ACG GAA TGG GAA GCC GA TGC ACC CGA TTT CGT TC	634 pb

#### 4.6. Testes de suscetibilidade às bacteriocinas

As cepas *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* e *L. fermentum* foram isoladas e caracterizadas como produtoras de bacteriocinas através da avaliação de seu espectro de inibição, da ação de enzimas proteolíticas como tripsina e proteases tipo VI, efeito do pH, sensibilidade ao calor e clorofórmio, tratamento com uréia, estimação do peso molecular, efeito bacteriostático ou bactericida segundo Pascual e colaboradores (2008). A detecção da atividade antimicrobiana das cepas de lactobacilos foi realizada pela técnica de estrias cruzadas. As cepas avaliadas como produtoras foram semeadas em estria central em placas de Petri contendo ágar MRS pH 6,2 e incubadas a 37°C em microaerofilia durante 18hs. O cultivo da cepa produtora foi esterilizado por exposição a vapores de clorofórmio durante 20 minutos, posteriormente cada isolado a ser testado foi semeado em linha perpendicular a cepa produtora, e incubado a 37°C por 18 h, após isto se mediram os halos de inibição do crescimento bacteriano (BARBERIS et al., 1994).

#### **4.7. Análise estatística**

As análises estatísticas de média, desvio padrão, variância e significância considerando  $p \leq 0,05$  foram efetuadas utilizando o programa Microsoft Excel. O Teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ), com intervalo de confiança de 95% (IC=95%), foi utilizado para avaliar a possível correlação entre os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência à vancomicina assim como avaliar uma possível correlação entre a produção de “slime” e a resistência à vancomicina. Este teste foi realizado utilizando o software R 2.4.1. (2006).

Os percentuais de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) do teste de difusão em disco simples foi calculado considerando os valores obtidos a partir do teste de microdiluição em ágar (BHI) como preconizado pelo CLSI (2010).



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

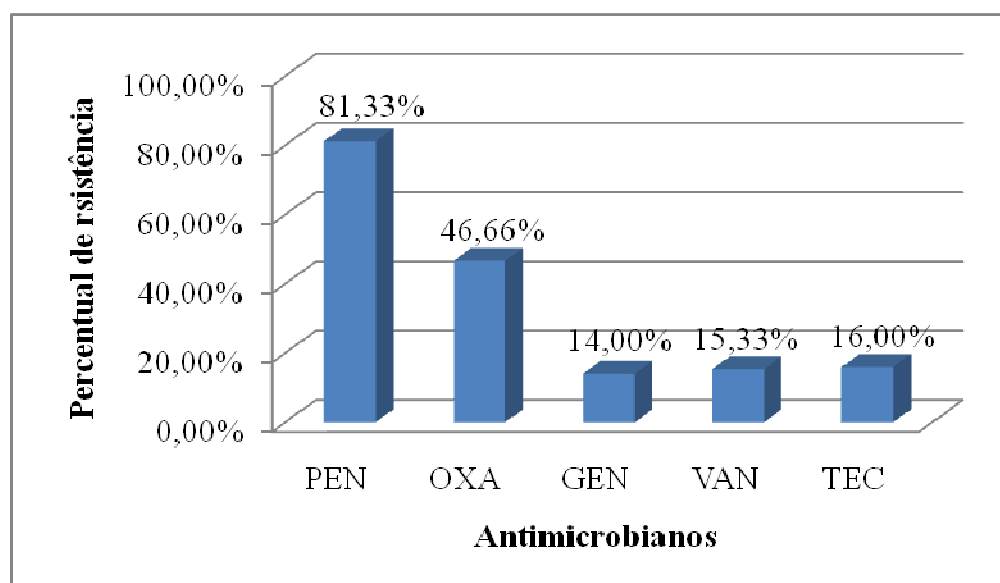
### 5.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp.

Todos os 150 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de quadros de mastite bovina clínica ou subclínica foram avaliados quanto ao perfil de suscetibilidade a 5 antimicrobianos de eleição pelo método de difusão em disco (figura 6). Os isolados foram divididos em grupos de 50 *Staphylococcus aureus*, 50 *Staphylococcus intermedius* e 50 *Staphylococcus* coagulase-negativos.



**Figura 6.** Método de difusão em disco simples.

A figura 7 demonstra o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados.



**Figura 7.** Gráfico apresentando o percentual de resistência dos *Staphylococcus* spp. (n=150) isolados de amostras de mastite bovina.

A gentamicina foi o antimicrobiano que apresentou maior eficácia dentre os antimicrobianos testados, com apenas 14,00% de isolados resistentes (21/150), fato este confirmado por vários autores que demonstraram a eficácia da gentamicina no tratamento de mastite estafilocócica (COSTA et al., 2000; BRITO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BYARUGABA et al., 2004;), o que reforça o ponto de vista defendido por Langoni e colaboradores (2000), de que apesar dos distintos percentuais de sensibilidade a este princípio ativo, a gentamicina continua sendo um antibiótico eficaz no tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana. No entanto, Freitas e colaboradores (2005), ao avaliar a região do agreste de Pernambuco verificaram a ocorrência de um alto nível de resistência dos estafilococos à gentamicina, no município, entre os três estudados, onde este antibiótico era mais utilizado, destacando a importância do uso indiscriminado na seleção de bactérias resistentes.

No presente estudo, a resistência à penicilina foi a prevalente dentre os antimicrobianos testados com 81,33% (122/150), semelhante ao encontrado em isolados de *Staphylococcus* spp. de mastite bovina no Brasil e em todo o mundo, como relatado em trabalho desenvolvido, em 9 países europeus, por Vintoy e colaboradores (2003), onde um total de 32,4% dos 815 *S.aureus* isolados de mastite bovina foram resistentes à penicilina. No Brasil, Corrêa (2003) analisou 95 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite mastítico e observou um percentual de resistência à penicilina de 77,98%. Em trabalho realizado por Freitas e colaboradores (2005) 80,0% de 244 estirpes isoladas do leite no nordeste pernambucano foram resistentes à penicilina. A resistência à penicilina em *Staphylococcus* spp. é um fenômeno mundial e com prevalência crescente, apesar dos esforços para conter o aumento da disseminação de isolados resistentes (FREITAS et al., 2005; BONNA et al., 2007).

Foram detectados 46,66% (70/150) de isolados resistentes à oxacilina. Diversos trabalhos referentes a testes de suscetibilidade à antimicrobianos vem demonstrando um perfil de resistência elevado à oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes origens. Dados nacionais relatam de 66 a 68% de isolados resistentes à oxacilina (FERREIRA et al., 2002; CHANG et al., 2003). A resistência à oxacilina é um problema cosmopolita e indica que os demais betalactâmicos também serão de pouca eficácia limitando assim as alternativas de tratamento (ERSKINE et al., 2004). Quando os Gram-positivos apresentarem resistência a este fármaco, todos demais beta-lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e o monobactâmico aztreonam não deverão ser utilizados, independentemente do resultado do antibiograma, pois provavelmente ocorrerá falha terapêutica quando do uso *in vivo* destes fármacos (OPLUSTIL, 2004).

Uma das principais alternativas no tratamento das infecções causadas por estafilococos resistentes à oxacilina é a utilização dos glicopeptídeos. No presente estudo, através do ensaio de difusão em disco, os isolados apresentaram percentual de resistência de 16 (24/150) e 15,33% (23/150) para teicoplanina e vancomicina, respectivamente. Cabe ressaltar que a motivação inicial para realização deste estudo foi confirmar o alto percentual de resistência à vancomicina encontrada em trabalho realizado por Coelho e colaboradores (2007) que ao analisar 150 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos obtiveram 24% de resistência à vancomicina pelo mesmo método. A variação de resistência entre estes trabalhos se deve a utilização, no presente estudo, de 50 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos que não apresentaram resistência aos glicopeptídeos. Além disto, Coelho e colaboradores (2007) avaliaram 18 isolados de *Staphylococcus hyicus* dos quais 4 isolados (22,22 %) apresentaram resistência à vancomicina.

Tanto os percentuais obtidos neste estudo quanto os de Coelho e colaboradores (2007) são considerados elevados quando comparados aos trabalhos desenvolvidos por Shuhaibar e Falkiner (1992), Tahnkiwale e colaboradores (2002) e Freitas e colaboradores (2005), que não

detectaram resistência a vancomicina (0%) ao avaliar 180, 230 e 59 isolados de *Staphylococcus* spp provenientes de quadros de mastite bovina, respectivamente. Dantas e colaboradores (2006) relataram 5,2% de resistência em 140 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de leite e das mãos de manipuladores, um percentual baixo de resistência se comparado ao encontrado no presente trabalho. Estas divergências sustentaram a necessidade de aprofundar a metodologia de avaliação para detecção da resistência a este grupo de antimicrobianos (técnica de microdiluição em ágar), em especial, dada a importância destes como alternativa terapêutica aos isolados MRSA.

De acordo com perfil de resistência dos *Staphylococcus* coagulase-positivos aos antimicrobianos testados, através do ensaio de difusão em disco, foram estabelecidos diferentes antibiogramas para cada espécie estudada (tabela 1).

**Tabela 1.** Perfis de resistência aos antimicrobianos testados dos *Staphylococcus* spp. coagulase positivos avaliados.

Antibiogramas	Resistência aos antimicrobianos	<i>S. aureus</i> (N=50)	<i>S. intermedius</i> (N=50)
		n (%)	n (%)
1	GEN; PEN; OXA; VAN, TEC	3 (6%)	6 (12%)
2	PEN; OXA; VAN; TEC	9 (18%)	4 (8%)
3	PEN; OXA; VAN	0 (0%)	1 (2%)
4	GEN; PEN; OXA	2 (4%)	3 (6%)
5	PEN; OXA	27 (54%)	12 (24%)
6	GEN; PEN	0 (0%)	1 (2%)
7	GEN	1 (2%)	1 (2%)
8	PEN	8 (16%)	14 (28%)
9	*	0 (0%)	1 (2%)

\*antibiograma de sensibilidade à todos os antimicrobianos

Para *S. aureus*, os antibiogramas de maior frequência foram o perfil 5 (54%), representando resistência a penicilina e oxacilina, seguido do perfil 2 (18%) que apresentou resistência tanto aos beta-lactâmicos quanto aos glicopeptídeos testados e o perfil 8 (16%) de resistência exclusiva a penicilina. Para *S. intermedius*, os antibiogramas de maior frequência foram o perfil 8 (28%), de resistência à penicilina, seguido do perfil 5 (24%) que apresentou resistência à penicilina e oxacilina e o perfil 1 (12%) de resistência a todos os antimicrobianos testados. Tal fato reforça a ideia da baixa eficácia dos betalactâmicos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. A baixa sensibilidade a estes antibióticos pode estar associada à produção de uma enzima extracelular, beta-lactamase, a qual hidrolisa o anel betalactâmico, inativando o antibiótico (STAPLETON; TAYLOR, 2002) ou devido à alteração do sítio de ação do antibiótico pela produção de uma proteína ligante de penicilina modificada (PBP2a ou PBP2'), de baixa afinidade, que está ausente em isolados de *Staphylococcus* spp. sensíveis a oxacilina (KATAYAMA et al., 2001; KURODA et al., 2001). Associado a este fato, o uso indiscriminado de antibióticos agrava ainda mais o problema da resistência (ROBINSON; ENRIGHT, 2003).

Todos os isolados que apresentaram resistência à oxacilina, foram resistentes também à penicilina, reforçando a ideia de que uma vez que o isolado apresente resistência à oxacilina este será resistente a todos os betalactâmicos, como por exemplo as penicilinas, visto que a oxacilina serve como marcador de resistência à esta classe de antimicrobiano.

Os antibiogramas 1 e 2 apresentaram percentuais significativos, o que demonstra a circulação de estirpes multidroga-resistentes nas amostras estudadas, representando risco ao

futuro da terapia antimicrobiana em humanos e animais. O uso incorreto, associado à seleção natural dos microorganismos, provavelmente, resultou no fenômeno da resistência, tanto na medicina veterinária quanto na humana. A resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos e às aplicações sub-terapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças e para a promoção do crescimento e da eficiência alimentar em animais de produção. Freitas e colaboradores (2005) observaram cepas de *Staphylococcus* spp com resistência múltipla para seis a nove antimicrobianos simultaneamente e concluíram que o percentual de multiresistência é preocupante, pois muitos dos antimicrobianos disponíveis não teriam efeito sobre estes microorganismos dificultando o tratamento dos animais, demonstrando a real importância do monitoramento em laboratórios e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana para um melhor controle através de terapêutica adequada. Segundo Martins e colaboradores (2010), diversos estudos que tratam da suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para *S. aureus*, o agente mais frequentemente isolado. O surgimento de amostras de *Staphylococcus aureus* multirresistentes nas últimas décadas foi relacionado com a pressão seletiva exercida por antimicrobianos (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Todos os isolados resistentes aos glicopeptídeos testados apresentaram-se também resistentes aos betalactâmicos. Isto ressalta a grande importância destes isolados, visto que a vancomicina é uma das últimas opções de tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp. resistentes aos betalactâmicos e deve ser preservada para uso em casos de extrema gravidade (CHIEW; HALL, 1998; SCOTT, 2000). O aumento da frequência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina foi paralelamente acompanhado da aquisição de resistência à maioria dos antimicrobianos com atividade antiestafilocócica atualmente disponíveis, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, lincosamídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina. Por conseguinte, os glicopeptídeos, principalmente a vancomicina, tornaram-se uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas MRSA (CHAMBERS, 1997; LOWY, 1998; OLIVEIRA et al., 2000). Contudo, a emergência de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) limitou consideravelmente as possibilidades de tratamento dessas infecções (HIRAMATSU, 1998).

Um dos principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos é a modificação das PBPs (AARESTROP et al., 2001; COELHO et al., 2007). A produção da PBP2a, proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade, é determinada pela presença do gene *mecA*. Este gene induz resistência à oxacilina, levando a falhas terapêuticas quando outros betalactâmicos ou outras classes de antibióticos são utilizadas (MOON et al., 2007). Contreras e colaboradores (2005) relataram a possibilidade de um dos mecanismos de resistência aos glicopeptídeos ser o engrossamento da parede celular em decorrência de uma maior produção de PBPs 2 e 2a.

Não foram estabelecidos antibiótipos para os *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (ECNs), uma vez que devido a diversidade destes agentes, seria necessário uma investigação mais detalhada em nível de espécie, o que não era o objetivo desse estudo. A avaliação dos ECNs foi realizada com o intuito de observar a circulação de cepas resistentes aos antimicrobianos avaliados e uma possível contribuição à compreensão dos mecanismos gerais dessa resistência. Estes isolados apresentaram maior percentual (46%) de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados (perfil 9), ausência dos perfis 1 e 2 (perfis que representaram resistência a maioria dos antimicrobianos testados) e a ausência de resistência aos glicopeptídeos. No entanto, foi possível detectar elevado percentual de resistência a penicilina e oxacilina (42%), confirmando a dispersão significativa de mecanismos de resistência a beta-lactâmicos entre diferentes espécies de *Staphylococcus* spp.

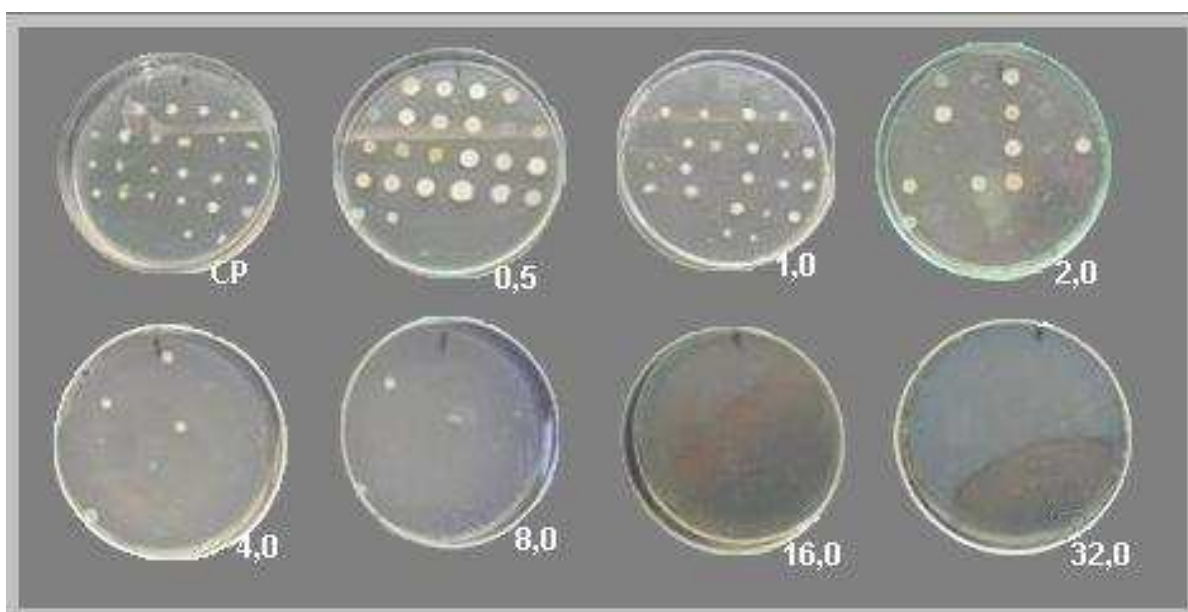
A gentamicina foi o antimicrobiano que apresentou maior eficácia frente aos ECNs, o que reforça sua eficácia em quadros de mastite bovina. Segundo Barrasa e colaboradores

(2000) e Farias (2002), os aminoglicosídeos têm mostrado boa efetividade contra infecções por estafilococos, sendo, portanto, apontados como fármaco de eleição no tratamento destas infecções.

## 5.2. Testes fenotípicos de suscetibilidade à vancomicina e gene *vanA*

### 5.2.1. Determinação da CIM

A microdiluição em ágar (figura 8) foi o teste fenotípico utilizado para determinar a CIM da vancomicina nos isolados estudados, com base nos dados apresentados pelo CLSI (2010). Neste teste o antimicrobiano é incorporado ao ágar em diferentes concentrações, podendo ser analisados até 30 isolados em uma mesma placa (CLSI, 2010). Este teste foi realizado também para os ECNs, mas semelhante ao ocorrido nos ensaios de difusão em disco, não foi detectada resistência a vancomicina. Dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo estudados, 8 isolados (8,00%) apresentaram o fenótipo de resistência à vancomicina, sendo 5 isolados de *S. aureus* (62,5%) e 3 de *S. intermedius* (37,5%).



**Figura 8.** Teste de microdiluição em ágar BHI, com as concentrações utilizadas em µg/mL. CP= controle positivo.

A tabela 2 apresenta o percentual de resistência em relação ao intervalo de CIM apresentado pelos isolados.

**Tabela 2.** Percentual de resistência em relação ao intervalo de CIM das diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos oriundos de amostras de mastite bovina.

Espécies	*SIV	SRV
	CIM 4-8µg/mL n (%)	CIM ≥ 16µg/mL n (%)
<i>S.aureus</i> (n=5)	3 (60%)	2 (40%)
<i>S. intermedius</i> (n=3)	1 (33,33%)	2 (66,67%)

\*SIV= *Staphylococcus* spp. com suscetibilidade intermediária a vancomicina; SRV= *Staphylococcus* spp. resistente a vancomicina.

Dos isolados que apresentaram resistência à vancomicina 50% (4/8) apresentaram resistência intermediária a vancomicina apresentando valores de CIM que variaram entre 4 a 8µg/mL, sendo 3 isolados de *S. aureus* e 1 de *S. intermedius*. A resistência a glicopeptídeos em *S. aureus* pode se expressar através de dois fenótipos distintos, VISA (*S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina) e VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina). Os isolados VISA apresentam sensibilidade intermediária à vancomicina, com CIM variando de 4 a 8µg/mL para este agente. O aparecimento, em 1996, de *S. aureus* vancomicina intermediário (VISA) com uma CIM de 8 µg/mL despertou grande preocupação entre pesquisadores de todo o mundo, os quais preconizaram a vigilância epidemiológica. Cepas VISA estão se tornando prevalente em vários países, como Japão (CUI et al., 2006), Estados Unidos (SMITH et al., 1999), Brasil (OLIVEIRA et al., 2001), Alemanha (REIPERT et al., 2003) e China (LU et al., 2005). O segundo fenótipo de resistência, VRSA, foi descrito recentemente, e está relacionado a um alto grau de resistência à vancomicina, com CIM ≥16µg/mL (RICARDO et al., 2008).

No presente estudo, além da detecção de resistência e resistência intermediária à vancomicina em *Staphylococcus aureus*, também foi possível detectar estes perfis de resistência em *Staphylococcus intermedius*. Tais resultados, até onde é de nosso conhecimento, nunca foram reportados anteriormente. A próxima etapa desta análise será estudar de modo mais aprofundado os possíveis mecanismos envolvidos na resistência detectada. Em estudos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa (COELHO et al., 2007; PEREIRA et al., 2009), tem sido observada forte semelhança entre os perfis de resistência obtidos para *S. aureus* e *S. intermedius*, sugerindo que estas espécies apresentem suscetibilidade semelhante aos fatores de pressão de seleção para dispersão de genes de resistência, bem como facilidade na transferência interespecífica destes genes. Tais observações não podem ser relacionadas apenas com a elevada frequência de ocorrência destas espécies, uma vez que não ocorrem em outras espécies de frequência semelhante, como entre os ENCs (SOARES et al., 2008), ou mesmo entre outros coagulase-positivos. Cabe, em momento futuro, avaliar melhor este fenômeno, considerando a identificação recente, e em alguns pontos ainda controversa do *S. intermedius*.

Autores discutem ainda um possível estágio inicial de resistência denominado hetero-VISA, descrito para cepas de *S. aureus* sensíveis a vancomicina, mas que contêm subpopulações resistentes para este antimicrobiano. O significado clínico dos isolados hetero-VISA, no entanto, ainda não está bem estabelecido (WALSH; HOWE, 2002; COSGROVE et al., 2004). A CIM das hVISA estão dentro dos padrões de sensibilidade, mas tendem para o nível mais elevado, de 2µg/mL. No presente trabalho foram detectados 6 isolados de *S. aureus* com CIM de 2 µg/mL caracterizando o perfil mais provável de heteroresistência à vancomicina. Em um estudo com 1.357 cepas de MRSA isoladas de 1997 a 2000, em 12

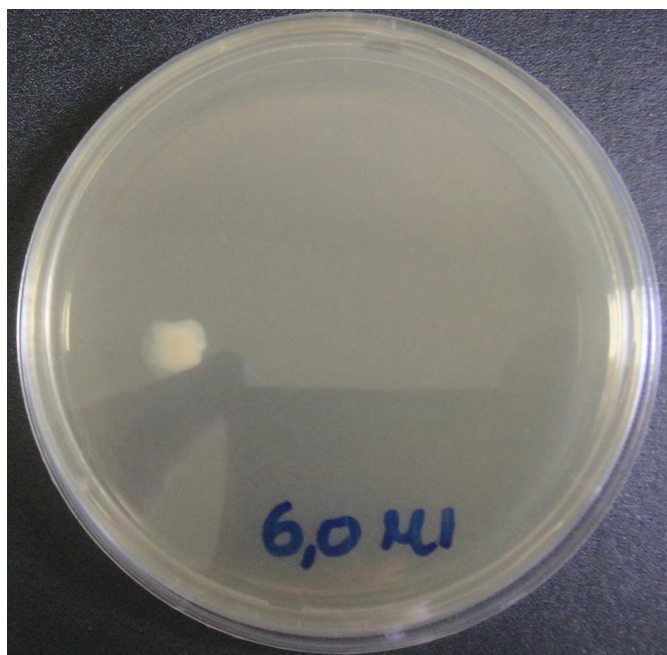
países asiáticos, nenhum caso de VISA foi isolado, enquanto 4,3% de cepas foram hVISA (MOHR; MURRAY, 2007).

A sensibilidade reduzida à vancomicina parece resultar de mudanças na biossíntese dos peptidoglicanos. Isolados de *Staphylococcus* spp. que apresentam resistência a vancomicina parecem ter uma notável capacidade de produção de quantidade adicional de peptidoglicano, resultando em uma parede celular mais espessa (LOWY, 2003). Estudos bioquímicos e de microscopia eletrônica de transmissão da parede celular de uma cepa VRSA demonstram produção de maiores quantidades de peptidoglicano e de monômeros de mureína. Nessas circunstâncias, uma maior quantidade de moléculas de vancomicina fica retida nas camadas de peptidoglicano, enquanto uma quantidade muito menor do antibiótico chega à membrana citoplasmática, onde ocorre a síntese do peptidoglicano (TAVARES, 2002; CASSETTARI et al., 2005; TIWARI; SEN, 2006).

Sihaes e colaboradores (2002) relataram aumento da produção de PBP2 em uma cepa *S. aureus* resistente à teicoplanina. Em trabalho realizado por Hanaki e colaboradores (1998), a fim de testar qual das duas PBPs, PBP2 ou PBP2a, seria associada com a resistência à vancomicina, cada PBP foi superproduzida introduzindo plasmídeos recombinantes em uma cepa de *Staphylococcus* spp. conhecida. As cepas com plasmídeos recombinantes de PBP2 produziram um valor 6,6 vezes mais alto de PBP2 e de PBP2a produziram 12,5 vezes mais PBP2a do que os isolados sem o plasmídeo. Apesar da maior produção de PBP2a, foi observado que esta superprodução de PBP2a não parece contribuir para a expressão de resistência à vancomicina, uma vez que exclusão do gene *mecA*, não influencia sensivelmente o padrão de suscetibilidade a vancomicina. Portanto, parece ser a PBP2 em vez PBP2a que contribui para a resistência à vancomicina. Moreira e colaboradores (1997) também haviam relatado mostraram que o aumento da produção de PBP2 está correlacionada com a resistência à vancomicina. Eles propuseram que o aumento do número de moléculas PBP2 compete com os precursores do peptidoglicano para a ligação aos glicopeptídeos, tornando assim a síntese do peptidoglicano novo menos vulnerável à inibição. A vancomicina se liga a muitos terminais D-alanil-D-alanil dentro da cadeia de peptidoglicano adicional e não alcança seu alvo na superfície da membrana citoplasmática para exercer sua ação na inibição da síntese do peptidoglicano (CUI et al., 2003). Além deste mecanismo de retenção da vancomicina, chamado de “affinity trapping”, Cui e colaboradores (2003) sugeriram que a estrutura das camadas externas do peptidoglicano mais espesso misturados com a vancomicina (“mesh structure”) é destruída pelas próprias moléculas de vancomicina retidas. Isso previne futuras penetrações de moléculas de vancomicina na parte interna das camadas da parede celular (conhecido como fenômeno de bloqueio – “clogging phenomenon”).

O fato de que as moléculas de glicopeptídeos podem ficar retidas nas camadas já formadas de peptidoglicano na parede celular do *Staphylococcus* spp., torna muito mais difícil a realização de testes acurados de suscetibilidade aos glicopeptídeos do que testes para outros antibióticos. As variações do inóculo (o número de células bacterianas) e o meio contendo glicopeptídeo, podem afetar a concentração do antibiótico livre, resultando em variações nos valores de CIM (HIRAMATSU, 2001).

Como preconizado pelo CLSI (2010) os isolados que apresentaram CIM  $\geq 8,0\mu\text{g/mL}$  pelo método de microdiluição em ágar, foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em ágar BHI contendo  $6\mu\text{g/mL}$  de vancomicina (figura 9). Todos os isolados com este perfil (4/6), tiveram o crescimento no ágar “screen” de vancomicina confirmando a suscetibilidade reduzida a vancomicina. Os isolados com perfil de resistência intermediária que apresentaram CIM de  $4\mu\text{g/mL}$  não apresentaram crescimento no ágar “screen” para vancomicina.

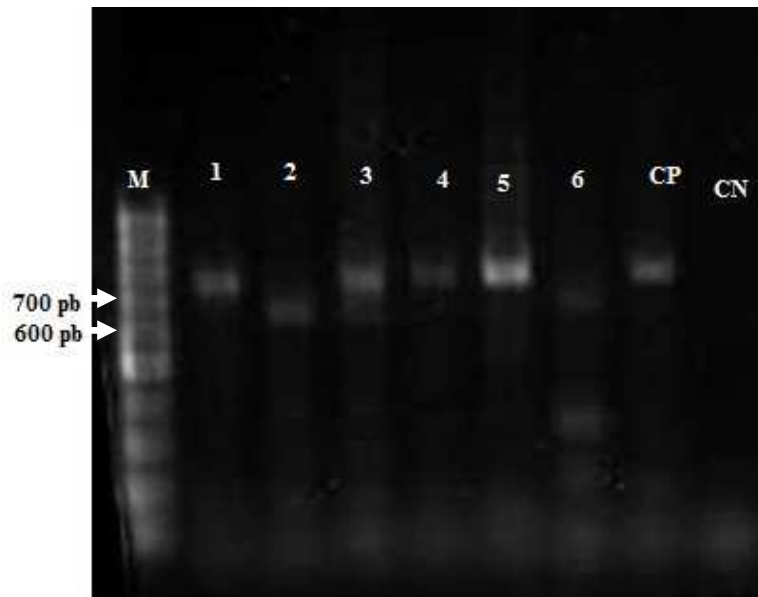


**Figura 9.** Colônia crescida em ágar BHI com 6 µg/mL de vancomicina demonstrando resistência à este antimicrobiano.

#### **5.2.2. Detecção dos genes de resistência à vancomicina**

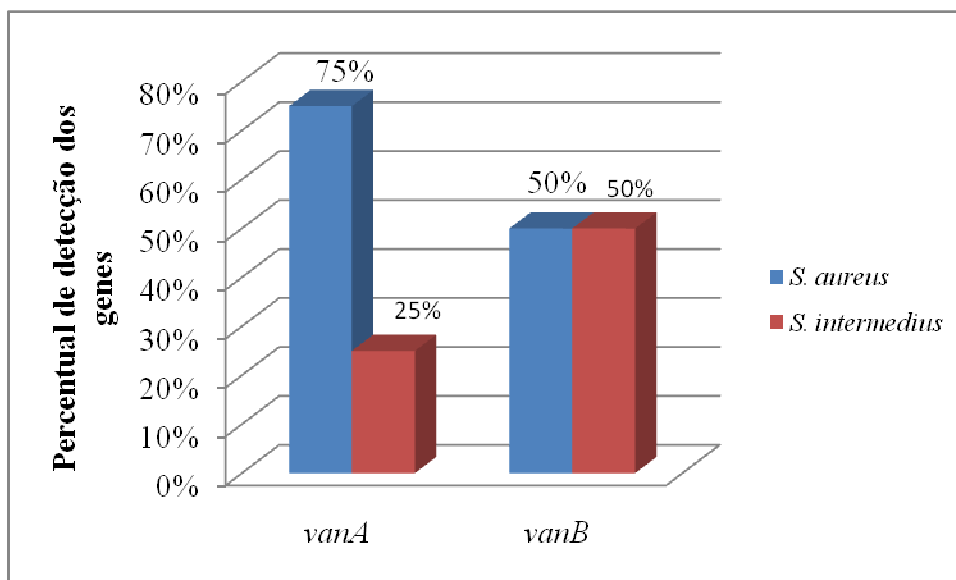
Após a análise fenotípica de resistência à vancomicina os isolados foram avaliados quanto a presença dos genes *vanA* e *vanB* pela técnica de PCR multiplex (figura 10). Conforme esperado pelos resultados obtidos na análise fenotípica, os *Staphylococcus* spp. coagulase negativos não apresentaram genes de resistência à vancomicina. Todos os 100 isolados foram avaliados quanto à presença do gene. Do total de 16 *Staphylococcus* spp. coagulase positivos que apresentaram resistência à vancomicina, 6 isolados (4 em *Staphylococcus aureus* e 2 em *Staphylococcus intermedius*) apresentaram os genes de resistência à vancomicina, sendo que 66,66% (4/6) apresentaram o gene *vanA* e 33,33% (2/6) apresentaram o gene *vanB*.





**Figura 10.** Genes *vanA* (732 pb) e *vanB* (635 pb) de *Staphylococcus* spp. em gel de agarose (1,5%). M= marcador de 100 pb; CP=controle positivo; CN= controle negativo. 1, 3, 4, 5= *vanA*; 2, 6= *vanB*.

A figura 11 apresenta o percentual de detecção dos genes de resistência em relação às diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos.



**Figura 11.** Gráfico apresentando o percentual de detecção dos genes de resistência à vancomicina em relação as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos estudados.

Foram detectados 4 genes *vanA*, sendo 3 oriundos de isolados de *Staphylococcus aureus* (75%) e 1 em *Staphylococcus intermedius* (25%). O gene *vanB* foi detectado em 2 isolados, 1 em *Staphylococcus aureus* (50%) e 1 em *Staphylococcus intermedius* (50%).

A literatura aponta que isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à vancomicina que apresentam genes de resistência à vancomicina estão mais relacionados a estudos realizados

em infecções hospitalares em humanos, como por exemplo, os casos de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA), isolados de pacientes no Michigan e Pensylvania em junho e setembro e respectivamente (CDC, 2002; CHANG et al., 2003). Nas buscas efetuadas na literatura não foram encontrados relatos que apontem a presença destes genes em isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de origem animal. Estes resultados ressaltam a importância do monitoramento da presença de mecanismos de resistência aos glicopeptídeos em isolados oriundos de amostras de leite, bem como a circulação de genes possivelmente envolvidos nestes mecanismos.

Embora os genes de resistência *vanA* e *vanB* tenham sido relatados em enterococos resistentes à vancomicina, a transferência conjugativa destes genes de enterococos para *Staphylococcus* spp. já havia sido demonstrada *in vitro* desde a década de 90 (NOBLE et al., 1992). A baixa disseminação de VRSA encontrada tem sido atribuída, em parte à elevada instabilidade dos plasmídeos de enterococos em certos isolados MRSA (PERICHON; COURVALIN, 2006; ZHU et al., 2008).

O *vanA* é o genótipo mais frequentemente isolado de resistência à glicopeptídeos associado aos enterococos e segundo Courvalin (2006) seria o único gene de resistência detectado em *Staphylococcus aureus*. Este gene está contido num transposon de aproximadamente 11 Kb denominado elemento Tn1546 encontrado pela primeira vez num plasmídeo de um isolado clínico de *Enterococcus faecalis* (COURVALIN, 2006), sendo relacionado ao encontro de altos valores de CIM tanto a teicoplanina quanto à vancomicina (REYNOLDS; COUVALIN, 2005). No presente trabalho, todos os isolados que apresentaram o respectivo gene foram resistentes tanto a vancomicina quanto a teicoplanina e apresentaram valores de CIM maiores ou iguais a 16 µg/mL no teste de microdiluição em ágar para vancomicina.

A presença do gene *vanB* está relacionada ao agrupamento de genes presentes no operon *vanB* composto por elementos de 90 à 150 kb sendo estes elementos transferíveis através da conjugação cromossomal (QUINTILIANI; COURVALIN, 1996; RICE et al., 1998). O *vanB* foi amplamente divulgado em isolados clínicos de enterococos nos Estados Unidos e na Europa (CARIAS et al., 1998). Este gene geralmente está associado a presença de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina, uma vez que esta parece não possuir a capacidade de indução do gene (GARNIER et al., 2000; COURVALIN, 2006). No presente estudo, este fato não foi observado, visto que isolados resistentes a teicoplanina continham este gene. O mecanismo de resistência é o mesmo apresentado pelo *vanA*, ou seja, é a síntese do dipeptídeo, D-Alanina-D-Lactato ao invés de D-Alanina-D-Alanina (ARTHUR, 1996).

Até o momento, a literatura atribui a presença dos genes *vanA* e *vanB*, em isolados de origem animal, ao emprego do glicopeptídeo avoparcina como promotor de crescimento em animais de corte, especialmente frangos, também podendo ter influenciado para o surgimento de resistência em humanos (CARMELI et al., 2002). No presente estudo, os isolados bacterianos que apresentaram estes genes foram obtidos de amostras de leite em propriedades bovinocultoras onde não há relação direta com avicultura de corte, e sem utilização de glicopeptídeos no manejo destes animais, apontando para a necessidade de estudo de um outro mecanismo de pressão de seleção positiva para dispersão deste gene em ambientes de produção animal.

Foi detectada resistência fenotípica em isolados negativos para a presença dos genes de resistência, sugerindo a ocorrência de um mecanismo passivo de resistência, possivelmente, o espessamento da parede celular bacteriana como vem sendo reportado por diversos autores (HIRAMATSU, 2001; TAVARES, 2002; CUI et al., 2003; CASSETTARI et al., 2005; TIWARI; SEN, 2006). Tal hipótese merece uma avaliação criteriosa destes isolados através da técnica de microscopia eletrônica.

### 5.2.3. Correlação dos resultados dos testes de difusão em disco simples e a microdiluição em ágar

O teste de microdiluição em ágar BHI é padronizado pelo CLSI (2010) para detectar a concentração de vancomicina que iniba o crescimento bacteriano. Este teste é o mais utilizado atualmente por ser capaz de detectar não só os isolados resistentes à vancomicina como também aqueles que apresentam suscetibilidade intermediária. Para se avaliar a eficácia de detecção de resistência à vancomicina pela difusão em disco simples foi realizada a análise estatística deste em relação ao teste de microdiluição em ágar, avaliando a sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativos e positivos (tabelas 3 e 4), assim como análise do Qui-Quadrado (intervalo de confiança de 95%).

**Tabela 3.** Avaliação da validade do teste de difusão em disco simples em relação à microdiluição em ágar.

Difusão em Disco Simples	Microdiluição em ágar		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	6	14	20
Negativo	2	128	130
Total	8	142	150

**Tabela 4.** Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do teste de difusão em disco simples à vancomicina em *Staphylococcus* spp.

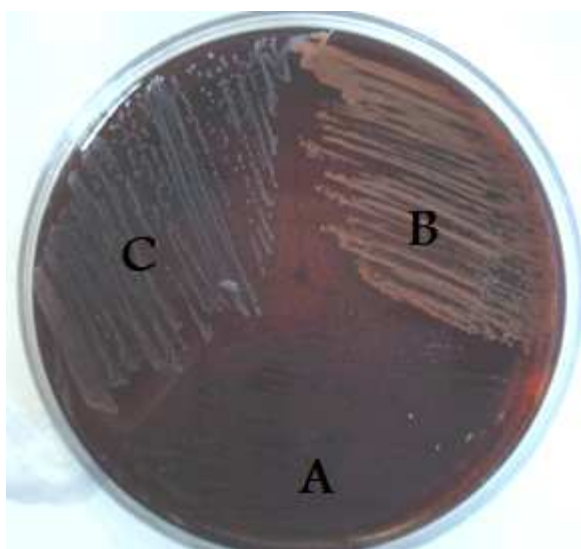
*DDS	<i>Staphylococcus</i> spp.			
	**S	E	VPP	VPN
	75	90,14	30	98,46

\*Difusão em disco simples. \*\* S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo.

O valor da sensibilidade da difusão em disco simples em relação a microdiluição em ágar é atribuído ao fato desta técnica não ser capaz de detectar os isolados com sensibilidade reduzida à vancomicina (CLSI, 2010). Tenover e colaboradores (2001) avaliaram vários métodos de detecção de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina e à teicoplanina. Eles observaram que os métodos de disco em difusão (DD) convencionais com discos de vancomicina não têm capacidade de detectar VISA. Assim, para a detecção acurada destas variantes, é necessário utilizar um método quantitativo que determine a CIM da vancomicina. No entanto, eles sugeriram que a avaliação da diminuição dos halos em torno dos discos de teicoplanina poderia ser um teste útil como método de triagem. No presente estudo, pelo ensaio de DD, foram detectados 14 isolados falso-positivos e 2 isolados falso-negativos. Sendo assim, conforme esperado, o DD não foi capaz de discriminar o real percentual de resistência à vancomicina em relação ao teste de microdiluição em ágar. Porém embora tenha havido divergências quanto aos resultados destes testes, foi encontrado correlação estatística entre eles, a partir da análise do Qui-Quadrado.

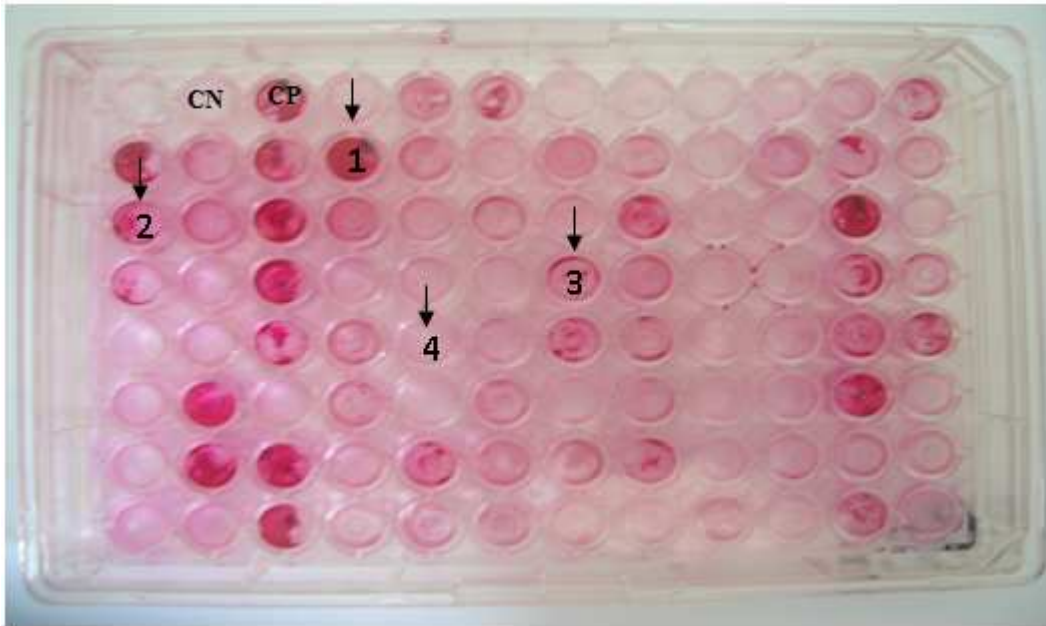
### 5.3. Produção de “slime”

A detecção da produção de slime, com o intuito de avaliar uma possível contribuição à resistência à vancomicina, através do crescimento em ágar vermelho congo (figura 12), obteve 66,66% (100 /150) de isolados positivos. Um dos fatores limitantes desta técnica é que somente é possível fazer uma avaliação qualitativa e não quantitativa das características das colônias, tornando a prova subjetiva, uma vez que existem inúmeras variações de coloração que podem ocorrer desde a cor preta até a vermelha.

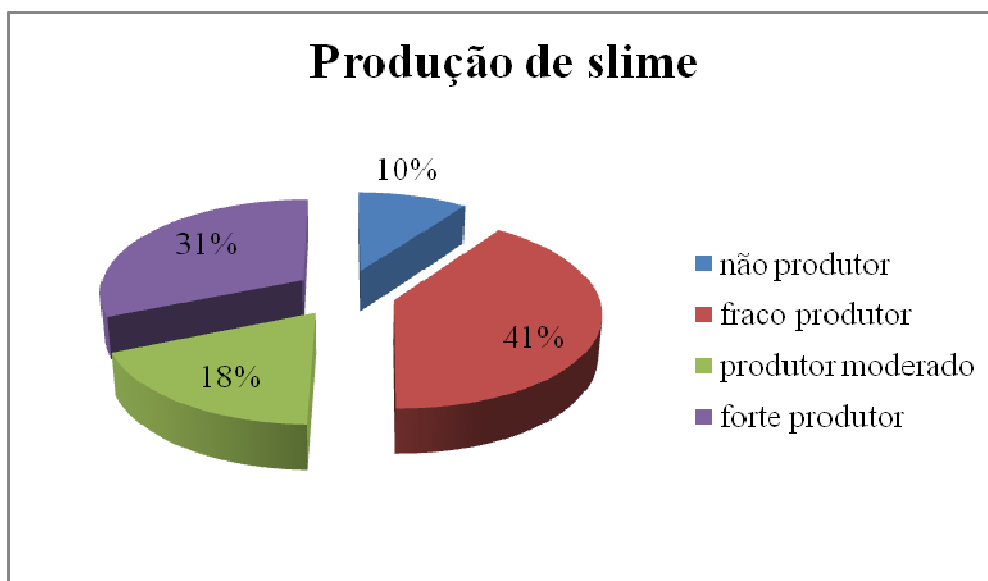


**Figura 12.** Colônias de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina crescidas em ágar Vermelho Congo. **A:** Colônia produtora de “slime” (muito negra); **B:** Colônia negativa para a produção de “slime” (vermelha) e **C:** Colônia quase produtora de “slime” (cinza).

A presença de slime também foi detectada através do teste de aderência em microplacas (figura 13), que permitiu não só avaliar a produção, como também uma variação quantitativa como exposto na figura 14. Segundo Stepanovic e colaboradores (2000) o teste de aderência em placas é um dos métodos usados com maior frequência para quantificar a formação de “slime” produzidos pelos *Staphylococcus* sp, além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos microrganismos. A análise da produção de “slimes” pela aderência em placas demonstrou que, 90% (135/150) das estirpes aderiram à placa e foram consideradas produtoras. Com relação à variação de intensidade de produção de “slime”, esta parece estar relacionada às características fenotípicas próprias dos estafilococos (ARCIOLA et al., 2001).



**Figura 13.** Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina. 1- isolado forte produtor (+++), 2- isolado produtor moderado (++), 3- isolado fraco produtor (+), 4- isolado não produtor (-), CN- controle negativo, CP- controle positivo.



**Figura 14.** Gráfico apresentando o percentual dos diferentes graus de produção de “slime” dos isolados de *Staphylococcus* spp. estudados.

A formação de “slime” pelas bactérias confere uma série de vantagens, tais como, capacidade de resistir aos antimicrobianos, à fagocitose e à ação do sistema complemento, além de aumentar a habilidade de capturar e concentrar nutrientes do ambiente (BROWN et al., 1988; BEVERIDGE et al., 1997). A resistência aos antimicrobianos pode estar relacionada à capacidade do biofilme de atuar como barreira de difusão, a qual minimizaria a penetração das drogas; ou ainda a capacidade de contato entre células, o qual favoreceria a

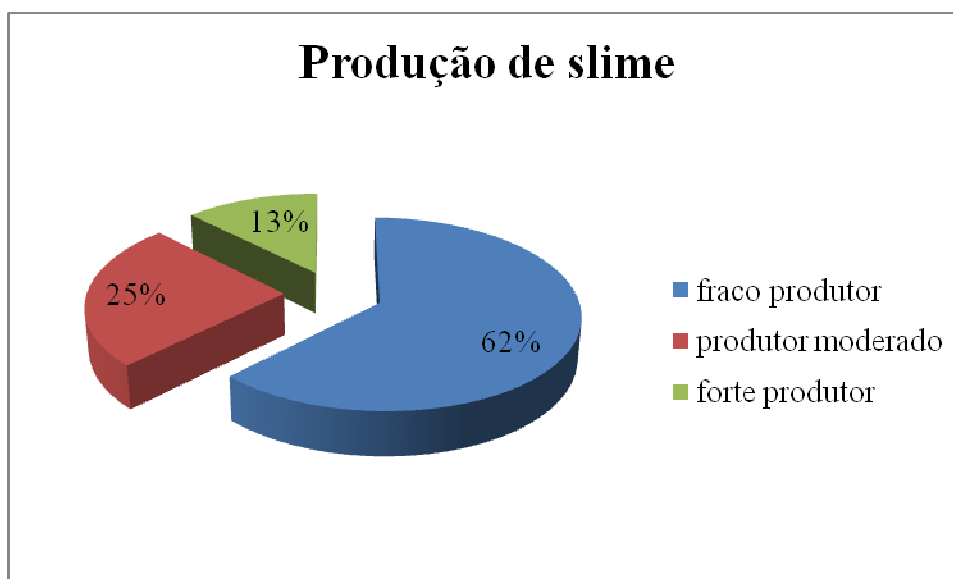
troca de material genético, levando a um aumento da multirresistência (XU et al., 2000; DE ARAÚJO et al., 2006).

Em vários estudos (HANAKI et al., 1998; HIRAMATSU et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2001; ROTUN et al., 1999; SIERADZKI et al., 1999; SMITH et al., 1999) observou-se que a emergência de cepas VISA e hetero-VISA estava associada não apenas a uma longa terapia com vancomicina, mas também com a presença de material plástico invasivo, tal como catéteres venosos, cateteres de diálise, *stents* e válvulas prostéticas do coração. Daí a hipótese de que a formação de biofilme e a adesão ao plástico teriam um efeito protetor para a bactéria na presença de vancomicina, pois a concentração de antibiomicina que atinge as células aderidas é menor do que a concentração que atinge as células soltas (VAN LEEWEN et al., 2000).

Sakoulas e colaboradores (2002) observaram também que duas cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis a vancomicina (VSSA) geneticamente idênticas, exceto pelo locus *agr* - que era perfeitamente funcional em uma, mas não na outra - tinham capacidades de adesão diferentes ao poliestireno, sendo que a que tinha o locus *agr* defeituoso apresentava uma capacidade maior de aderir ao poliestireno. Fora a capacidade de adesão ao poliestireno, observou-se também que a cepa com o locus *agr* defeituoso apresentava uma maior tolerância à vancomicina e uma maior predisposição à emergência de hetero-resistência à vancomicina.

Para avaliar a possível correlação entre a resistência a vancomicina detectada e a presença de slime foi utilizado o teste estatístico de Qui-Quadrado ( $X^2$ ), utilizando o programa R, com um intervalo de confiança de 95%. Devido ao p-valor apresentar um resultado superior a 0,05, considerou-se que as variáveis eram independentes, confirmando a hipótese nula, o que significa que embora 100% dos isolados resistentes à vancomicina pelo teste de microdiluição em ágar tenham apresentado a produção de slime, não houve correlação entre o fenótipo de resistência a vancomicina observado e a detecção de “slime” em microplaca.

As cepas resistentes à vancomicina não apresentaram maior adesão em relação às demais cepas. A figura 15 apresenta o perfil de potencial de produção de “slime” dos isolados que apresentaram o fenótipo de resistência à vancomicina.



**Figura 15.** Gráfico apresentando o percentual dos diferentes graus de produção de “slime” dos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à vancomicina.

As cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina apresentaram uma variabilidade muito grande de adesão. Isto sugere que a capacidade de produção de “slime” não está

relacionada à aquisição de resistência a vancomicina, como sugere Sakoulas e colaboradores (2002), tanto que, se fosse condição vital para a resistência a vancomicina, todas as cepas resistentes apresentariam valores de adesão similares.

Vale ressaltar que dentre as cepas que apresentaram o perfil de forte produtor de “slime” (maior adesão à microplaca), a maioria não tinham o fenótipo de resistência à vancomicina.

#### **5.4. Perfil de suscetibilidade dos *Staphylococcus* spp. às bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp.**

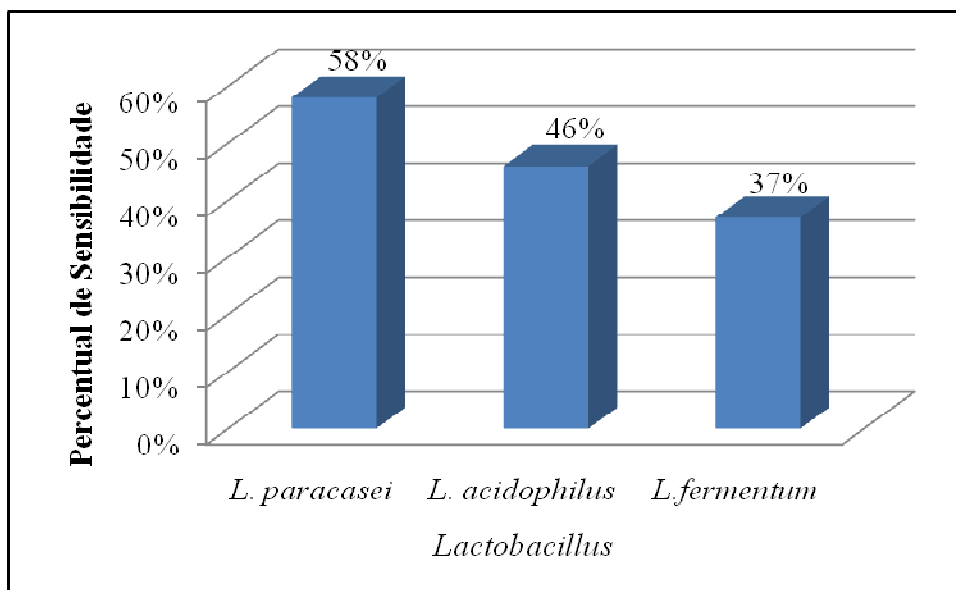
A suscetibilidade as bacteriocinas foi uma etapa realizada com o intuito de detectar a eficácia destas substâncias produzidas por *Lactobacillus* spp. frente aos isolados de *Staphylococcus* spp., em especial, aqueles resistentes à vancomicina.

O teste de suscetibilidade as bacteriocinas foi realizado através da técnica de estrias cruzadas, utilizando os *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* como isolados produtores. Os isolados considerados sensíveis foram aqueles que apresentaram qualquer inibição de crescimento próximo a estria de *Lactobacillus* spp. (figura 16).



**Figura 16.** Teste de suscetibilidade às bacteriocinas. A estria central representa o crescimento do *Lactobacillus* spp. produtor da bacteriocina e as estrias perpendiculares os isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados.

Os percentuais de sensibilidade a ação das bacteriocinas produzidas pelos diferentes *Lactobacillus* spp. testados estão apresentados na figura 17.

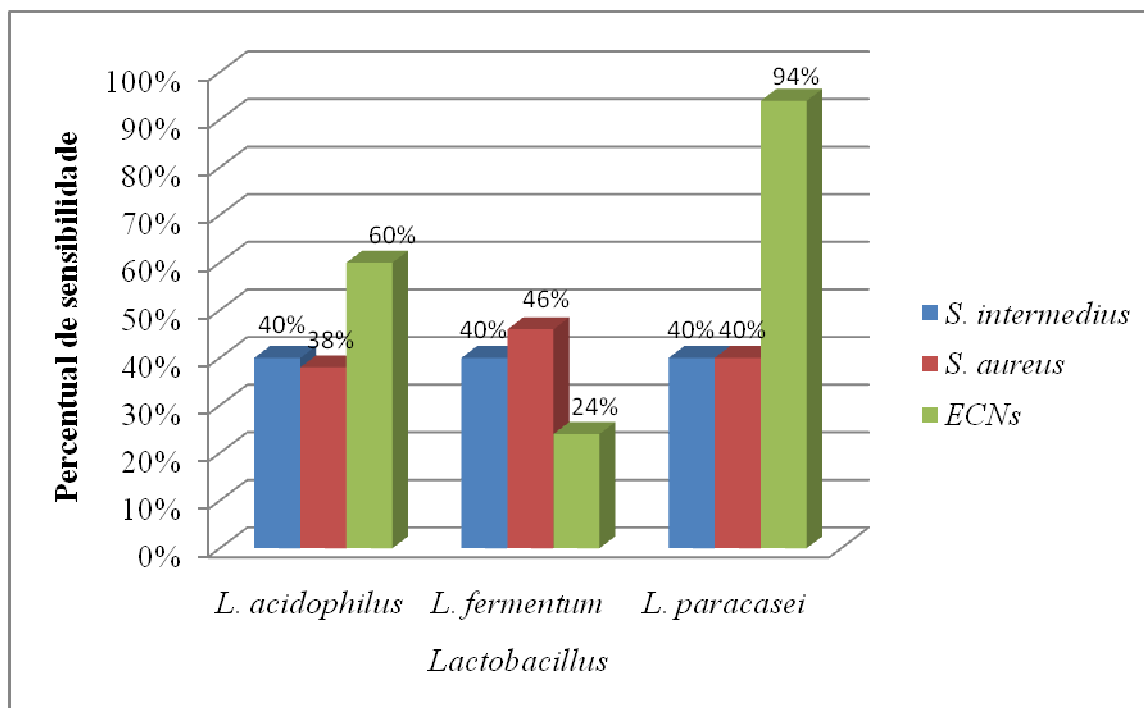


**Figura 17.** Gráfico apresentando o percentual de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de mastite bovina frente as bacteriocinas dos *Lactobacillus* spp. avaliados.

As bacteriocinas que apresentaram maior capacidade de inibição frente aos *Saphylococcus* spp. testados foram as produzidas pelos *Lactobacillus paracasei*, seguidas daquelas produzidas pelos *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum* respectivamente. Essas bactérias são classificadas como bactérias ácido lácticas (BAL) e estão entre as mais utilizadas como probióticos principalmente para consumo humano, sendo conhecidas pela capacidade de produção de bacteriocinas (FARNWORTH, 2001).

A figura 18 apresenta o percentual de sensibilidade as bacteriocinas produzidas pelos diferentes *Lactobacillus* spp. estudados em relação aos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e ECNs avaliados.





**Figura 18.** Gráfico do percentual de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. frente a bacteriocinas produzidas pelos *Lactobacillus* spp. estudados.

Os *Staphylococcus intermedius* apresentaram percentuais de sensibilidade exatamente iguais frente a ambas as bacteriocinas testadas 40% (20/50). De modo semelhante, para *S. aureus*, foi possível observar perfis equivalentes de sensibilidade com pequenas variações percentuais, em 38% (19/50), 40% (20/50) e 46% (23/50). As discrepâncias foram evidenciadas para os ECNs, que variaram de 24%(11/50) , 60% (30/50) a 94% (47/50).

A produção de bacteriocinas é um mecanismo de defesa, no qual cepas bacteriocinogênicas têm vantagem sobre cepas não produtoras e sobre cepas sensíveis as bacteriocinas (VAN DEN BERGHE et al., 2006). Seu mecanismo de ação é através da formação de poros na membrana citoplasmática, o que leva a alteração de seu equilíbrio osmótico, resultando em morte celular (CLEVELAND et al., 2001). Apresentam espectro de atividade amplo ou restrito contra bactérias Gram-positivas (DE VUYST; VANDAMME, 1994), incluindo-se microorganismos patogênicos importantes, como por exemplo, os *Staphylococcus* spp. (HUGAS, 1998).

A tabela 5 apresenta os perfis obtidos de suscetibilidade à bacteriocinas em relação às diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. estudados.

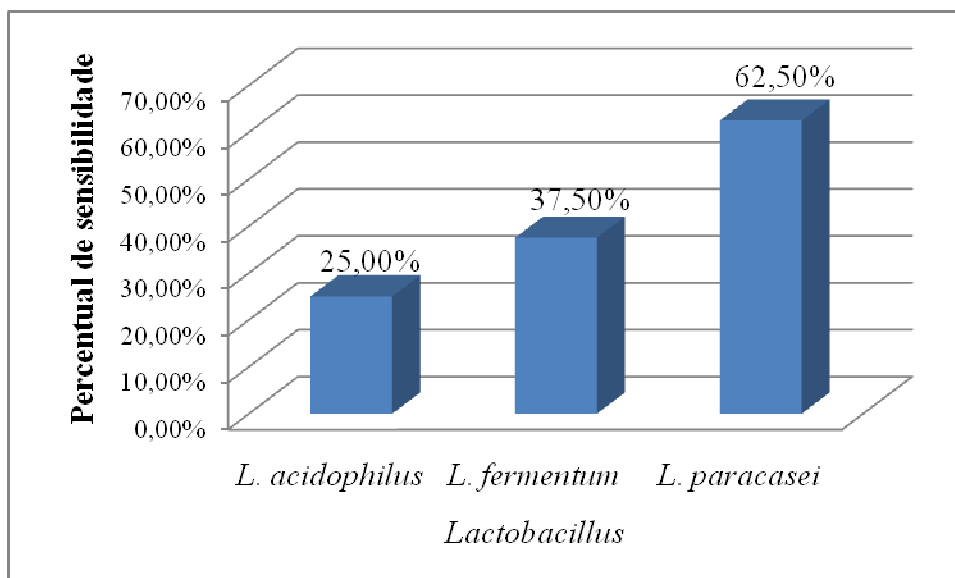
**Tabela 5.** Perfis de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. às bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp. (Bacteriocinotipos).

Perfil	Bacteriocinas com atividade inibitória*	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	**ECNs
		(N=50)	(N=50)	(N=50)
		n (%)	n (%)	n (%)
1	LP <sup>a</sup> , LA <sup>b</sup>	4/(8%)	5/(10%)	16/(32%)
2	S	18/(36%)	21/(42%)	0/(0)
3	LP, LA, LF <sup>c</sup>	8/(16%)	10/(20%)	11/(22%)
4	LP	3/(6%)	3/(6%)	20/(38%)
5	LF	5/(10%)	4/(8%)	0/(0)
6	LP, LF	5/(10%)	2/(4%)	0/(0)
7	LA, LF	5/(10%)	4/(8%)	0/(0)
8	LA	2/(4%)	1/(2%)	3/(8%)

\* Bacteriocinas produzidas pelos seguintes *Lactobacillus*: <sup>a</sup> *Lactobacillus paracasei* (LP); <sup>b</sup> *Lactobacillus acidophilus* (LA); <sup>c</sup> *Lactobacillus fermentum* (LF); S= ausência de sensibilidade a todas as bacteriocinas; \*\* ECNs= estafilococos coagulase negativos.

Os *Staphylococcus* spp. coagulase positivos apresentaram maior percentual no perfil 2, sendo 36% para *S. aureus* (18/50) e 42% em *S. intermedius* (21/50), perfil que representa a ausência de sensibilidade a todas as bacteriocinas testadas, indicando a presença de isolados *Staphylococcus* spp. coagulase positivos, capazes de crescer diante da presença de todas as bacteriocinas testadas. Já os ECNs não apresentaram nenhum isolado com este perfil indicando que todos os isolados foram sensíveis a pelo menos uma destas bacteriocinas testadas. Em relação ao perfil 3 foram detectados percentuais semelhantes em todos os isolados independente da espécie avaliada, o que demonstra que em todas as espécies de *Staphylococcus* spp. avaliadas existem isolados com perfil de sensibilidade a todas as bacteriocinas estudadas. O elevado percentual do perfil 1 em ECNs (32%), e a ausência dos perfis 5, 6 e 7 apontam para o fato que as bacteriocinas produzidas por *L. fermentum* não parecem ser tão eficientes sobre estes isolados.

Embora as bacteriocinas tenham sido, de modo geral, eficientes contra boa parte dos *Staphylococcus* spp. estudados, estas apresentaram um menor percentual de inibição frente aos isolados resistentes à vancomicina (figura 19).



**Figura 19.** Gráfico apresentando o percentual de sensibilidade dos isolados vancomicina-resistentes frente as bacteriocinas produzidas pelos *Lactobacillus* spp. estudados.

Como pode ser observado, os isolados de *Staphylococcus* vancomicina-resistentes apresentaram um baixo percentual de sensibilidade frente a bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* (37,5% e 25%, respectivamente). A eficácia da bacteriocina produzida por *Lactobacillus paracasei* foi bem mais considerável (62,50%) para com os isolados resistentes à vancomicina.

A tabela 6 apresenta os perfis de sensibilidade dos isolados vancomicina-resistentes frente a cada uma das bacteriocinas testadas.

**Tabela 6.** Perfis de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus aureus* e *S. intermedius* vancomicina-resistentes frente as bacteriocinas produzidas pelos *Lactobacillus* spp. estudados.

Perfil	Bacteriocinas com atividade inibitória	<i>S.aureus</i> (N=5)	<i>S. intermedius</i> (N=3)
		n (%)	n (%)
1	LP	2 (40%)	1 (33,33%)
2	LA	1 (20%)	0 (0)
3	LF	0 (0)	2 (66,67%)
4	LP;LA	1 (20%)	0 (0)
5	LP;LF	1 (20%)	0 (0)

\* Bacteriocinas produzidas pelos seguintes *Lactobacillus*: <sup>a</sup> *Lactobacillus paracasei* (LP); <sup>b</sup>*Lactobacillus acidophilus* (LA); <sup>c</sup> *Lactobacillus fermentum* (LF).

Os isolados de *S. aureus* e *S. intermedius* vancomicina-resistentes apresentaram um baixo percentual de sensibilidade frente a bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus acidophilus* com apenas 2 isolados sensíveis (25%) da espécie *S.aureus* e *Lactobacillus fermentum* com 3 isolados (37,5%) sendo 1 *S.aureus* e 2 *S. intermedius*. Tal resultado foi semelhante ao observado para os ECNs frente a estas bacteriocinas. Não foi detectado perfil de sensibilidade as três bacteriocinas estudadas para os isolados vancomicina-resistentes. A

eficácia da bacteriocina produzida por *Lactobacillus paracasei* foi maior frente tanto aos isolados de *S.aureus* quanto *S. intermedius* resistentes à vancomicina.

Esta heterogeneidade de resistência entre as diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. deve-se provavelmente a diferentes quantidades de bacteriocinas produzidas e as diferenças moleculares apresentadas pelas bacteriocinas (PASCUAL et al., 2008). O espessamento da parede celular, um dos prováveis mecanismos de resistência à vancomicina destes isolados pode interferir na ação destas bacteriocinas visto que estas atuam através da formação de poros na membrana plasmática.

## 6. CONCLUSÕES

- A dispersão de mecanismos de resistência a beta-lactâmicos entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp pode ser confirmada pelos significativos percentuais de resistência a esta classe de antimicrobianos entre todos os grupos bacterianos estudados.
- A detecção de percentuais significativos de perfis de resistência a todos os antimicrobianos testados e de perfis de sensibilidade apenas a gentamicina, nos isolados de *S.aureus* e *S. intermedius*, demonstra a circulação de estirpes multidroga-resistentes nas amostras estudadas.
- Todos os isolados resistentes aos glicopeptídeos testados apresentaram-se também resistentes aos betalactâmicos.
- A detecção de perfis de resistência e suscetibilidade reduzida (resistência intermediária) a vancomicina em *Staphylococcus intermedius*, até onde é de nosso conhecimento, nunca foi reportada anteriormente na literatura e merece uma investigação aprofundada do mecanismo envolvido nesse processo.
- A forte semelhança entre os perfis de resistência obtidos para *S. aureus* e *S. intermedius* sugere que estas espécies apresentem suscetibilidade semelhante aos fatores de pressão de seleção para dispersão de genes de resistência, bem como facilidade na transferência interespecífica destes genes.
- Nas buscas efetuadas na literatura não foram encontrados relatos que apontem a presença dos genes *vanA* e *vanB* em isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de origem animal. Estes resultados ressaltam a importância do monitoramento da presença de mecanismos de resistência aos glicopeptídeos em isolados oriundos de amostras de leite, bem como a circulação de genes possivelmente envolvidos nestes mecanismos.
- O significativo percentual de resistência à vancomicina detectado nos isolados de *S. aureus* e *S. intermedius* que não apresentavam os genes *vanA* e *vanB* sugere a ocorrência de um mecanismo passivo de resistência, possivelmente, o espessamento da parede celular bacteriana como vem sendo reportado por diversos autores. Tal hipótese merece uma avaliação criteriosa destes isolados através da técnica de microscopia eletrônica.
- Nos resultados obtidos após análise estatística, as diferenças no grau de produção e a ausência de resistência à vancomicina em alguns isolados produtores de “slime”, demonstram a não existência de uma correlação entre a produção de “slime” e o perfil de resistência à vancomicina.
- A eficácia da bacteriocina produzida por *Lactobacillus paracasei* foi maior frente tanto aos isolados de *S.aureus* e *S. intermedius* resistentes à vancomicina, quanto aos sensíveis, assim como frente aos ECNs.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. **Microbiology Drug Resistance**. v.1, p. 255–257, 1995.

AARESTRUP, F.M.; BAGER, F.; JENSEN, N.E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.C. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). **APMIS**. v. 106, p. 745-770, 1998.

AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; AHRENS, P.; JORGENSEN, J.C.O.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**. v. 74, p. 353-364, 2000.

AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORG, H.D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents Chemoter**. v.45, p. 2054– 2059, 2001.

ABADIA, P.L.; COURVALIN, P.; PERICHON, B. *vanE* gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. **Journal of Bacteriology**. v.184, p. 6457–6464, 2002.

AGUILAR, B.; AMORENA, B.; ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. **Veterinary Microbiology**. v.78, p.183-191, 2001.

AKINEDEN, Ö.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical Diagnostics Laborat Immunol**. v.8, p. 959-964, 2001.

AMORENA, B.; BASELGA, R.; AGUILAR, B. Factors influencing the degree of in vitro bacterial adhesion to ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**. v.24 p.43-53, 1999.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical Microbiology**. v. 39, p. 2151-2156, 2001.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. **Journal of Bacteriology**. v.175, p.117–127, 1993.

ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; MOLINAS, C.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM 4147 confers resistance to teicoplanin. **Gene**. v.154, p.87–92, 1995.

ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends Microbiology**. v.4, p.401-407, 1996.

ARTHUR, M.; DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasm peptidoglycan precursors of glycopeptides-resistant enterococci. **Molecular Microbiology**. v.21, p.33-44, 1996.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.1-63.

BAIOCCHI, S.A.; TOGNIM, M.C.B.; BAIOCCHI, O.C.G.; SADER, H.S. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. **Diagnóstico Microbiologia Infection Disease**. v.45, p.149-152, 2003.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, other catalasepositive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. Wasington: ASM Press, 2003. p. 384-404.

BARBERIS, L.; PÁJARO, M.; ALBESA, I. In vitro inhibition of *Gardnella vaginalis* growth by bacteriocin produced by *Lactobacillus* strains. **Revista Latino Americana de Microbiologia**. v. 36, p.101-106, 1994.

BARRASA, J.L.; GOMEZ, P.L.; LAMA, Z.G. Antibacterial susceptibility patterns of strains isolated from chronic canine otitis externa. **Jornal Medicina Veterinária**. v.47, p.191- 196, 2000.

BASELGA, R.; ALBIZU, I.; DE LA CRUZ, M.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus* implications in colonization and virulence. **Infection Immunology**. v.61, p.4857-4862, 1993.

BEVERIDGE, T.J.; MAKIN, S.A.; KADURUGAMUWA, J.L.; LI, Z. Interactions between biofilms and the environment. **FEMS Microbiology Review**. v.20, p.291-303, 1997.

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

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. Programas de controle das mastites causadas por microorganismos contagiosos e do ambiente. **EMBRAPA-CNPGL**. Juiz de Fora, 1998.

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

BROWN, M.R.; ALLISON, D.G.; GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics, a growth-rate related effect? **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 22, p. 777-780, 1988.

BRUNO, M.E.C.; MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.9, p.3003-3010, 1994.

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

CAMPOS, M. M. C. Avaliação de mastite bovina enfocando o Califórnia Mastitis Test, diagnóstico microbiológico sensibilidade in vitro. Ceará, **Universidade Federal do Ceará**, 2000. 105p.

CARIAS, L.L.; RUDIN, S.D.; DONSKEY, C.J.; RICE, L.B. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a lowaffinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolate. **Journal of Bacteriology**. v.180, p.4426–4434, 1998.

CARMELI, Y.; ELIOPOULOS, G.M.; SAMORE, M.H. Antecedent Treatment with Different Antibiotic Agents as a Risk Factor for Vancomycin-Resistant Enterococcus. **Emergency Infectious Disease**. v.8, p. 134-137, 2002.

CARMINATI, D.; GIRAFFA, G.; BOSSI, M.G. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. v.52, n.9, p.614-617, 1989.

CARVALHO, L.A. Embrapa gado de leite: sistema de produção. Disponível na internet. [www.cnpqgl.embrapa.br/sistema/cerrado.html](http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistema/cerrado.html). Acesso em 16 set. 2009.

CASEY, A.L.; LAMBERT, P.A.; ELLIOTT, T.S.J. Staphylococci. **International Journal Antimicrobial Agents, Amsterdam**. v. 29, p. 23-32, 2007.

CASSETTARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Disease**. v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2 Morb Mortal Wkly Rep. v. 51, p. 565-567, 2002.

CEREDA, R.F. Avaliação do perfil de sensibilidade e caracterização molecular de Enterococcus spp. Isolados em hospitais da América latina. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina 1999. São Paulo/SP.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical of Microbiology Reviews**. v.13, p.686–707, 2000.



CHADWICK, P.R.; WOODFORD, N.; KACZMARSKI, E.B.; GRAY, S.; BARRELL, R.A.; OPPENHEIM, B.A. Glycopeptide-resistant enterococci isolated from uncooked meat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 38, p. 908-909, 1996.

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

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **New England Journal of Medicine**. v.348, p. 1342-1347, 2003.

CHAVERS, L.S.; MOSER, S.A.; BENJAMIN, W.H.; BANKS, S.E.; STEINHAUER, J.R.; SMITH, A.M.; JOHNSON, C.N. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal of Hospital Infection**. v.53, p159-171, 2003.

CHEN, Y.; LUDESCHER, R.D.; MONTVILLE, T.J. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, n.12, p.4770-4777, 1997.

CHIEW, Y.F.; HALL, M.C. Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycosides resistances. **Journal of Hospital Infection**. v.38, p.223-230, 1998.

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

CILANO, L.; ROSSO, D.; BOSSO, M.G. Azione di sostanze inibitrici prodotte da batteri lattici verso microrganismi patogeni. **L'Industria del Latte**. v.27, n.3-4, p.3-20, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2010.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.E.; CHIKINAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. v.71, p.1-20, 2001.

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

- CONLEY, J.; OLSON, M.E.; COOK, L.S.; CERI, H.; PHAN, V.; DAVIES, H.D. Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, p.4043-4048, 2003.
- COSGROVE, S.E.; CARROLL, K.C.; PERL, T.M. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Clinical Infection Disease**. v.39, p.539-45, 2004.
- COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. v. 1, p. 3-9, 1998.
- COSTA, E.O.; BENITIS, N.R.; GUERRA, J.L.; GUERRA, J.L.; MELVILLE, P.A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine**. v.47, p.99-103, 2000.
- CONTRERAS, G.A.; GÓMEZ, C.A.; LEAL, A.L.; GONZÁLEZ, M.J.P.; NAVARRETE, M.L. *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina: una nueva amenaza. **Infectiology**. v.9, n.2, p.91-99, 2005.
- COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infection Disease**. v.42(Suppl. 1), p.S25-S34, 2006.
- CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection Immunology**. v.67, p.5427-5433, 1999.
- CRUPPER, S.S.; IANDOLO, J.J. Purification and partial characterization of a novel antibacterial agent (Bac1829) produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.3171-3175, 1996.
- CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilme formation. **Journal of Bacteriology**. v.183, p.2888-2896, 2001.
- CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H.; HIRAMATSU, K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.44, n.9, p.2276-2285, 2000.
- CUI, L.; MA, X.; SATO, K.; OKUMA, K.; TENOVER, F.C.; MAMIZUKA, E.M. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.1, p.5-14, 2003.
- CUI, L.; IWAMOTO, A.; LIAN, J. Q.; NEOH, H.; MARUYAMA, T.; HORIKAWA, Y.; HIRAMATSU, K. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, n.2, p.428-438, 2006.

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

DAVEY, G.P. Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**. v.16, n.2, p.187-190, 1981.

DE ARAÚJO, G.L.; COELHO, L.R.; DE CARVALHO, C.B.; MACIEL, R.M.; CORONADO, A.Z.; ROZENBAUM, R.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M.; TEIXEIRA, L.A. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **Journal of Antimicrobial Chemother**.v. 57, p. 855-864, 2006.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications**. London : Blackie Academic and Professional, 1994.

DE WEERT, S.H.; VERMEIREN, I.H.; MULDER, I.; KUIPER, N.; HENDRICKX, G.V.; BLOEMBERG, J.; VANDERLEYDEN, R.; DE MOT, Y.B.; LUGTENBERG, J. Flagelladriven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**. v.15, p.1173-1180, 2002.

DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P.E.; COURVALIN, P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.47, p.7-18, 2003.

DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P.; MSADEK, T. A six amino acid deletion, partially overlapping the VanSB G2 ATP-binding motif, leads to constitutive glycopeptide resistance in VanB-type *Enterococcus faecium*. **Molecular Microbiology**. v.50, p.1069-1083, 2003.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms; survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical of Microbiology Reviews**. v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DONNELLY, J.P.; VOSS, A.; WITTE, W.; MURRAY, B.E. Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics, influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 37, p. 389-390, 1996.

EDMOND, M.B. Multidrug-resistant enterococci and the threat of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. In: WENZEL, R.P. **Prevention and control of nosocomial infections**. 3 ed, Baltimore: Williams and Wilkins, 1997. p. 339-55.

EIJSSINK, V.G.H.; BRURBERG, M.B.; MIDDELLHOVEN, P.H.; NES, I.F. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. **Journal of Bacteriology**. v.178, n.8, p.2232-2237, 1996.

ERSKINE, R.J.; EBERHART, R.J. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 196, n. 8, p.1230-1235, 1990.

ERSKINE, R.J.; WALKER, R.D.; BOLIN, C.A.; BARTLETT, P.C.; WHITE, D.G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**. v.85, p.1111–1118, 2004.

EUZÉBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus*, Toulouse 2007. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

FACKLAM, R.R.; CARVALHO, M.G.; TEIXEIRA, L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M.S. **The enterococci-pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, 2002. p.1-54.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**. v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FARIAS, M.F. Terapêutica otológica. In: **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.13-17.

FARNWORTH, E.R. Probiotics and prebiotics. In: WILDMAN, R.E.C. **Handbook of Nutraceutical and functional foods**. 2a ed. London: CRC Press., 2001. p. 407 – 422.

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

FIGUEIREDO, J.B. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa. **Anais do Congresso Brasileiro de Produção Animal**. v.11, p.176-194, 1995.

FLOREY, H.W. The use of microorganisms for therapeutic purposes. **Yale Journal Biology Medicine**. v. 19, p.101-117, 1946.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p.

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

FONSECA, D.A.C. (2005). Dissertação de mestrado. *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina em Montes Claros – MG: Caracterização Microbiológica e Epidemiológica. Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina.

FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F.; BAREILLE, N.; SEEGER, H. Incidence of health disorders in dairy farming systems in Western France. **Livestock Production Science**. v.68, p.157-170, 2001.

FRANZ, C.M.; HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**. v. 47, p. 1–24, 1999.

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

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

FULLER, R. **Probiotics: The Scientific Basis**. Nova York:Chapman & Hall, 1992.

GARNIER, F.; TAOURIT, S.; GLASER, P.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. **Microbiology**. v.146, p.1481–1489, 2000.

GARRITY, G. H.; HOLT, J. G. Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. In: GARRITY, G. H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. Nova York:Springer-Verlag, 2001. p. 427-446.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; GODALY, S.; REBUELTO, M.; DEGREGORIO, O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 1224-1227, 2000.

GOLAN, D.E.; ARMSTRONG, A.W.; ARMSTRONG, E.J.; TASHJIAN, A.H. **Princípios de farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2ª Ed, Boston:Nova Guanabara, 2009.

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

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagénisme entre deux souches de colibacille. **C. R. Seances Society Biology Film**. v. 93, p. 1040-1041, 1925.

GRINHOLC, M.; WEGRZYN, G.; KURLENDÁ, J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. **FEMS Immunology of Medical Microbiology**. v. 50, p. 375-379, 2007.

HANAKI, H.; LABISCHINSKI, H.; SASAKI, K.; KUWAHARA-ARAI, K.; INABA, Y.; HIRAMATSU, K. Mechanism of vancomycin resistance in MRSA strain Mu50. **Japanese Journal of Antibiotics**. v.51, n.3, p.237-247, 1998.

HANCOCK, R. E. Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infection Disease**. v. 1, p. 156-164, 2001.

- HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; KLAENHAMMER, T.D. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. v.52, n.6, p.384-387, 1989.
- HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In: RILEY, M.A.; CHAVAN, M.A. **Bacteriocins: ecology and evolution**. New York: Springer, 2007. p. 45-83.
- HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.40, p.135-146, 1997.
- HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**. v.350, p.1670-1673, 1997.
- HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in staphylococci. **Drug Resistance Updates**. v. 1, p. 135-150, 1998.
- HIRAMATSU, K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 42, p.199-209, 1998.
- HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**. v.1, p.147-155, 2001.
- HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Sci**. v.49, p.1537-1542, 1998.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Molecular Biology Reviews**. v.59, p.171-200, 1995.
- JOHN, M.A.; PLETCH, C.; HUSSAIN, S. In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telitromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 50, p. 933-938, 2002.
- JONG, S.K.; GONG, S.K.; CHUNG, H.K.; DAE, S.H. Dairy-cattle health in Gyeongnam, Korea. **Preventive Veterinary Medicine**. v.52, pp. 163-169, 2001.
- KAISER, A.L.; MONTVILLE, T.J. The influence of PH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. **Journal of applied Microbiology**. v.75, p.536-540, 1996.
- KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.7, p.1955-1963, 2001.

KIM, M.N.; PAI, C.H.; WOO, J.H.; RYU, J.S.; HIRAMATSU, K. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.10, p.3879-3881, 2000.

KIRK, M.; HILL, R.L.; CASEWELL, M.W.; BEIGHTON, D. Isolation of vancomycin-resistant enterococci from supermarket poultry. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 418, p. 289–291, 1997.

KLARE, I.; HEIER, H.; CLAUS, H.; BÖHME, G.; MARIN, S.; SEITMANN, G.; ATANASSOVA, V.; WITTE, W. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and faecal samples of humans in the community. **Microbiology Drug Resistance**. v. 1, p. 265-272, 1995.

KLARE, I.; HEIER, H.; CLAUS, H.; REISSBRODT, R.; WITTE, W. vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. **FEMS Microbiology Letters**. v.125, p.165-172, 1995.

KLEIN, G.; PACK, A.; REUTER, G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. **Applied and Environment Microbiology**. v.64, p.1825–1830, 1998.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Staphylococcus and Micrococcus. In: MURRAY, P.A.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 7<sup>a</sup>ed. Washington: ASM Press, 1999. p.264-277.

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

KOJIC, M.; SVIRCEVIC, J.; BANINA, A.L; TOPISIROVIC, K. Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, n.6, p.1835-1837, 1991.

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

KRUSE, H.; JOHANSEN, B.K.; RØRVIK, L.M.; SCHALLER, G. The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus* species in Norwegian poultry and swine production. **Microbiology Drug Resistance**. v. 5, p. 135–139, 1999.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. v.357, n.9264, p.1225-1240, 2001.

LANGENEGGER, J.; VIANI, M.C.E.; BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.1, p. 47-52, 1981.

LANGONI, H. Complexidade etiológica na mastite bovina. **Anais do III Encontro de Pesquisadores em Mastites**.v.3, p 13-16, 1999.

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

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; LAZZARONI, S.; CORSETTI, A.; GOBBETTI, M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p.4084-4090, 2000.

LECLERQ, R.; COURVALIN, P. Resistance to glycopeptide in enterococci. **Clinical Infectious Diseases**. v.24, p.545-556, 1997.

LEME, I.L.; PIANTINO, A.J.; PIGNATARI, A.C. Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**. v.31, p.53-57, 2000.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.16, n.1, p.3-10, 2000.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**. v.339, p.520-32, 1998.

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

LU, P.L; CHING, L.C.; PENG, C.F.; CHIANG, Y.H.; CHEN, T.P.; MA, L.; SIU, L.K. Risks factors and molecular analysis of community methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.1, p.132-139, 2005.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan, purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**. v. 178, p. 175-183, 1996.

MACK, D. ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J. K. M.; ELSNER, H. A.; FEUCHT, H. H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 3799-3807, 2000.

MANDELL, G.L., PETRI, W.A. Antimicrobial agents: Penicilins, cefalosporins, and others  $\beta$ -lactam antibiotics. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gliman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics**. 9 ed. Rio de Janeiro:McGRAWHILL, 1996.

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**. 32<sup>a</sup> ed. China:Pharmaceutical Press, 1999.



MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**. v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MCMULLEN, L.M.; STILES, M.E. Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal of Food Protection**. v. 73, p.64-71, 1996.

MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A.; SOUSA, M.I.; EURIDES, D.; LANGONI, H. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias**. v. 5, p. 107-118, 1999.

MIRLEAU, P.; DELORME, S.; PHILIPPOT, L.; MEYER, J.M.; MAZURIER, S.; LEMANCEAU, P. Fitness in soil land rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. **FEMS Microbiology Ecology**. v.34, p.35-44, 2000.

MOHR, J.; MURRAY, B.E. Vancomycin is not obsolete for the treatment of infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infection Disease**. v. 44, p. 1536-1542, 2007.

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

MOREIRA, B.; BOYLE-VARVRA, S.; DE JONGE, B. L. M.; DAUM, R. S. Increased production of penicilin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptides resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, p. 1788-1793, 1997.

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **New England Journal Medicine**. v. 342, p.710-721, 2000.

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

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard, 2nd ed. **National Committee for Clinical Laboratory Standards** document M31-A2. NCCLS, Wayne, PA. 2002.

NAVARRO, F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding d-alanine-d-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.38, p.1788-1793, 1994.

NICAS, T.I.; COLE, C.T.; PRESTON, D.A. Active of glycopeptides against vancomycin-resistant Gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.39, p.1477-1481, 1989.

NOBLE, W.C.; VIRANI, Z.; CREE, R.G. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.72, p.195–198, 1992.

NOSKIN, G.A.; RUBIN, R.J.; SCHENTAG, J.J.; KLUYTMANS, J.; HEDBLUM, E.C.; SMULDERS, M.; LAPETINA, E.; GEMMEN, E. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States. **Archives of Internal Medicine**. v. 165, pp. 1756–1761, 2005.

O'GARA, J.P. *ica* and beyond, biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS. Microbiology Letters**. v. 270, p. 179-188, 2007.

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

OLIVEIRA, G.A.; LEVY, C.E.; MAMIZUKA, E.M. Estudo do perfil de resistência de 626 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de 25 hospitais brasileiros entre setembro de 1995 e junho de 1997. **Jornal Brasileiro de Patologia**. v.36, p.147-56, 2000.

OLIVEIRA, G.A.; DEI'AQUILA, A.M.; MASIERO, R.L.; LEVY, C.E.; GOMES, M.S.; CUI, L. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control Hospital Epidemiology**. v.22, n.7, p.443-448, 2001.

OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; SOUZA, M.I.; SÁ, M.E.P. Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro* frente a amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de mastite subclínica bovina, no Agreste meridional de Pernambuco. **Hora Veterinária**. v.22, n.127, p.8-10, 2002.

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.66, p.86-92, 2002.

OPLUSTIL, C. P. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

PALAZZO, I.C.V.; CAMARGO, .L.B.C.; ZANELLA, R.C.; DARINI, A.L.C. Evolution of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with vanA plamids. **Fems Microbiology Letters**. v. 58, p.29-36, 2006.

PALMER-TOY, D.E. Therapeutic Monitoring of Vancomycin. **Archive of Pathological Medicine**. v.124, p.322-323, 2000.

PARKER, M.T.; JEVONS, M.P. A survey of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Postgraduate Medical Journal**. v. 40, pp. 170–178, 1964.

PASCUAL, L.M. ; DANIELE, M.B. ; GIORDANO, W. ; PÁJARO, M.C. ; BARBERIS, I.L. Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. **Current Microbiology**. v.56, p. 397–402, 2008.

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

PERICHON, B.; COURVALIN, P. Synergism between beta-lactams and glycopeptides against vanA-type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and heterologous expression of the vanA operon. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.50, p.3622–3630, 2006.

PLOY, M.C.; GRELAUD, C.; MARTIN, C.; DE LUMLEY, L.; DENIS, F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. **Lancet**. v.35, n.9110, p.1212, 1998.

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

PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v. 9, p. 48-59, 2003.

QUEDNAU, M.; AHRNE, S.; PETERSSON, A.C.; MOLIN, G. Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, p. 1163–1170, 1998.

QUINTILIANI, R.; COURVALIN, P. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. **FEMS Microbiology Letters**. v.119, p.359–363, 1996.

R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RABELLO, R.F.; SOUZA, C.R.V.M.; DUARTE, R.S.; LOPES, R.M.M.; TEIXEIRA, L.M.; CASTRO, A.C.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Dairy Science**. v. 88, p. 3211-3219, 2005.

RAGG, M. 1999. Worldwide ban on chicken antibiotic. Disponível em : <<http://www.promedmail.org>> Acessado em 21 de Dezembro de 2010.

REIPERT, A.; EHLERT, K.; KAST, T. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n. 2, p.568- 576, 2003.

REYNOLDS, P.E.; COURVALIN, P. Vancomycin resistance by synthesis of precursors terminating in d-alanyl-d-alanine. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.49, p. 21-25, 2005.

RICARDO, S.B. Elevação de MIC para Vancomicina no *S. aureus*. **Prática Hospitalar**. n.60, p. 43-45, 2008.

RICE, L.B.; CARIAS, L.L.; DONSKEY, C.L.; RUDIN, S.D. Transferable, plasmidmediated *vanB*-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents Chemother.** v. 42, p. 963-964, 1998.

RICHARDSON, D. Probiotics and products innovation. **Nutrition and Food Science.** v.4, p.27-33, 1996.

RILEY, M.A.; PINOU, T.; WERTZ, J.E.; TAN, Y.; VALLETA, Y.C.M. Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. **Plasmid.** v.45, p.209-221, 2001.

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

RODRÍGUES, C.A.; VESGAS, O. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. **Biomédica.** v.25, n.4, p.575-587, 2005.

ROTUN, S.S.; MCMATH, V.; SCHOONMAKER, D.J. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. **Emerging Infection Diseases.** v.5, p.147-149, 1999.

SAADOUN, I.; AL-MOMANI, F.; MALKAWI, H.I.; MOHAMMAD, M.J. Isolation, identification and análisis of antibacterial activity of soil streptomycetes isolates from north Jordan. **Microbios.** v.100, p.41-46, 1999.

SAHA, B.; SINGH, A.K.; GHOSH, A.; BAL, M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). **Journal of Medical Microbiology.** v. 57, p. 72-79, 2008.

SAHL, H.G.; BIERBAUM, Y.G. LANTIBIOTICS: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. **Annual Review Microbiology.** v.52, p.41-79, 1998.

SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** v.46, p.1492-502, 2002.

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

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews.** v. 61, n.3, p. 91-99, 2003.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.130, p.199-207, 1957.

SCOTT, G.M.S. **Combating vancomycin resistance in enterococci**: Modern Management Strategies. Surrey:Synergy House, 2000.

SEGUIN, J.C.; WALKER, R.D.; CARON, J.P.; KLOOS, W.E.; GEORGE C.G.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. **Journal Clinical Microbiology**. v. 37, p. 1459-1463, 1999.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science e Technology**. v.10, n.12, p. 411-417, 1999.

SHUHAIBAR, M.N.; FALKINER, F.R. The prevalence, antibiotic susceptibility and phage-type of nasally carried *Staphylococcus aureus* in the Dublin community. **Iranian Journal of Medical Sciences**. v.161, n.10, p.589, 1992.

SIERADZKI, K.; ROBERTS, R.B.; HABER, S.W.; TOMASZ, A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. **New England Journal of Medicine**. v.340, p.517-523, 1999.

SILVA, W.P., SILVA; A.J., MACEDO, M.R.P., ARAÚJO, M.R., MATA, M.M.; GANDRA, E.A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34 (Supl.1) p.125-127, 2003.

SMITH, T.L.; PEARSON, M.L.; WILCOX, K.R.; CRUZ, C.; LANCASTER, M.V.; DUNN, B.R. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **New England Journal of Medicine**. v.340, n.7, p.493-501, 1999.

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

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

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

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

STEPHAN, R.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**. v. 78, p. 373-382, 2001.

STEWART, P.S.; CONSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**. v. 358, p. 135-138, 2001.

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

TAGG, J. R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteria Review**. v.40, p.722-756, 1976.

TAHNKIWALE, S.S; ROY, S.; JALGAONKAR, S.V. Methicillin resistance among isolates of *Staphylococcus aureus*: antibiotic sensitivity pattern & phage typing. **Archives of Internacional Medicine**. v.56, n.7, p.330, 2002.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2002.

TENOVER, F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER, M.V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emergency Infection Disease**. v.7, p.327–332, 2001.

TIWARI, H.K.; SEN, M.R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infection Disease**. v. 6, n. 156, 2006.

TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; CAGANT, D.A.; LUND, A. Characterization of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. **APMIS**. v. 108, p. 565-572, 2000.

TRABULSI, L. R ; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia. Staphylococcus aureus**. São Paulo: Atheneu.v. 20, p. 175-182, 2005.

TRAKULSOMBOON, S.; DANCHAIVIJITR, S.; RONGRUNGRUANG, Y.; DHIRAPUTRA, C.; SUSAEEMGRAT, W.; ITO, T. First Report of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, n.2, p.591-595, 2001.

TSIODRAS, S.; GOLD, H.S.; SAKOULAS, G.; ELEIPOULOS, G.M.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; MOELLERING, R.C.; FERRARO, M.J. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. v. 358, p. 207–208, 2001.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**. v. 40, n.7, p. 543-567, 1990.

VAN DEN BERGHE, E.; DE WINTER, T.; DE VUYST, L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature- and Ph-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **International Journal of Food Microbiology**. v. 107, p. 159-170, 2006.

- VAN DEN BRAAK, N.; VAN BELKUM, A.; VAN KEULEN, M.; Vliegenthart, J.; VERBRUGH, H.A.; ENDTZ, H.P. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, p. 1927–1932, 1998.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. v.92, p.179-185, 2003.
- VERHEUL, A.; RUSSELL, N.J.; HOF, R.V.; ROMBOOTS, F.M.; ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisinresistant *Listeria monocytogenes* Scott A. **Applied and Environmental Microbiology**.v.63, n.9, p.3451- 3457, 1997.
- VINTOY, J.; AARESTRUP, F.M.; ZINN, C.E.; OLSEN, J.E. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary Microbiology**. v.95, p.133–147, 2003.
- VOUNG, C.; SAENZ, H. L.; GOTZ, F.; OTTO, M. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infective Disease**. v. 182, n.6, p. 1688-1693, 2000.
- XU, K.D.; MCFETERS, G.A.; STEWART, P.S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**. v.146, p.547-549, 2000.
- WALSH, T.R.; HOWE, R.A. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review Microbiology**. v.56, p.657-675, 2002.
- WEGENER, H.C.; MADSEN, M.; NIELSEN, N.; AARESTRUP, F.M. Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. **International Journal of Food Microbiology**. v. 35, p. 57–66, 1997.
- WOODFORD, N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. **Journal of Medicine Microbiology**. v.47, p.849-862, 1998.
- YALCIN, C.; STOTT, A.W.; LOGUE, D.N.; GUNN, J. The economic impact of mastitis-control procedures used in Scottish dairy herds with high bulk-tank somatic-cells counts. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 41, p. 135-149, 1999.
- ZADOKS, R.; LEEUWEN, W.; BARKEMA, H.; SAMPIMON, O.; VERBRUGH, H.; SCHUKKEN, Y.H.; VAN BELKUM, A. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal Clinical Microbiology**. v. 38, p. 1931-1939, 2000.
- ZADOKS, R.N.; VAN LEEUWEN, W.B.; KREFT, D.; FOX, L.K.; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal Clinical Microbiology**. v.40, p. 3894-3902, 2002.

ZHU, W.; CLARK, N.C.; MCDUGAL, L.K.; HAGEMAN, J.; MCDONALD, L.C.; PATEL, J.B. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Inc18-Like *vanA* Plasmids in Michigan. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v.52, n.2, p.452-457, 2008.

ZHU, M.; CLARK, N.; PATEL, J.B. Conjugal transfer of vancomycin resistance from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. **48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Resumo C2-269, 2008.



## ANEXO

Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado ( $X^2$ ). Com intervalo de confiança de 95%.

1. Teste de correlação entre os métodos de difusão em disco e microdiluição em ágar

### **Pearson's Chi-squared test**

**data: tabela1**

**X-squared = 49.3189, df = 2, p-value = 1.952e-11**

2. Teste de correlação entre a produção de slime e a resistência à vancomicina pelo teste de microdiluição em ágar

### **Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction**

**data: tabela1**

**X-squared = 1.458, df = 1, p-value = 0.2272**