

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

TESE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA À
OXACILINA EM *Staphylococcus* spp. COAGULASE-
POSITIVOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA.**

Shana de Mattos de Oliveira Coelho

2008



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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA À OXACILINA EM
Staphylococcus spp. COAGULASE-POSITIVOS ISOLADOS DE
MASTITE BOVINA.**

SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

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

Seropédica, RJ
Dezembro de 2008

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

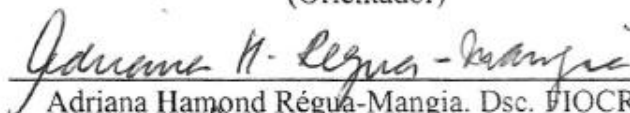
SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO

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

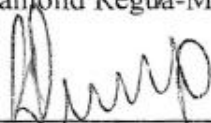
TESE APROVADA EM 18/12/2008.



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



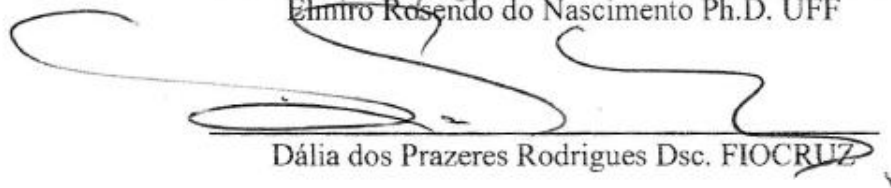
Adriana Hamond Régua-Mangia. Dsc. FIOCRUZ



José Procopio Moreno Senna Ph.D. FIOCRUZ



Elmiro Rosendo do Nascimento Ph.D. UFF



Dália dos Prazeres Rodrigues Dsc. FIOCRUZ

**Ofereço este trabalho a
todos aqueles que eu amo
e à minha querida
Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro.**

AGRADECIMENTOS

“Posso enfrentar o que for, eu sei quem luta por mim. Seus planos não podem ser frustrados. Minha esperança está nas mãos do grande Eu Sou, meus olhos vão ver o impossível acontecer!!”

Te agradeço Deus porque sei que ouvirdes as minhas súplicas. Esta tese só foi possível graças a Ti que esteve comigo em cada experimento, fazendo funcionar, me ensinando o caminho quando algo saía errado, me dando esperança quando tudo parecia perdido e me dando inteligência e sabedoria para fazer tudo acontecer. Obrigada por ter me dado todas as oportunidades que recebi, por multiplicar o meu tempo, por me dar força todos os dias para ir trabalhar apesar do cansaço e por colocar no meu caminho pessoas que foram fundamentais para a realização deste sonho.

Aos meus pais e meus irmãos que sempre foram o meu porto seguro, que torceram se orgulhando muito a cada etapa vencida, vibrando como se fosse um passo dado por eles também. E isso é uma verdade: essa vitória é de vocês e nada seria possível se não fosse pela educação e pelo lar que vocês me deram. Amo fazer parte dessa família e agradeço a Deus todos os dias por isso.

A minha orientadora MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA. Acho que vou passar o resto da minha vida te agradecendo pelas oportunidades que você me apresentou, pelas palavras duras que foram necessárias, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos ensinamentos e por ser o modelo de profissional que eu sempre quis seguir. A minha amada irmã em Cristo, saiba que agradeço ao nosso Pai por você ter surgido na minha vida. Palavras são muito pouco para expressar o quanto você significa pra mim, o quanto eu te respeito e te admiro. Sei que Deus tem planos maravilhosos para uma vida em equipe juntas e estarei sempre disposta a retribuir tudo o que você fez por mim.

As minhas companheiras de laboratório, amigas confidentes e irmãs em Cristo INGRID ANNES PEREIRA e LIDIANE DE CASTRO SOARES, que sempre

estiveram do meu lado, que deram todo o suporte no laboratório quando eu comecei a ministrar nas faculdades, que me deram ânimo quando parecia que eu ia fraquejar, que me deram amor quando eu me senti triste, que me fizeram rir em momentos em que eu queria chorar e que foram mais que irmãs, foram companheiras e leais. Muito bom fazer parte de um time em que não há competições, inveja nem intrigas. Fazemos um quarteto de Deus e sabemos o quanto Ele tem nos abençoado.

Ao GUSTAVO L. PEIXOTO, meu amor, que chegou na fase final desta etapa tão importante e que estando ao meu lado todos os dias me fez ver a vida de uma forma totalmente nova e maravilhosa. Obrigada pelo apoio, pela paciência, pelos conselhos, pelos carinhos nos momentos certos e pelo seu amor.

Aos meus queridos estagiários do Laboratório de Bacteriologia. Tenho certeza de que um dia vocês vão me entender...hoje estou colhendo os frutos de tantas noites mal dormidas e, que geraram dias em que eu não pude dar-lhes atenção suficiente. E por isso meu agradecimento por todo suporte que vocês me deram na minha bancada vem com pedidos de desculpa pela ausência e falta de atenção que vocês mereciam. Dedico essa conquista a vocês na esperança de ter cultivado uma semente e que essa experiência de trabalho possa ter contribuído para suas futuras escolhas profissionais. Obrigada por tudo e contem sempre comigo. Meus agradecimentos especiais e cheios de orgulho aos meus alunos FERNANDO MARQUES, HOSANA DAU, MARINNA CRUZ e ANA LUISA DE MATTOS que me ajudaram no meu experimento e tomaram para si pequenas responsabilidades dele. Bom saber que geramos frutos juntos e que eu posso ver em vocês a continuação do que eu fui um dia.

Aos meus amigos BRUNO “WALLY” GOMES DE CASTRO e MARCELO SANTOS DE OLIVA que fizeram os meus dias serem mais engraçados e descontraídos. Obrigada pelo apoio e incentivo de sempre.

A todos os meus amigos e familiares que me incentivaram e entenderam minha ausência em algumas ocasiões por causa da minha trajetória. Em especial à CLÉIA CUNHA que sempre se mostrou muito prestativa.

Ao Dr. CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA e Dra. ANA DALCERO por terem me incentivado e possibilitado a minha ida à UNIVERSIDADE NACIONAL DE RIO CUARTO (UNRC) através do projeto CAPES-SECYT. À Dra. MIRTA DEMO, CRISTINA BOGNI e ELINA REINOSO que me orientaram no período em que estive lá e a todos os pesquisadores dos Laboratórios de Microbiología y Imunología, Genética Molecular y Bacteriología, que além de terem me ensinado muito da metodologia que foi desenvolvida na tese, foram meus amigos e os grandes responsáveis pelos seis meses em que eu passei lá terem passado tão rápido. *Inolvidable...*

A todos que fazem parte da UNIVERSIDADE SEVERINO SOMBRA e FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DOM ANDRÉ ACOVERDE que me apoiaram nos momentos em que eu precisei. Em especial, um agradecimento aos meus queridos alunos que torceram muito por mim e se orgulhavam com cada etapa vencida. Vocês fizeram tudo ficar mais fácil.

Aos pesquisadores da EMBRAPA-AGROBIOLOGIA, em especial ao Dr. JEAN LUIZ SIMÕES DE ARAÚJO, ALINE MATOS e PATRÍCIA GITAHY que sempre estiveram dispostos a me ajudar e, ao Dr. JOSÉ IVO BALDANI que abriu as portas do Laboratório de Bioquímica e possibilitou o começo de tudo o que envolve a Biologia Molecular.

À Dra. ADRIANA HAMOND RÉGUA-MANGIA e ROSE MARY do Laboratório de Epidemiologia Molecular da ENSP-FIOCRUZ que em muito contribuíram nesta etapa final da tese.

Ao Dr. JOSÉ PROCÓPIO MORENO SENNA que me ajudou, mesmo à distância e sem me conhecer, na técnica de extração de DNA bacteriano.

Aos médicos veterinários que mediaram a coleta das amostras de leite e aos proprietários que permitiram que este experimento acontecesse.

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, em especial no Laboratório de Biologia Molecular.

Aos funcionários do INSTITUTO DE VETERINÁRIA, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto, em especial a GILBERTO FLAUSINO, pela sua paciência e colaboração.

Agradeço à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pela bolsa cedida durante o período do doutorado sanduíche e ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (Cnpq), pela bolsa agraciada durante os dois primeiros anos de doutorado. E a FUNDAÇÃO CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) pelo apoio em equipamentos utilizados no Laboratório de Biologia Molecular e em projetos que nos foram contemplados.

BIOGRAFIA

Shana de Mattos de Oliveira Coelho, filha de Delgi de Oliveira Coelho e Maria Letícia de Mattos de Oliveira Coelho, nascida em 04 de janeiro de 1980, no município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o primário, ensino fundamental, parte do ensino médio no Colégio Verbo Divino em Barra Mansa e o último ano do 2º grau no Colégio e Pré-vestibular ACAE em Volta Redonda.

No ano de 1999 ingressou no Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, na Universidade Severino Sombra em Vassouras – RJ, diplomando-se em janeiro de 2003.

Foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2003, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista de pós-graduação do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2003 a fevereiro de 2005.

Em 2005, foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob orientação da Professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza.

Durante os meses de dezembro de 2005 a junho de 2006 realizou doutorado sanduíche na Universidad Nacional de Rio Cuarto-Argentina, pelo projeto CAPES/SECYT, sob orientação das Dras. Mirta Demo, Cristina Bogni, Lucila Barberis e Elina Reinoso.

Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) durante o período de março a dezembro de 2005 e julho de 2006.

Em agosto de 2006 tornou-se parte integrante do corpo docente da Universidade Severino Sombra em Vassouras-RJ, ministrando a disciplina de Microbiologia para os cursos de Medicina Veterinária, Ciências Biológicas e Odontologia. Hoje, seu magistério estende-se também aos cursos de Biomedicina e Farmácia.

Em julho de 2007 integrou-se no corpo docente da Fundação Educacional Dom André Arcoverde onde ministra as disciplinas de Microbiologia Veterinária I e II para o curso de Medicina Veterinária.

RESUMO

COELHO, Shana de Mattos de Oliveira. **Caracterização fenotípica e genotípica de fatores de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina.** 77 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

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

O presente estudo foi conduzido para caracterizar feno-genotipicamente os fatores de virulência e perfil de resistência aos antibióticos, especificamente à oxacilina, de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de amostras de leite de vacas com mastite. Do total de 150 isolados, foram identificadas as espécies *S.aureus*, *S.intermedius* e *S.hyicus*. O teste de suscetibilidade antimicrobiana revelou elevada resistência à penicilina e ampicilina e distintos antibiótipos foram identificados, sendo o de sensibilidade a todos os antibióticos o prevalente. Um total de 94,6% e 70,7% foi positivo para a produção de betalactamases e presença do gene *mecA*, respectivamente. O gene *femA* foi detectado em 80,9% dos isolados *mecA* positivos. Os isolados apresentaram distintos padrões de crescimento nos testes de suscetibilidade à oxacilina. Os testes de ágar “screen” e a avaliação da microdiluição em placa, apresentaram valores consideráveis de sensibilidade e especificidade quando os isolados foram considerados como um único grupo (*Staphylococcus* spp coagulase-positivos) ou quando as espécies foram discriminadas, respectivamente. A adição de 4% de NaCl no meio de cultura pode ter efeito no aumento da sensibilidade do teste de difusão em disco utilizando o disco de oxacilina e o teste de difusão em disco apresentou melhor capacidade na detecção dos isolados resistentes à oxacilina com discos de cefoxitina. Um total de 80% dos *S.aureus* foi classificados como MRSA e apresentaram resistência superior a 15% à associação de ampicilina e sulbactam, vancomicina e gentamicina. Quanto aos fatores de virulência, a técnica da microplaca revelou 82,8% de isolados produtores de “slime” e a intensidade da produção não foi associada à presença dos genes *icaA* e *icaD*. Em adição, o ágar contendo vermelho congo apresentou eficácia na detecção do isolados não produtores de “slime”. Em todos os isolados hemolíticos foi detectada a beta hemolisina e 11,3% dos não-hemolíticos produziram hemolisinas na presença da cepa beta-hemolítica, indicando a presença da delta hemolisina. Foram realizadas as amplificações dos genes *spaA*, *coa* e *agr* em todos os *S.aureus*. O gene *spaA*, que codifica a região X, foi positivo em todos isolados, revelou um único amplicon para cada isolado e apresentou polimorfismo sendo o tamanho prevalente o de 315pb. A amplificação do gene *coa* apresentou três tipos polimórficos distintos, com único amplicon para cada isolado e o perfil prevalente foi o de 900 bp. A amplificação do gene *agr* resultou em amplicons com 350 e 550 pb em 74% dos isolados. A prova de biotipificação revelou o ecovar bovino como o prevalente nos *S.aureus*. Foram identificados 7 *S.aureus* que apresentaram os mesmos perfis dos genes *coa*, *spaA*, *agr*, antibiótipos e ecovares, sendo 4 pertencentes mesma propriedades e 3 provenientes de propriedades distintas.

ABSTRACT

COELHO, Shana de Mattos de Oliveira. **Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors and oxacillin resistance in *Staphylococcus* spp. coagulase-positives isolated from bovine mastitis.** 77 p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

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

The present study was done to characterize phenotypic and genotypically the virulence factors and resistance profile to antibiotics, specifically to the oxacillin, of species of *Staphylococcus* spp. coagulase-positives isolated from milk samples of cows with mastitis. Of 150 isolated, the species *S.aureus*, *S.intermedius* and *S.hyicus* were identified. The antimicrobial susceptibility test yielded high resistance to penicillin and ampicillin and distinct antibiotyps had been identified, being of sensitivity to all the antibiotics prevalent. A total of 94,6% and 70,7% was positive for the production of betalactamases and presence of the *mecA* gene, respectively. The *femA* gene was detected in 80,9% of isolated *mecA* positive. The isolated presented distinct standards of growth in the tests of susceptibility to oxacillin. The tests of agar “screen” and the evaluation of the microdilution in plate, presented considerable values of sensitivity and specificity when the isolated ones were considered as an only group (*Staphylococcus* spp coagulase-positives) or when the species had been discriminated, respectively. The addition of 4% of NaCl in the agar plate can have effect in the increase of the sensitivity of the test of diffusion using the oxacillin and the test of diffusion presented the better capacity in the detention of the resistance isolates with cefoxitin disk. A total of 80% of the *S.aureus* was classified as MRSA and had presented resistance higher than 15% to the ampicillin and sulbactam association, vancomycin and gentamicin. About the virulence factors, the technique of the microplate disclosed 82.8% of isolated producers of “slime” and the intensity of the production was not associated with the presence of the *icaA* and *icaD* genes. In addition, the agar with the congo red presented effectiveness in the detention of isolated the not producing ones of “slime”. In all hemolitics isolates were detected the beta-hemolisin and 11.3% of the non-hemolitics had produced hemolisisins in the presence of beta-hemolytic strain, indicating the presence of the delta hemolisin. *spaA*, *coa* and *agr* genes had been carried through the amplifications of the genes the *S.aureus*. The *spaA* gene, that it codifies protein A region X, was positive in all isolated ones, disclosed only amplicon for each isolated one and presented polimorfism being the prevalent size of 315pb. The amplification of the *coa* gene presented three distinct polimorfics types, with only amplicon for each isolated and the prevalent profile was of 900pb. The amplification of the *agr* gene resulted in amplicons with 350 and 550 pb in 74% of the isolated. The test of biotyping disclosed the bovine ecovar as the prevalent in the *S.aureus*. Seven *S.aureus* that had presented the same profiles of the *coa*, *spaA*, *agr* genes, antibiotyps and ecovars was detected being 4 pertaining the same properties and 3 isolated from distinct properties.

LISTA DE ABREVIACÕES

APGF = água, peptona, glicose e fosfato

BHI = Infuso Cérebro Coração

CCS = Contagem de Células Somáticas

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CMT = “California Mastitis Test”

DNA = ácido desoxiribonucléico

ECP: Estafilococos Coagulase Positivos

h = horas

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

KOH = hidróxido de potássio

MH = “Müller-Hinton”

mL = mililitros

mm = milímetros

mM = milimolar

MVF: Agar Manitol Vermelho de Fenol

MRSA = “Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*” - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

NaCl = cloreto de sódio

ORSA= *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina

pb = pares de base

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

pH = potencial hidrogeniônico

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

RAPD = Amplificação Randômica do DNA Polimórfico

rpm = rotação por minuto

TSA = Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

U = unidades

UI= unidade internacional

UFC = unidades formadoras de colônia

V = volts

VP = “Voges Proskauer”

µg = micrograma

μL = microlitro

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1	Diagrama esquemático do gene <i>spaA</i> . 8
Figura 2	Diagrama esquemático do gene <i>coa</i> . 9
Figura 3	Diagrama esquemático do gene regulatório <i>agr</i> 12
Figura 4	Genes de identificação das espécies <i>S.aureus</i> e <i>S.intermedius</i> isolados de mastite bovina em gel de agarose 1%. 30
Figura 5	Gráfico apresentando o percentual de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina. 32
Figura 6	Gráfico apresentando o percentual de resistência das diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positivas isoladas de mastite bovina. 34
Figura 7	Gene <i>mecA</i> (513 pb) de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina em gel de agarose a 1%. 37
Figura 8	Resistência à oxacilina avaliada através do teste de ágar “screen”. 38
Figura 9	Resistência à oxacilina avaliada através do método de difusão em disco modificado. 39
Figura 10	Gráfico apresentando o percentual de resistência dos ORSA isolados de mastite bovina aos diferentes antibióticos testados através da técnica de difusão em disco. 41
Figura 11	Gene <i>femA</i> (132 pb) de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina em gel de agarose (1,5%). 42
Figura 12	Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina. 43
Figura 13	Genes <i>icaD</i> e <i>icaA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp coagulase positivos isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5%. 44
Figura 14	Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina crescidas em ágar Vermelho Congo. 45
Figura 15	Produção de hemolisinas por <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina. 47

Figura 16	Genes <i>hla</i> (210pb) e <i>hlb</i> (300pb) em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina, através do PCR multiplex (gel de agarose a 1,5%).	47
Figura 17	Gene <i>spaA</i> (região polimórfica) em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina (gel de agarose a 1,5%).	49
Figura 18	Gene <i>coa</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina (gel de agarose a 1,5%).	50
Figura 19	Padrão eletroforético dos perfis apresentados por <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina utilizando-se o iniciador OP11.	52
Figura 20	Padrão eletroforético dos perfis apresentados por <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina utilizando-se o iniciador OLP13.	52
Figura 21	Padrão eletroforético dos perfis apresentados por <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina utilizando-se o iniciador OLP14.	53
Figura 22	Crescimento de <i>S.aureus</i> em ágar cristal violeta.	54

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1. Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp, segundo Koneman et al., (2001).	20
Quadro 2. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro (mm) dos antibióticos utilizados.	22
Quadro 3. Classificação de <i>S.aureus</i> em ecotipos proposta por Devriese et al.(1984)	24
Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação das espécies.	26
Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação das espécies.	26
Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> .	27
Quadro 7. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos.	27
Quadro 8. Iniciadores utilizados na técnica de RAPD	28

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Quantidade de amostras de leite de vacas com mastite de diferentes propriedades situadas em cidades do Estado, ou próximas, do Rio de Janeiro.	18
Tabela 2. <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos isolados de diferentes propriedades e respectivas cidades.	29
Tabela 3. Antibiotipos de todos os <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos (n=150) isolados de mastite bovina.	34
Tabela 4. Antibiotipos das diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivas (n=150) isoladas de mastite bovina.	35
Tabela 5. Perfis de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. (n=150) nos distintos testes fenotípicos.	36
Tabela 6. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de suscetibilidade à oxacilina.	38
Tabela 7. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de difusão com disco de oxacilina e cefoxitina.	40
Tabela 8. Níveis de produção de “slime” das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos (n=150) isolados de mastite bovina.	43
Tabela 9. Presença dos genes de produção de “slime” e característica de coloração em ágar vermelho congo por <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos isolados de mastite bovina.	46
Tabela 10. Produção de hemolisinas e presença dos genes <i>hla</i> e <i>hly</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos (n=150) isolados de mastite bovina.	48
Tabela 11. Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene <i>spaA</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> (n=50) isolados de mastite bovina.	49
Tabela 12. Perfis estabelecidos segundo amplificação do gene <i>coa</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> (n=50) isolados de mastite bovina.	50

Tabela 13.	Produção de hemolisinas avaliada segundo a presença dos genes <i>agr</i> , <i>hla</i> e <i>hlb</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> .	51
Tabela 14.	<i>Staphylococcus aureus</i> isolados de diferentes propriedades caracterizados segundo os perfis do gene <i>spaA</i> , <i>coa</i> , <i>agr</i> , <i>ecovares</i> e antibiótipos	55

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Gênero <i>Staphylococcus</i>	3
2.2. Resistência antimicrobiana por <i>Staphylococcus</i> spp.	5
2.2.1. Expressão fenotípica da resistência à oxacilina	6
2.3. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.	7
2.3.1. Proteína A (gene <i>spaA</i>)	8
2.3.2. Produção de coagulase (gene <i>coa</i>)	8
2.3.3. Propriedades hemolíticas (genes <i>hla</i> e <i>hly</i>)	9
2.3.4. Produção de biofilme (genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>)	10
2.3.5. Sistema regulador de proteínas (gene <i>agr</i>)	12
2.4. Tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.5. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Origem das amostras de leite	18
4.2. Identificação das espécies	19
4.2.1. Coloração de Gram, Prova do Hidróxido de Potássio (KOH) a 3% e Prova da Catalase	19
4.2.2. Prova da coagulase	19
4.2.3. Prova de Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução de nitrato	20
	20

4.3.1. Produção de “slime” em microplaca	20
4.3.2. Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo	20
4.3.3. Produção de hemolisinas e sinergismo hemolítico (SHA)	21
4.4. Testes de suscetibilidade antimicrobiana	21
4.4.1. Difusão em disco simples	21
4.4.1.1. Discos de antimicrobianos	21
4.4.2. Teste de suscetibilidade aos betalactâmicos	22
4.4.2.1. Difusão em disco modificada	22
4.4.2.2. Ágar “screen”	22
4.4.2.3. Microdiluição em caldo (determinação da concentração inibitória mínima)	22
4.4.2.4. Microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima)	23
4.4.2.5. Teste de suscetibilidade à cefoxitina	23
4.5. Produção de betalactamases	23
4.6. Biotipificação de <i>S.aureus</i>	23
4.6.1. Produção de estafiloquinase	23
4.6.2. Produção de β -hemólise	24
4.6.3. Coagulação de plasma bovino	24
4.6.4. Crescimento em ágar cristal violeta	24
4.7. Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes de virulência e resistência	25
4.7.1. Extração do DNA bacteriano	25
4.7.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR	25
4.7.2.1. Genes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos	25
4.7.2.2. Genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos	26
4.7.2.3. Genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
4.7.2.4. Genes de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos	27
4.7.3. Técnica de RAPD	27

4.8. Análise estatística	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos	29
5.2. Perfil de suscetibilidade dos <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivos	31
5.2.1. Resistência aos betalactâmicos	36
5.2.1.1. Produção de betalactamases	36
5.2.1.2. Testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina e gene <i>mecA</i>	36
5.2.1.3. Teste de suscetibilidade à cefoxitina e gene <i>mecA</i>	39
5.2.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à oxacilina	40
5.2.1.5. <i>S.aureus</i> e gene <i>femA</i>	42
5.3. Fatores de virulência	43
5.3.1. Produção de “slime” e genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	43
5.3.2. Produção de hemolisinas e genes <i>hla</i> e <i>hly</i>	46
5.3.3. Gene <i>spaA</i> em <i>S.aureus</i>	48
5.3.4. Gene <i>coa</i> em <i>S.aureus</i>	50
5.3.5. Gene <i>agr</i> em <i>S.aureus</i>	51
5.4. Tipagem dos <i>S.aureus</i>	52
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	73
I- Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-positivas provenientes de leite de vacas, com mastite, de distintas propriedades.	74
II- <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de diferentes propriedades caracterizados segundo perfis do gene <i>spaA</i> , <i>coa</i> , <i>agr</i> , <i>ecovares</i> e antibiótipos.	76
III- Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2)	77

1. INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* spp. são importantes causadores de doenças em animais, sendo frequentemente envolvidos como agentes etiológicos da mastite bovina (GODDEN et al., 2002).

A detecção dos fatores de virulência dos estafilococos permite um melhor conhecimento da sua patogênese no hospedeiro. A maioria dos *Staphylococcus* spp. causadores de mastite se apresentam envoltos em uma camada mucopolissacarídica denominada “slime”, que parece ajudar na aderência e colonização do microrganismo ao epitélio glandular mamário (AGUILAR et al., 2001). Além disto, algumas espécies produzem hemolisinas que são diferentes entre si de acordo com ação lítica sobre os eritrócitos (alfa, beta, gama e delta). As do tipo beta e alfa são as mais importantes na patogênese das infecções intramamárias sendo que a beta toxina é uma esfingomielase Mg^{2+} - dependente que degrada a esfingomielina presente na membrana celular (LINEHAN et al., 2003, PARK et al., 2004). Elas podem apresentar um efeito hemolítico sinérgico (SHA), no qual as cepas podem ter uma ação sinérgica com outros microrganismos aumentando o potencial patogênico (DEMO, 1996).

Os estafilococos apresentam uma proteína denominada “proteína A” que tem a propriedade de combinar-se ao fragmento Fc da imunoglobulina G, bloqueando a via alternativa de ativação do complemento e da subsequente opsonização e fagocitose (ALONSO ; DAGGET, 2000). Além desta proteína, estas bactérias apresentam a coagulase que é um importante fator de virulência, pois tem a capacidade de coagular a fibrina que se deposita ao redor da bactéria oferecendo-lhe proteção (REINOSO, 2004). A expressão destas proteínas extracelulares está sujeita à regulação coordenada de vários loci gênicos. O primeiro a ser descoberto e mais estudado é o regulador *agr* que envolve cinco genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *hld*). O sistema *agr* atua como regulador positivo de proteínas secretoras (α e β hemolisinas, proteases, DNAses e estafiloquinases) e pode reprimir a transcrição dos genes que codificam a proteína A, coagulase e outras proteínas associadas à parede (NOVICK; JIANG, 2003).

O conhecimento do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos estafilococos causadores de mastite também fornecem dados necessários para o controle de tal enfermidade. Pois a persistência destes como agentes infecciosos deve-se, principalmente, à capacidade que possuem para desenvolver resistência aos antimicrobianos comumente utilizados, como os betalactâmicos (LOWY, 2003). Atualmente, o mecanismo de resistência bacteriana mais importante do ponto de vista clínico descrito para esta classe de antimicrobianos é a produção ou presença de uma proteína alvo modificada de baixa afinidade pelos betalactâmicos, determinada pela presença do gene *mecA* (MOON et al., 2007). Alguns genes, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais gene *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), auxiliam o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos beta-lactâmicos. Os estafilococos podem se tornar resistentes através de uma hiperprodução de betalactamases, que são enzimas que destroem o anel betalactâmico (GEHA et al., 1994). A emergência de cepas resistentes à múltiplos fármacos passou a ser um problema cada vez mais freqüente, e o paralelismo entre o uso de antimicrobianos e a seleção e conseqüente disseminação de estafilococos resistentes, é registrado e aceito internacionalmente (WEESE et al., 2005).

Uma estratégia racional e efetiva para o controle das infecções intramamárias é ampliar o conhecimento a respeito dos clones bacterianos que causam a enfermidade (OLIVE ; BEAN, 1999). Os organismos clonalmente relacionados são membros de uma mesma espécie que compartilham características bioquímicas, fatores de virulência e

características genéticas e, descendem de uma célula precursora comum (OLIVE ; BEAN, 1999).

Uma variedade de métodos fenotípicos tem sido implicada no estudo da diversidade de estafilococos causadores de infecções humanas e animais (DEVRIESE, 1984; CARROL ; FRANCIS, 1985; KREISWIRTH et al., 1993). Devriese (1984) propôs um método de tipificação de cepas animais em ecovares e esta técnica tem sido útil para estimar a origem dos estafilococos em produtos alimentícios, em intoxicações alimentares e em outras infecções humanas e animais (BERTOLATTI et al., 2003; HENNEKINNE et al., 2003).

Frente a estes dados, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os fatores de virulência e a resistência a antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus* spp. envolvidas na etiologia das infecções intramamárias em rebanhos bovinos leiteiros da região sul-fluminense do estado do Rio de Janeiro, através de provas fenotípicas e genotípicas. Em adição, foram realizadas provas de biotipagem para a caracterização de ecovares, antibiotipificação para estabelecimento de perfis prevalentes e, técnica de RAPD para a análise clonal destes isolados de forma a estabelecer os perfis circulantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Staphylococcus*

De acordo com a edição de 1986 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (KLOOS; SCHLEIFER, 1994), a família Micrococcaceae inclui quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. Descrito por Ogoston, em 1880 (*apud* NOVAK, 1999), como cocos em forma de cachos de uva e responsáveis por infecções piogênicas, o gênero *Staphylococcus* compreendia inicialmente duas espécies discriminadas pela produção de pigmentos: *S. aureus*, de cor amarelo-dourado, e *S. albus*, de colônias brancas. Em 1974, Baird Parker (LEVY, 1997) reconhecia apenas três espécies de importância clínica, utilizando como característica diferencial a prova da coagulase: a) coagulase-positiva - *S. aureus*; b) coagulase-negativa - *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Atualmente, este gênero compreende 28 espécies e 8 subespécies de bactérias caracterizadas como cocos Gram-positivos, catalase-positiva, imóveis, em geral não-capsulados e anaeróbios facultativos. Além do *S. aureus*, são coagulase-positiva as espécies: *S. delphini*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* e algumas cepas de *S. hyicus* (KLOOS; SCHLEIFER, 1994; LEVY, 1997).

A identificação do *S. aureus* é confiável pela prova da coagulase e esta espécie apresenta endonuclease termoestável, fosfatase alcalina e arginina diidrolase. Produz acetoina, reduz nitratos, maltose, frutose, sacarose, lactose, D-manitol, D-manose, D-trealose, ribose e D-turanose. Destes, a fermentação do manitol serve para diferenciar o *S. aureus* de espécies como o *S. epidermidis*, o *S. hyicus* e o *S. intermedius*. É negativo à ornitina descarboxilase, pirrolidonil arilamidase, β -glicosidase, β -galactosidase, oxidase modificada, rafinose, D-celobiose, D-xilose e L-arabinose. A identificação dessa bactéria pode ser feita inicialmente a partir de esfregaços diretos corados com Gram (KONEMAN et al., 2001). Diferem das espécies do gênero *Micrococcus* por serem oxidase-negativa, fermentarem glicose em anaerobiose, possuem ácido teicóico como constituinte de sua parede celular e DNA com conteúdo bastante reduzido de GC (30 a 39%) (MADIGAN et al., 1997). A parede celular dos estafilococos é resistente a lisozima e sensível a lisostafina, que cliva especificamente as pontes cruzadas de peptidoglicano com pentaglicina.

Os membros da família *Micrococcaceae* são diferenciados da família *Streptococcaceae* pela prova da catalase. Esta prova detecta a presença de citocromo oxidases nas *Micrococcaceae*. O teste é realizado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na concentração de 3% numa lâmina. A imediata produção de efervescência indica a conversão de H₂O₂ em água e oxigênio gasoso. A prova da catalase deve ser realizada a partir de um meio de crescimento sem sangue, porque eritrócitos por si só podem produzir uma reação de catalase fraca (KONEMAN et al., 2001).

A maior parte dos *Staphylococcus spp* coagulase-positivos possui uma coagulase única ou “fator de agregação”, na superfície da parede celular. Esse fator reage diretamente com o fibrinogênio presente no plasma e produz rápida aglutinação das células bacterianas. Esta prova pode ser executada com microrganismos provenientes de crescimento em ágar sangue ou outros meios nutritivos não seletivos, mas não deve ser realizada a partir de meios com elevado conteúdo em sais (ágar-manitol-salgado), porque o alto teor em sais, neste caso 7,5%, induz aglutinação espontânea das células. Na prova em tubo, a coagulase estafilocócica detectada é secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominada de “fator de reação com a coagulase” (CRF), para formar um complexo que, por sua vez, reage com o

fibrinogênio, formando fibrina. As provas que são consideradas negativas após quatro horas de incubação a 35°C, devem ser mantidas em temperatura ambiente e lidas novamente após 24 horas, já que cepas podem produzir fibrinolisinases por incubação prolongada a 35°C, o que causa a dissolução do coágulo durante o período de incubação. A prova da coagulase em tubos ainda é um procedimento de referência na identificação do *S. aureus* (KONEMAN et al., 2001).

A fermentação de açúcares é uma importante prova de identificação dos estafilococos. O ágar sal manitol, ou ágar manitol-salgado, contém manitol 1%, NaCl a 7,5%, vermelho de fenol e peptonas, sendo importante na diferenciação de bactérias fermentadoras de não fermentadoras do manitol, que é revelada pela alteração de cor do meio. A alta concentração de sais inibe o crescimento de outros microrganismos, com exceção de enterococos e isola de forma seletiva o estafilococo. A fermentação de maltose também pode ser utilizada na diferenciação das principais espécies estafilocócicas, podendo ser realizada em caldo vermelho de fenol contendo 3% do açúcar, que apresenta alteração da coloração (de vermelho para amarelo) em caso de prova positiva após o tempo de incubação (KONEMAN et al., 2001).

As principais espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-positivas são capazes de reduzir o nitrato a nitrito, através da extração de oxigênio. A presença de nitritos no meio da prova é detectada por adição de α -naftilamina e ácido sulfanílico com formação de um corante diazônico vermelho (KONEMAN et al., 2001).

Um teste complementar utilizado na identificação de *S.aureus* é o Voges-Proskauer que, em caso positivo desenvolve cor vermelha. Este teste está baseado na conversão de acetil metil carbinol (acetoína) em diacetil através da ação de hidróxido de potássio e oxigênio atmosférico. O diacetil é convertido a um complexo vermelho sob a ação catalítica de α -naftol e da creatina. Observa-se neste teste, que a formação de acetoína e butileno glicol é uma via alternativa do metabolismo do ácido pirúvico (KONEMAN et al., 2001).

Diversos trabalhos que utilizam testes bioquímicos para discriminar os estafilococos têm sido publicados (ROBERSON et al., 1992; BRITO et al., 2002; CAPURRO et al. 1999). Raus; Love (1983) e Bascomb; Manafi (1998) relataram que a produção de acetoína, a produção de ácido a partir da maltose e a atividade da hialuronidase seriam os melhores testes para diferenciarem *S. aureus* de *S. intermedius*. Em todos estes trabalhos verificou-se que quando os resultados eram analisados em conjunto era possível discriminar as três espécies, porém, na análise individual de cada teste, sempre era verificada uma pequena variabilidade em relação ao percentual de cepas de cada espécie com reação positiva ou negativa.

A identificação fenotípica através de comportamentos bioquímicos pode apresentar falhas devido às constantes mutações bacterianas ocorridas com o passar do tempo. Em adicional, algumas espécies apresentam resultados variados que geram confusão durante a leitura dos testes bioquímicos. Em trabalho desenvolvido por Silva et al., (2003), os autores propõem a detecção de genes de espécies, através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), e obtiveram resultados satisfatórios com a amplificação do gene *coa* para a identificação da espécie *S.aureus*, e do gene *nuc* de *S.intermedius* e de *S.hyicus*. Farber et al. (2001) descreveram outra técnica de identificação e tipificação bacteriana, denominada de PCR ribotipificação (*PCR Ribotyping*), que envolve a amplificação por PCR da região entre as seqüências conservadas 5S, 16S e 23S do operon do RNA ribossômico (rRNA), que está sendo muito utilizada para diferenciação entre espécies microbianas. Straub et al.,(1999) propõe a amplificação do fragmento de DNA ribossomal da espécie *S.aureus* sugerindo ser este um importante marcador genotípico da espécie.

A implementação de métodos moleculares com a utilização de marcadores genotípicos de espécies vem sendo cada vez mais freqüente em laboratórios de pesquisa.

2.2. Resistência antimicrobiana por *Staphylococcus* spp.

Apesar da introdução dos agentes antimicrobianos e das melhoras nas condições higiênicas de manejo, que vêm sendo fundamentais na redução da mortalidade por infecções estafilocócicas, os estafilococos persistem como importantes patógenos humanos e animais. Um fator importante desta persistência é a capacidade que possuem para desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados no seu controle (LOWY, 2003).

Durante as últimas décadas, houve uma grande preocupação com o aparecimento de cepas resistentes a numerosos antimicrobianos e sua associação a surtos. A mortalidade causada por *Staphylococcus aureus* na era pré-antibiótica excedia a 80% e com a introdução da penicilina, na década de 40, o prognóstico de pacientes com infecção estafilocócica melhorou. Mas, em 1942 surgiram as primeiras cepas resistentes. Em 1960, mais de 80% dos isolados, tanto na comunidade quanto em hospitais, eram resistentes à penicilina (LOWY, 2003). Os antimicrobianos de eleição utilizados no tratamento das infecções estafilocócicas são os beta-lactâmicos, cujos alvos de atuação são enzimas com função de transpeptidases e que atuam nas etapas finais da formação da parede celular das bactérias. Os antimicrobianos beta-lactâmicos ao inibirem estas proteínas, denominadas proteínas ligantes a penicilina (PBPs), impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que parece desencadear a morte bacteriana por um processo ainda desconhecido (WEESE et al., 2005).

A resistência bacteriana aos beta-lactâmicos pode ocorrer através da alteração da proteína alvo de ação do fármaco, ou seja, das “PBPs” determinada pela presença do gene *mecA*, que está localizado no cromossomo das cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Este gene foi clonado e seqüenciado pela primeira vez em 1987 (ITO et al., 2001) e está amplamente distribuído entre cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivos e negativos. Esta resistência está codificada por um elemento genético móvel, denominado “cassete cromossômico de *mec* estafilococo” (*SCCmec*), o qual foi identificado em uma cepa de MRSA japonesa. *SCCmec* se caracteriza pela presença de grupos de genes específicos extremos repetidos (*ccrA* e *ccrB*) e invertidos e ao complexo *mecA*. Atualmente muitos elementos genéticos que codificam o gene *mecA* vêm sendo identificados, que apresentam diferenças de tamanho e seqüência nucleotídica (HIRAMATSU et al., 2001). As cepas de MRSA são resistentes a todos os agentes β -lactâmicos, incluindo o amplo espectro de antimicrobianos utilizados em ampla escala nos hospitais. Esta resistência se deve ao fato de que o cassete *mec* porta outros elementos genéticos como *Tn554*, pUB110 e pT181, que codificam a resistência às outras classes de antimicrobianos causando a multirresistência (ITO et al., 2001).

Alguns genes, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais gene *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), auxiliam o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos beta-lactâmicos (VANNUFFEL et al., 1995). Foram identificados diferentes tipos de genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF* (VANNUFFEL et al., 1995). O gene *femA* é essencial para a expressão da resistência e parece ser uma característica peculiar de *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de estafilococos.

Muitos estudos conduzidos em hospitais veterinários vêm indicando que a resistência a esses agentes antimicrobianos emergiu entre espécies animais e que poderiam apresentar potencial para a transmissão zoonótica e resistência fenotípica como a MRSA. Frente a esses dados, pode-se constatar que as infecções animais ou a transmissão de tais microrganismos representam um perigo potencial para a população que desenvolve um maior contato com esses animais. A emergência destas cepas multidrogas resistentes passou a ser um problema cada vez mais freqüente, e o paralelismo entre o uso de antimicrobianos e a seleção e conseqüente disseminação de cepas resistentes, é registrado e aceito internacionalmente (MANRIQUE; GALVÃO, 1997). Logo, dados sobre os principais animais envolvidos nos processos de disseminação de tais agentes se fazem necessários no intuito de se guiar uma política antimicrobiana do uso desses agentes na prática veterinária, assim como avaliar o risco da transmissão da resistência antimicrobiana aos seres humanos (GUARDABASSI et al., 2004).

Os *Staphylococcus* spp. são os agentes etiológicos mais isolados em mastites (ALMEIDA, 1997; BRITO et al., 2002; SANTOS et al., 2003; RABELLO, 2003) e neste gênero, a espécie *S. aureus* é prevalente em infecções de vacas leiteiras (BOOTH, 1995; BRITO et al., 1999; BRITO et al., 2001). A espécie *S. aureus* é considerada um patógeno primário e tem sido o agente mais freqüentemente isolado tanto nas infecções clínicas como subclínicas (BOOTH, 1995). De acordo com Fagundes e Oliveira (2004), *Staphylococcus aureus* é a bactéria causadora de mastite de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antimicrobianos. A relação entre o uso de antimicrobianos e a seleção e disseminação de cepas resistentes é aceito internacionalmente e foi descrita pela primeira vez por Lepper em 1954 (FREITAS et al., 2005).

2.2.1. Expressão fenotípica da resistência à oxacilina

A expressão fenotípica da resistência à oxacilina é usualmente heterogênea (JAPONI et al., 2003). Um fenótipo menos freqüente é a resistência homogênea, onde toda a população de células é altamente resistente. Assim a expressão de resistência à meticilina em MRSA pode variar em diferentes cepas, desde a concentração mínima inibitória (CIM) de 1,5 µg/mL, muito próxima do CIM de cepas suscetíveis, até 800 µg/mL em culturas uniformemente resistentes. Os mecanismos reguladores da expressão da resistência são complexos e ainda não totalmente conhecidos (MARANGONI, 1997).

A problemática das infecções por MRSA torna-se ainda mais severa com a emergência recente de cepas apresentando suscetibilidade diminuída à vancomicina (TENOVER et al., 1998). O reconhecimento desta heteroresistência vem sendo um problema devido às diferenças de características de crescimento de vários microrganismos em uma mesma população, onde possivelmente uma população heteroresistente contém tanto organismos suscetíveis que exibem crescimento atípico de *S. aureus* não-heteroresistentes, quanto organismos resistentes que crescem mais lentos, ou em condições distintas de temperatura e NaCl (AARESTRUP et al., 2001).

A adição de sal nos testes de avaliação fenotípica da resistência de *Staphylococcus aureus* vem sendo amplamente utilizada, mas sua eficácia é diretamente dependente da qualidade do meio de cultura utilizado, da temperatura e tempo de incubação, do inóculo e do teste em questão (BROWN; YATES, 1986). A utilização de NaCl no meio de cultura foi descrito como sendo uma possibilidade de aumentar o

reconhecimento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (THORNSBERRY; MCDOUGAL, 1983).

Recentemente o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008), anteriormente NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), padronizou o uso do disco de cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração, para detecção do gene *mecA* por ser um forte indutor de seu sistema regulatório. Estudos têm relatado maior eficácia em testes de difusão em disco com cefoxitina correlacionado com a presença do gene *mecA*, em relação ao uso da oxacilina (DANCER, 2001). A cefoxitina induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica (MURAKAMI et al.; 1991).

Em consequência a esses fatores, trabalhos de pesquisas recentes reportaram a dificuldade na avaliação do perfil de suscetibilidade de *S. aureus* à oxacilina. Numerosas técnicas são utilizadas na identificação de MRSA. Historicamente, os isolados eram distinguidos através de métodos fenotípicos, incluindo testes de suscetibilidade a antimicrobianos e fagotipagem. Ambos os métodos possuem limitações, como isolados não relatados geneticamente que comumente apresentavam o mesmo perfil de suscetibilidade e, muitos *S. aureus* que não eram identificados pela fagotipagem (THORNSBERRY; MCDOUGAL, 1983). Muitas pesquisas têm utilizado a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), baseada na informação da sequência de DNA, para detecção de cepas de MRSA através do gene *mecA* (MURAKAMI et al., 1991; TOKUE et al., 1992). O método de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade além de ser independente das condições físicas e químicas das culturas bacterianas.

2.3. Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

Os microrganismos patogênicos elaboram uma série de estratégias de sobrevivência para colonizar determinados sítios do hospedeiro mediante a aquisição de uma variedade de fatores de virulência, que permitem a invasão das defesas fagocíticas, facilitam sua aderência às células epiteliais, colonizam os tecidos e favorecem sua persistência extracelular. Também se sabe que *S. aureus* é capaz de persistir dentro do hospedeiro evadindo a resposta imune. Este processo deve-se à internalização das cepas nas células epidérmicas e endoteliais (ALMEIDA et al., 1996). Assim como é capaz de invadir e induzir à morte de vários tipos celulares mediante atividade citotóxica (KRUT et al., 2003; BAYLES et al., 1998).

A patogenicidade dos estafilococos é multifatorial, geralmente envolvendo um grande número de proteínas extracelulares e outros fatores de virulência. Algumas destas proteínas, incluindo citotoxinas e exoenzimas, são secretadas; outras, incluindo a proteína A e várias adesinas, fixam-se na parede celular. Juntas, estas proteínas capacitam o microrganismo a escapar das defesas do hospedeiro, aderir às células e moléculas da matriz intercelular, invadir ou destruir as células do hospedeiro, e a se propagar dentro dos tecidos. Sua produção é governada por uma cadeia complexa de funções regulatórias cuja expressão *in vitro* é temporariamente programada e depende amplamente, direta ou indiretamente, de sinais ambientais.

2.3.1. Proteína A (gene *spaA*)

A proteína A apresenta a propriedade de combinar-se ao fragmento Fc da imunoglobulina G, bloqueando a via alternativa de ativação do complemento e da

subseqüente opsonização e fagocitose. O complexo proteína A-IgG funciona no processo de ligação e aderência dos estafilococos aos tecidos infectados (ALONSO; DAGGET, 2000).

A proteína A é codificada pelo gene *spa* que possui uma região polimórfica ou variável e uma região conservada. A região polimórfica X consiste em um número variável de repetidos 24 pares de bases e está localizada na região codificante do extremo C-terminal da parede celular (figura 1) (KOREEN et al., 2004).

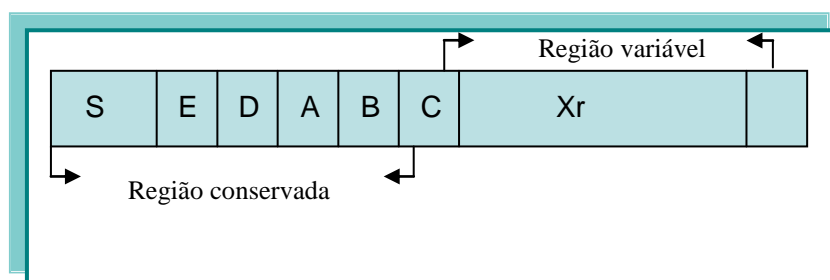


Figura 1. Diagrama esquemático do gene *spaA*. S: seqüência sinal; regiões E, D, A, B e C: sítio de ligação de imunoglobulinas; Xr: região variável repetida.

A diversidade da região parece originar-se a partir de deleções ou duplicações espontâneas das unidades repetidas, assim como também por mutações pontuais. O domínio da proteína A, codificado pela região X, funciona de modo a estender a porção N-terminal da união à imunoglobulina IgG através da parede celular, evitando assim a fagocitose e a fixação do complemento (KOREEN et al., 2004).

Recentemente o seqüenciamento da região polimórfica X, ou de pequenas repetições seqüenciais do gene *spa* vem sendo proposto como alternativa às correntes técnicas existentes para tipificação de *Staphylococcus aureus*, que se torna apropriada para o estudo epidemiológico em curto tempo uma vez que o gene tem uma velocidade evolutiva muito grande (SHOPSIN et al., 2000).

2.3.2. Produção de coagulase (gene *coa*)

A coagulase é um importante fator de virulência, pois tem a capacidade de coagular a fibrina que se deposita ao redor da bactéria oferecendo-lhe proteção (REINOSO, 2004).

No processo de formação da fibrina não ocorre atividade proteolítica e é independente de íons de cálcio e fosfolipídeos, diferente do que ocorre na formação da trombina fisiológica. A fibrina, induzida pela estafilotrombina, é mais resistente à ação digestiva da plasmina (SHOPSIN et al., 2000).

A estafiloagulase é produzida por diferentes cepas de estafilococos, distintas em suas propriedades bioquímicas e na habilidade de coagular o plasma, pelo fato de existir uma alta afinidade para induzir a coagulação do plasma de espécie humano ou animal da qual se isolou a cepa (DEMO, 1996).

In vitro podem apresentar-se falsos positivos e falsos negativos. Os falsos negativos estariam associados à clivagem parcial por proteases (estafiloquinas) e os falsos positivos são observados quando a protrombina é ativada por tripsina ou proteases. A este fenômeno se denomina “pseudocoagulase” (SHOPSIN et al., 2000).

A análise da seqüência nucleotídica do gene *coa* clonado a partir de três diferentes isolados de *S. aureus* revelou a existência de um segmento variável dentro da região 3' codificante (KAIDA, 1989; PHONIMDAENG, 1990). Esta região variável

constituída de seqüências curtas repetidas (SRRs9) em *tandem* de 81 pb (figura 2) é utilizada em diversos estudos epidemiológicos para subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de seqüências repetidas e pela localização de sítios de restrição para endonucleases específicas, permitindo aumentar o poder discriminatório da técnica (GOH et al., 1992).

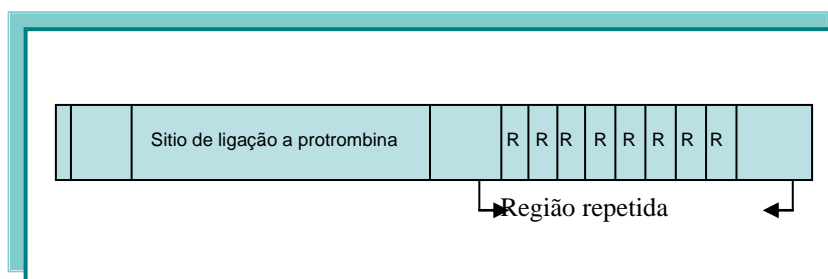


Figura 2: Diagrama esquemático do gene *coa*. R: unidade de seqüência repetida de 81pb.

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

As hemolisinas são agentes citotóxicos cuja ação pode auxiliar no poder invasivo das bactérias. CHAPMAN et al. (1934) demonstraram a atividade hemolítica dos estafilococos sobre ágar contendo sangue de coelho e correlacionaram à patogenicidade das cepas.

Alguns tipos de hemolisinas induzem mudanças pró-inflamatórias nas células, inativam o sistema imune por efeito citotóxico direto, e degradam tecidos (PROJAN; NOVICK, 1997).

As quatro citolisinas estafilocócicas são diferentes entre si de acordo com ação lítica sobre os eritrócitos de diferentes espécies, mas as do tipo beta e delta apresentam uma maior importância na patogênese das infecções intramamárias (DEMO,1996). São elas:

- Alfa citolisina

A alfa citolisina é uma proteína cristalizada que possui peso molecular que varia de 22000 a 39000 dependendo do método de isolamento e purificação. Esta citolisina produz danos aos tecidos posteriormente ao estabelecimento do foco da infecção. É citotóxica e citolítica para uma variedade de tipos celulares, além de dermonecrótica e neurotóxica (LINEHAN et al., 2003).

Esta toxina causa formação de poros nas membranas celulares explicando a sua capacidade de causar lise nos eritrócitos. A sensibilidade dos eritrócitos a lise pela ação da alfa toxina varia muito, devido à distribuição de lipídeos e proteínas de membrana, sendo os mais sensíveis os de coelho, seguidos de ovelhas e bovinos (ROGOLSKY, 1979). Em células humanas o efeito citopatogênico não está associado à hemólise. O principal efeito patogênico da alfa-toxina é o dano celular endotelial e a ativação de plaquetas, levando ao comprometimento da microcirculação. A toxina age também nas membranas, induzindo a produção de eicosanóide (prostaglandinas) que resulta em vasoconstrição, em aumento de permeabilidade capilar e em edema. Pode também ativar endonucleases celulares, precipitando a morte da célula. Esta toxina é codificada pelo gene *hla*, sendo encontrada principalmente no *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus warneri* (CUNHA, 1998).

Em ágar contendo sangue produz uma ampla zona de completa hemólise ao redor da colônia. Alguns autores sugerem a existência de dois componentes diferentes: a alfa 1 e 2. Entretanto outros autores indicaram claramente que a alfa 2 e a delta citolisina são idênticas (ELECK; LEVY, 1950).

- Beta citolisina

Tem-se demonstrado que a produção beta toxina é particularmente característica de cepas estafilocócicas associadas à mastite bovina, devido ao fato de que a pele e os tecidos do úbere serem extremamente ricos em esfingomielina quando comparados a outras áreas do corpo. Esta age como uma esfingomielinase e destrói membranas celulares ricas em esfingomielina, sendo tóxica para vários tipos celulares tais como hemácias, leucócitos, plaquetas, fibroblastos e macrófagos. No entanto, seu papel patogênico em infecções humanas é desconhecido (PARK et al., 2004). A expressão genética desta citolisina pode estar negativamente controlada por dois tipos de conversão fágica. Uma é a dupla conversão fágica, na qual o microrganismo adquire a habilidade de expressar estafiloquinase e perde a habilidade de expressar a toxina. E a segunda conversão, na qual ele perde por lisogenização a habilidade de produzir a citolisina (LINEHAN et al., 2003).

Esta toxina é codificada pelo gene *hlb* e já foi isolada e seqüenciada em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus lugdunensis*. Em ágar contendo sangue ovino, bovino e humano a beta citolisina produz uma zona de hemólise incompleta (CUNHA, 1998).

Christie e Graydon (1941) (*apud* WILLIAMS; HARPER, 2005) relataram que algumas cepas estafilocócicas produzem uma área definida de completa hemólise quando inoculados dentro da zona de efeito beta hemolítico produzido por outros estafilococos. Este método denominado ensaio sinérgico hemolítico (SHA) é devido à ação combinada da beta e delta citolisina que pode ser avaliada em meios de ágar contendo eritrócitos ovinos, bovinos, humanos e eqüinos. Pelo fato da alfa citolisina não ter efeito sobre eritrócitos humanos e eqüinos, e a beta e gama citolisina apresentar muito pouco ou nenhum efeito sobre eritrócitos de eqüinos se deduz que o SHA observado é devido a delta toxina e deve ser observado principalmente em sangue de ovino (HEBERT; HANCOCK, 1985).

Vêm-se detectando SHA em cepas de estafilococos isoladas de glândula mamária bovina, as quais poderiam ter uma ação sinérgica com outros microorganismos patogênicos aumentando ainda mais seu potencial patogênico (DEMO, 1996).

2.3.3. Produção de biofilme (genes *icaA* e *icaD*)

A adesão de *Staphylococcus* spp. ao epitélio da glândula mamária é considerada o primeiro ponto crítico na patogênese das mastites (ALCARÁZ et al., 2003). A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* causadores desta patologia se apresentam envoltos em uma camada de “slime”, que parece ajudar na aderência e colonização do microrganismo ao epitélio glandular mamário. Algumas cepas produtoras de “slime” apresentam significativa capacidade de colonização quando comparadas às cepas não produtoras (AGUILAR et al., 2001). A habilidade de *S. aureus* em formar estes “slimes” auxilia no processo de sobrevivência bacteriana em ambientes hostis dentro do hospedeiro e é considerado um fator responsável pelas infecções crônicas e persistentes.

Outro fator importante parece ser a aderência dos estafilococos aos bocais das ordenhadeiras da produção de “slime”, o que favorece sua colonização nas superfícies plásticas, que é controlada por interações hidrofóbicas entre as bactérias e estas

superfícies. O “slime” é um material extracelular mucóide e viscoso composto principalmente por hidratos de carbono e proteínas. É considerado um fator de virulência que inibe a quimiotaxia, a fagocitose, proliferação de linfócitos a mitógenos e limita a ação de macrófagos (NOVAK, 1999). Além disso favorece a formação de biofilme, que é caracterizado como um comunidade microbiana sésil que consegue se aderir a algum substrato.

A composição desta matriz secretada varia entre os microrganismos e no caso de *S.aureus* é formada por poli-N-acetilglicosamina. O lócus de adesão intercelular é denominado *ica* e consiste nos genes *icaADB* e *C* responsáveis pela produção do polissacarídeo. A deleção destes genes resulta na perda da capacidade de formação do biofilme (VASUDEVAN et al., 2003). Entre os genes citados, o *icaA* e o *icaD* vêm sendo reportados como os principais responsáveis pela formação do biofilme (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaA* codifica a N-acetilglicosaminatransferase, uma enzima envolvida na síntese de N-acetilglicosamina e, o gene *icaD* apresentam um papel fundamental na expressão desta enzima, possibilitando a expressão fenotípica do polissacarídeo (ARCIOLA et al., 2001a).

Em geral a formação do biofilme envolve distintos estágios, incluindo adesão inicial ao substrato, adesão entre as células, proliferação, maturação e finalmente as bactérias da matriz se liberam do biofilme para poder colonizar novas superfícies, completando o processo de formação do biofilme (OTTO, 2004). Acredita-se que o sistema “quorum sensing” influencia a formação do biofilme em muitos destes estágios em *Staphylococcus* spp.

A adesão à superfície é o estágio crucial de transição entre as células livres e as que formarão a primeira camada do biofilme. Este fenômeno envolve a produção de muitas moléculas de adesão que são capazes de estabelecer uma interação físico-química entre as células e a superfície (VUONG et al., 2000).

A liberação destas bactérias é a etapa que menos se conhece. No caso de *S. aureus*, é descrito um processo de variação de fase produzido pela inversão reversível de um elemento de inserção (IS256) no interior do operon (*icaADBC*) responsável pela síntese do exopolissacarídeo do biofilme. O processo de inserção deste elemento parece ocorrer aleatoriamente produzindo bactérias deficientes na síntese do exopolissacarídeo e, portanto, deficiente na formação do biofilme. Isto permite que a bactéria mantenha uma pequena porcentagem da população incapaz de sintetizar a matrix e hábil para “escapar” do biofilme (UBEDA et al., 2003). Alguns autores sustentam a hipótese de que as bactérias são liberadas graças às enzimas que degradam de forma específica o exopolissacarídeo do biofilme, mas esta hipótese não está confirmada por métodos experimentais (UZCUDUN, 2004).

A formação de biofilmes em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite está também associada à resistência a alguns antimicrobianos (AMORENA et al., 1999). Entre os mecanismos responsáveis por essa resistência estão a barreira de difusão física e química formada pela matriz exopolissacarídica que dificulta a penetração dos antimicrobianos, a existência de microambientes que antagonizem a ação do antibiótico, a ativação de respostas de estresse que provocam mudanças na fisiologia bacteriana, o crescimento estável e mais lento desses microrganismos devido à limitação de nutrientes e devido a ausência de alvos dos antimicrobianos (MAH; O´TOOLE, 2001).

2.3.5. Sistema regulador de proteínas (gene *agr*)

A delicada coordenação da expressão dos fatores de virulência usualmente espécie-específicos é crucial para a sobrevivência do patógeno e conseqüente sucesso da invasão no hospedeiro (VOJTOV et al., 2002).

Dentre o sistema de regulação bacteriana, a comunicação existente entre as células, denominada sistema “quorum sensing (QS)” vem adquirindo maior atenção da comunidade científica com o passar dos anos. Os sinais do sistema QS são pequenas moléculas denominadas autoindutoras (AIs), que são detectadas em baixas concentrações quando a densidade populacional bacteriana também é baixa. Quando as células atingem uma determinada densidade populacional e as AIs acumulam, devido a sua grande concentração, um sistema regulador é ativado e controla a expressão de vários genes, incluindo aqueles associados aos fatores de virulência (KONG et al., 2006).

O sistema QS bem caracterizado em *Staphylococcus* spp. é denominado *agr* que apresenta aproximadamente 3.5kb com 68% de similaridade que é co-transcrito pelo RNAIII, que controla a expressão de genes alvos de forma desconhecida (VUONG et al., 2000) (figura 3).

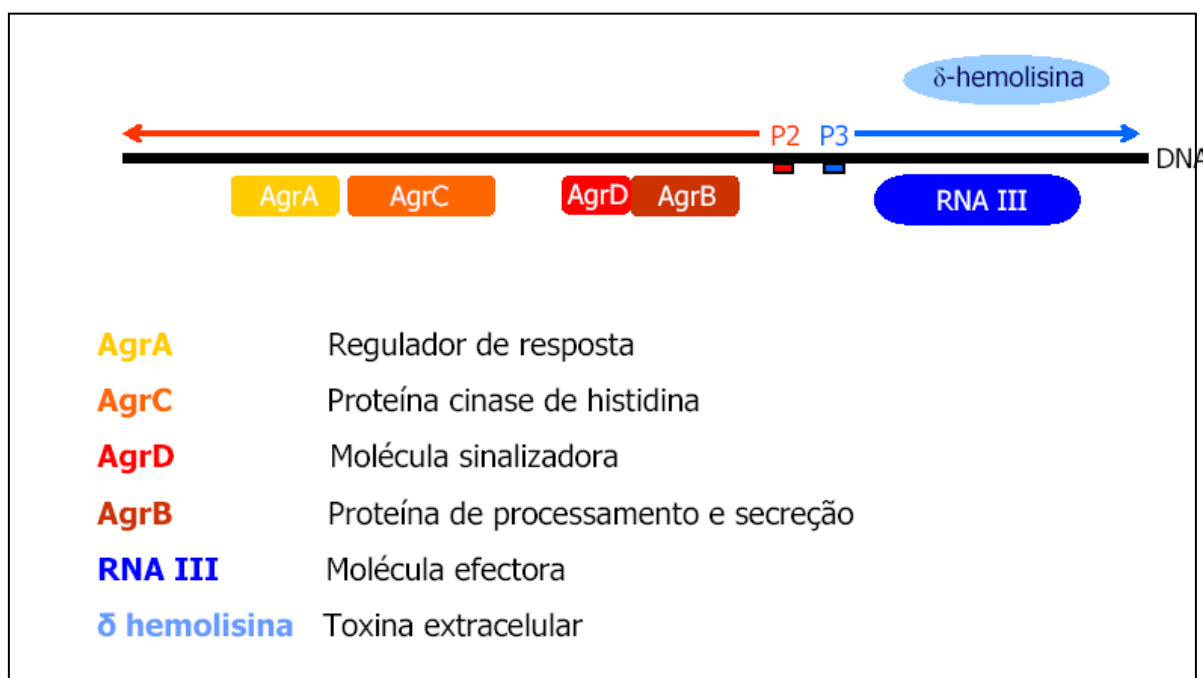


Figura 3: Diagrama esquemático do gene regulatório *agr*.

O sistema *agr* é ativado durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária da curva de crescimento bacteriano por um mecanismo auto-regulatório. O RNAIII é uma molécula reguladora do *agr* que contribui para a não expressão de genes de virulência relacionados a componentes estruturais de *S.aureus* e, à expressão de fatores de virulência secretáveis durante a fase exponencial. O RNA III codifica os quatro genes do operon *agr*, *agrBDCA*. O *agrC* e *agrA* são componentes que se complementam pois enquanto que o *agrC* é o sensor, o *agrA* é o regulador e *agrD* e *agrB* participam na produção de um octapeptídeo (AIs) (VUONG; OTTO, 2002). Nos estafilococos, estas moléculas autoindutoras apresentam uma estrutura conservada, mas apresentam diferenças nas seqüências dos aminoácidos.

Análises laboratoriais vêm demonstrando que este gene inativa a produção de exoproteínas envolvidas nos fatores de virulência. Trabalhos confirmam que variações

na transcrição do RNAlII de *S.aureus*, induzidas pelo locus *agr*, alteram a expressão de proteína A e hemolisinas (OTTO et al., 2001; TAKEUCHI et al., 2001).

De acordo com a literatura, a perda do sistema *agr* reduz a virulência de *S.aureus* em modelos experimentais. Abdelnour et al., (1993) demonstraram que o sistema *agr* em *S.aureus* é um determinante essencial para a indução e progressão da artrite séptica em camundongos. Em trabalho desenvolvido por Gillaspay et al. (1995) foi possível avaliar que mutações no sistema *agr* reduzem a incidência e grau de severidade da osteomielite em coelhos.

Desde a sua identificação, o sistema *agr* vem sendo caracterizado como parte central do desenvolvimento da patogênese estafilocócica, como adesão e subsequente infecção. A literatura descreve que a ausência de função do sistema *agr* facilita a adesão inicial dos estafilococos às superfícies, presumidamente devido à expressão positiva de moléculas de adesão e negativa de fatores de formação do biofilme, que são liberados no final da fase estacionária (VUONG et al., 2000).

2.4. Tipagem de *Staphylococcus aureus*

A elevada variabilidade fenotípica de espécies de *Staphylococcus* spp. dificulta a adoção de sistemas convencionais para sua caracterização. Nenhum dos sistemas utilizados provê uma informação clara e definitiva. No mais, sabe-se que os resultados destas técnicas estão sujeitos a mudanças ao longo do tempo, pois as bactérias constantemente variam seu material genético através da transferência horizontal de genes e das mutações que acontecem com certa constância (TENOVER, 1994).

A variedade existente entre as espécies bacterianas permite que isolados de diferentes fontes, em tempos distintos ou em regiões diferentes, possam ser classificados em subtipos ou cepas. Para que se possa estabelecer uma relação clonal entre duas espécies é necessário tipificá-las.

Diferenciação intraespecífica de *S. aureus* é essencialmente designada para investigações epidemiológicas durante as doenças, ou como parte de um sistema de vigilância contínuo, e pode ser conduzida por procedimentos fenotípicos e genotípicos (TENOVER et al., 1994). Tais métodos são baseados na premissa de que organismos clonalmente relacionados compartilham particularidades que podem diferenciá-los de outros organismos não relacionados (FUEYO, 2001).

Técnicas como a determinação de perfis de suscetibilidade a antimicrobianos e a biotipificação ainda são utilizadas em investigações epidemiológicas no estudo da diversidade bacteriana de infecções humanas e animais mesmo após o avanço da epidemiologia molecular (KREISWIRTH et al., 1993; DEVRIESE, 1984; REINOSO, 2004; BERTOLATTI et al., 2003; HENNIKENEN et al., 2003).

O sistema proposto por Devriese (1984) é um método simples para a tipificação das cepas em diferentes espécies animais, no qual o autor propõe ecovares que se diferenciam em ecotipos específicos, como humano, bovino, aviários e biotipos não específicos. Os ecovares podem se distinguir através de características bioquímicas, como produção de estafiloquinase e citolisinas, coagulação de plasma bovino e tipo de crescimento em ágar contendo cristal violeta (BERTOLATTI et al., 2003; HENNIKENEN et al., 2003; ROSEC et al., 1997).

O antibiograma tem sido um método simples, prático e útil de tipagem bacteriana, contribuindo na investigação de fontes de contaminação e distribuição bacteriana, sendo a técnica amplamente disponível e padronizada e que pode ser utilizada com várias espécies microbianas. Sua principal desvantagem consiste na variabilidade da expressão da resistência, a instabilidade devido à transmissão

horizontal e perda dos elementos genéticos extracromossômicos, promovendo variações no potencial de resistência ocasionado principalmente pelo uso indiscriminado de antimicrobianos e pela sua capacidade em trocar informações genéticas contidas em plasmídeos (DANTAS et al., 2006).

Nos últimos anos, numerosas técnicas moleculares são usadas para identificar e comparar subtipos de *S. aureus* (RODRIGUES DA SILVA; DA SILVA, 2005) como a amplificação de determinados genes específicos ou amplificação de fragmentos através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A PCR pode ser definida como um método “*in vitro*” para produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e seqüência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde complexo de ácido nucléico (MULLIS; FALOONA, 1987). O resultado da amplificação de ácido nucléico por PCR pode ser facilmente visualizado por eletroforese em gel de agarose. O sucesso da amplificação depende das condições da reação, da pureza dos reagentes utilizados e dos diferentes parâmetros da reação. Um aspecto fundamental da revolução causada pela PCR foi à possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA (ex. brometo de etídio). Entretanto, a técnica de PCR apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma. A construção de iniciadores para a amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse (BITTENCOURT, 2000). Para se conhecer estas seqüências é necessária a clonagem e seqüenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de seqüência conhecida, a PCR apresentou de início, um uso limitado como técnica para obtenção de marcadores moleculares.

A técnica de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) é baseada no uso de iniciadores simples de arbitrária, contendo 9 a 10 pares de base, em uma reação de baixa especificidade para amplificar fragmentos genômicos de DNA (VERSALOVIC et al., 1991).

O teste de RAPD-PCR em alguns casos detecta mudanças simples de bases no DNA genômico. Esta estratégia permite a detecção de polimorfismos de forma rápida e análise de um número elevado de cepas ao mesmo tempo. Logo, os isolados epidemiologicamente relacionados apresentam de modo aleatório um perfil genômico indistinguível dos isolados não relacionados aleatoriamente da mesma espécie (WELSH; MCCLELLAND, 1990).

Sendo assim, fenótipos moleculares gerados por RAPD podem servir para diagnosticar em diferentes níveis taxonômicos. Considerando-se um determinado iniciador, os produtos de amplificação podem ser classificados em dois grupos, variáveis (polimórficos) e constantes (não polimórficos). Perfis de RAPD de representantes de vários gêneros podem conter bandas comuns a um outro gênero, enquanto outras bandas podem ser exclusivas. Se várias espécies pertencentes a esse gênero forem analisadas e uma das bandas exclusivas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador gênero-específico. Da mesma forma, quando se tem o perfil de RAPD de espécies de um mesmo gênero, algumas bandas poderão ser compartilhadas por algumas espécies, enquanto outras poderão ser exclusivas de uma dada espécie. Se vários indivíduos dessa espécie forem analisados e essa banda estiver presente em todos eles, pode-se concluir que é um marcador espécie-específica (FUNGARO; VIEIRA, 1998).

Marcadores moleculares têm esclarecido a variabilidade genética existente entre isolados de *S. aureus* provenientes do úbere bovino e de outras fontes. Dentre eles, o RAPD usado por SILVA et al. (2000); HERMANS et al. (2001), os quais identificaram

bandas típicas em determinadas linhagens de *S.aureus*, com alta virulência. Há uma forte associação entre as bandas geradas por RAPD, com os resultados obtidos por meio de outros métodos (FITZGERALD et al., 2000).

A amplificação de determinados genes (por exemplo, que codificam moléculas de DNA ribossomal) e a análise genética dos fragmentos amplificados, assim como a informação filogenética e sistemática pode ser obtida de maneira rápida e eficaz. Esta técnica também pode ser utilizada para detectar genes responsáveis por características fenotípicas, enquanto que as técnicas derivadas desta reação permitem uma busca por polimorfismos genéticos produzindo grandes impactos no estudo da disseminação, por exemplo, de microrganismos multirresistentes, (REINOSO, 2004).

A técnica da PCR pode ser utilizada para estabelecer a relação clonal em estudos epidemiológico-moleculares e uma proposta plausível é a subdivisão dos isolados de *S. aureus* baseando-se no polimorfismo do gene da coagulase (*coa*) e da proteína A (*spaA*), utilizando iniciadores específicos que apresentam fragmentos com diferentes pesos moleculares (VIEIRA-DA-MOTTA et al., 2001).

Os resultados da pesquisa epidemiológica baseada na análise dos genes *coa* e *spaA* sugerem que poucos subtipos de *S. aureus* são responsáveis pela maior parte dos casos de mastite bovina (SCHLEGELOVÁ et al., 2003). Dentre os métodos moleculares, muitos autores consideram esta tipagem como ferramenta epidemiológica de significado simples e suficientemente reprodutível, específica e discriminatória, quando empregada na subtipagem de *S. aureus* isolados de fontes humanas e animais (SANTOS et al., 2003; SCHLEGELOVÁ et al., 2003; SHOPSIN et al., 2000).

2.5. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina

O termo mastite deriva das palavras gregas *mastos*, que significa “peitos” e “*itis*” que significa “inflamação”. A enfermidade se apresenta em diferentes níveis dependendo do grau da inflamação podendo ser classificados em:

- Mastite clínica, onde o úbere demonstra uma reação visível, com sintomas característicos que podem ser locais ou sistêmicos;
- Mastite subclínica, onde não se observam sinais clínicos evidentes e o leite parece normal. Esta forma é importante porque constitui uma reserva de microrganismos, sendo 15 a 40 vezes mais freqüentes que a manifestação clínica.
- Mastite crônica que se caracteriza pela formação de microcolônias dentro da glândula mamária, tem usualmente um desenvolvimento progressivo de tecido cicatrizante e uma mudança na forma e no tamanho da glândula afetada (REINOSO, 2004).

A mastite é conhecida desde que o homem domesticou a vaca e apesar de todo o avanço científico continua sendo a enfermidade mais comum e dispendiosa no mundo inteiro (WATTS, 1988). Acredita-se que 15 a 20% das vacas leiteiras estejam infectadas por alguma forma de mastite. Esta enfermidade é responsável por grandes perdas econômicas tanto na produção quanto na indústria leiteira em consequência da perda do valor biológico do leite que altera a qualidade dos subprodutos industrializados (GODDEN et al., 2002). Anualmente se perdem, cerca de 70 milhões de quilos de gordura derivada do leite. Os produtos lácteos permitem, ademais, o desenvolvimento de *S. aureus*, ocasionando ao homem enfermidades transmitidas por alimentos (TRANTER; BREHM, 2004). Estima-se que haja um prejuízo de cerca de US\$ 1,8

bilhões/ano nos EUA, em função da ocorrência de mastites (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996). No Brasil, estima-se que, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, possa ocorrer perda de produção entre 12 e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 20 bilhões de litros (FONSECA; SANTOS, 2000).

A enfermidade geralmente é o resultado final da interação de vários fatores, tais como manejo e condições de saúde dos animais, agentes etiológicos e principalmente da inexistência de medidas preventivas de controle. Até o presente momento a desinfecção pós-ordenha e a terapia com antimicrobianos vêm sendo os métodos de controle mais aceitos. A demanda por uma maior qualidade dos produtos por parte das indústrias lácteas, vem promovendo o desenvolvimento de linhas de investigação orientadas para o desenvolvimento de estratégias de manejo apropriada para controlar as infecções mamárias (BUZZOLA et al., 2001; SORDELLI et al., 2000).

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 (COSTA, 1998; PRESTES et al., 2003).

Figueiredo (1995) afirma que as mastites contagiosas se caracterizam por apresentar alta incidência de casos subclínicos, tendência a cronicidade e alta contagem de células somáticas (CCS). A mastite ambiental é causada por agentes que vivem preferencialmente no hábitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e matéria orgânica (FREITAS et al., 2005). Este tipo de mastite caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, freqüentemente, com manifestação aguda e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato. A infecção ocorre preferencialmente no período entre as ordenhas (COSTA, 1998).

Animais portadores podem constituir fonte de infecção permanente, permitindo a persistência dos *Staphylococcus* spp. durante toda a fase de lactação (FERREIRA et al., 2006). Os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização, porém estes agentes podem ser isolados em outros locais do animal e também na sala de ordenha e ordenhadeiras, ressaltando a importância do manejo correto na prevenção de sua transmissão (FERREIRA et al., 2006 ; CUNHA et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Caracterizar feno-genotipicamente as espécies de estafilococos coagulase-positivos isoladas de leite de vacas que apresentaram quadros de mastites, detectar seus fatores de virulência através de provas fenotípicas e genotípicas, avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, especificamente à oxacilina e, realizar tipagem de *S.aureus* através de métodos distintos.

3.2. Objetivos específicos:

- Identificar através de provas fenotípicas as espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos
- Amplificar os genes específicos para a identificação das espécies *S.aureus* (DNAr), *S.intermedius* e *S.hyicus*, respectivamente *nuc1* e *nuc 2*;
- Detectar através de provas fenotípicas os fatores de virulência: “slime”, hemolisinas e sinergismo hemolítico em todos os isolados;
- Amplificar os genes de virulência *hla* e *hlb* (alfa e beta hemolisinas, respectivamente), *icaA* e *icaD* (“slime”) em todos os isolados;
- Avaliar a suscetibilidade fenotípica dos estafilococos aos antimicrobianos de eleição;
- Detectar a resistência à oxacilina através de distintos testes fenotípicos;
- Amplificar os genes de resistência à oxacilina *mecA* e *femA* em todos os isolados;
- Amplificar os genes de virulência *spaA* (proteína A), *coa* (coagulase) e *agr* (controle da produção de exoproteínas) em *S.aureus*;
- Classificar os *Staphylococcus aureus* em ecotipos através da biotipificação, em antibiogramas através do antibiograma, através dos polimorfismos dos genes *coa* e *spaA* e através dos perfis encontrados na técnica de amplificação randômica de DNA polimórfico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem das amostras de leite

Foram utilizadas 228 amostras de leite de vacas, pertencentes a 25 propriedades situadas em cidades pertencentes ou adjacentes à região Sul Fluminense do Rio de Janeiro (tabela 1).

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

Identificação da propriedade	Cidade	Número de amostras
1	Quatis	14
2	Quatis	6
7	Quatis	5
11	Quatis	5
3	Juiz de Fora	20
25	Juiz de Fora	16
4	Seropédica	10
6	Seropédica	2
8	Seropédica	5
10	Seropédica	6
5	Resende	5
9	Resende	2
17	Resende	7
18	Resende	5
19	Resende	10
20	Resende	20
12	Barra Mansa	11
14	Barra Mansa	9
15	Barra Mansa	10
16	Barra Mansa	5
13	Rio de Janeiro	8
21	Rio de Janeiro	18
22	Rio de Janeiro	9
23	Vassouras	10
24	Vassouras	10
Total		228

Do total de amostras utilizadas, 23 foram coletadas pessoalmente e o restante foi recebido no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os veterinários que coletaram estas amostras foram instruídos a realizar imediatamente antes da ordenha o “California Mastitis Test” (CMT). O resultado, relacionado à contagem de células somáticas, foi avaliado de acordo com o grau de gelatinização da mistura em partes iguais de leite e reagente (FONSECA; SANTOS, 2000). Os animais considerados positivos foram selecionados, tiveram as tetas submetidas à lavagem com água e sabão neutro e secagem com papel toalha e, então foi coletado um volume de aproximadamente 10mL de leite por ordenha manual em tubo de ensaio estéril. As amostras foram imediatamente transportadas sob condições adequadas de refrigeração, e assim que recebidas foram incubadas por 6hs a 37°C.

4.2. Identificação das espécies

As amostras de leite foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento ágar Mueller Hinton (MH) contendo 5% sangue desfibrinado de carneiro (AS). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente repicadas em ágar seletivo Manitol Vermelho de Fenol (Britania), para observação das características das colônias e fermentação, ou não, do manitol (KONEMAN et al., 2001).

4.2.1. Coloração de Gram, Prova do Hidróxido de Potássio (KOH) a 3% e Prova da Catalase

Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintórias (cocos Gram positivos).

A prova do hidróxido de potássio foi efetuada através da adição de uma gota de KOH (3%) à uma gota da suspensão bacteriana. A não formação de um gel viscoso indicou um resultado negativo confirmando a prova do Gram, uma vez que todas as bactérias Gram positivas são negativas na prova do KOH a 3%.

O teste da catalase foi realizado através de teste em lâmina, nos isolados que se apresentavam como cocos Gram positivos. Para tal, foi depositada uma gota da suspensão bacteriana homogênea, à qual adicionava-se uma gota da solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de bolhas de O₂ indicava teste positivo. (KONEMAN et al., 2001).

4.2.2. Prova da coagulase

O teste para a detecção da atividade da enzima coagulase, foi realizado utilizando o crescimento bacteriano obtido em caldo BHI (Infuso de Cérebro e Coração-Britania), incubado a 35°C, por 24 horas. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada a 0,5 mL de sangue total de carneiro, acrescido de etileno-diamina-tetraacetato (EDTA-1%) e, incubados a 37°C por 6 horas a fim de obter a visualização do coágulo. As amostras coagulase-positivas tiveram sua identificação comprovada através da inoculação de 0,1 mL de suspensão bacteriana em 3 mL de cada caldo dos testes Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução do nitrato a nitrito (KONEMAN et al., 2001).

4.2.3. Prova de Voges-Proskauer, fermentação da maltose e redução de nitrato

A prova de Voges-Proskauer foi realizada utilizando-se o caldo APGF (água, peptona, glicose e fosfato) que apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato. A utilização da glicose, apresentando como produto final a acetoina é indicada pela coloração rosa após a adição de 0,3 mL de α -naftol a 5% e 0,6 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 horas a 37°C.

A fermentação da maltose foi testada utilizando o caldo contendo o indicativo de pH vermelho de fenol e o açúcar a 1%. A produção de ácido, indicada pela diminuição do pH e conseqüente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas na temperatura de 37°C.

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO_3). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada adicionando-se em uma lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 37°C e, uma gota de cada reativo (A e B) de Griess Ilosway. A coloração rosa indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva (KONEMAN et al., 2001).

O quadro 1 apresenta o padrão de identificação das espécies estafilocócicas coagulase-positivas utilizado, segundo os testes acima citados:

Quadro 1. Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp*.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Maltose	Caldo Nitratado	APGF**
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+/-	+	-
<i>S. hiycus</i>	-	+	-

* Segundo Koneman et al., (2001).

** caldo contendo água, peptona, glicose e fosfato.

4.3. Detecção Fenotípica dos Fatores de Virulência

4.3.1. Produção de “slime” em microplaca

Os isolados foram semeados em ágar AS por 24hs a 37°C e as colônias foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo caldo tripticase soja (Britania) a 0,24% de glicose, e novamente incubadas sem agitação para permitir a sedimentação. Após descarte do caldo vertendo-se a microplaca, os poços foram lavados com água destilada e corados com fucsina em temperatura ambiente. A produção de “slime” foi observada como uma película aderida à parede do fundo (CHRISTENSEN et al., 1985). Os resultados foram avaliados segundo escala: ausente (-), fraco (+), moderado (++) e forte (+++).

4.3.2. Produção de “slime” em ágar Vermelho Congo

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

4.3.3. Produção de hemolisinas e sinergismo hemolítico (SHA)

Os isolados foram semeados através de estrias radiais em AS para avaliação da produção de halos de hemólise após 24hs a 37°C.

O SHA foi avaliado através do inóculo de *S. aureus* produtor de beta hemolisina em AS e os isolados foram semeados próximos a este. Uma zona de hemólise total dentro da zona parcial de beta hemolisina foi considerada como SHA positivo (DEMO,1996).

4.4. Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos foram submetidos aos testes de suscetibilidade segundo os padrões do Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI, 2005).

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

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

4.4.1. Difusão em disco simples

A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar MH (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (KOHNER et al., 1999).

4.4.1.1. Discos de antimicrobianos

A eficácia comparativa da penicilina (10UI), oxacilina (1µg), gentamicina (10µg), vancomicina (30µg), ampicilina (10µg), e da associação ampicilina-sulbactam (10/10µg) (SENSIFAR-CEFAR[®]) foram analisadas para todos os isolados. O quadro 2 especifica as zonas de inibição do diâmetro avaliado em milímetros dos antimicrobianos utilizados.

Quadro 2. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.

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

4.4.2. Teste de suscetibilidade aos betalactâmicos

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

4.4.2.1. Difusão em disco modificada

Nesta técnica de difusão em disco, o meio utilizado - ágar MH - foi suplementado com 4% de NaCl. A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido (ágar MH) com o auxílio da alça de Drigalski. Após incubação por 24 horas a 37⁰C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos em milímetros. Os diâmetros acima de 13 mm indicavam a sensibilidade da amostra ao antibiótico (KOHNER et al., 1999).

4.4.2.2. Ágar “screen”

O desenvolvimento desta técnica se fez através da diluição da oxacilina (1,0mg/mL) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de meio de cultura (MH), suplementado com 4% de NaCl. Os isolados foram semeados com o auxílio da alça de platina em 4 estrias por placa. Após 24 horas de incubação a 37°C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (KOHNER et al., 1999).

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

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/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, 16,0µg/mL, 32,0µg/mL, 64,0µg/mL, 128,0µg/mL até 256,0µg/mL em caldo MH suplementado com 2% de NaCl.

Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana foi adicionada a 0,9 mL de caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico e incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos tubos. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração da droga presente no caldo MH. Logo, o valor da concentração do caldo posterior ao último que apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (KOHNER et al., 1999).

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

O método da microdiluição em ágar também permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/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, 16,0µg/mL, 32,0µg/mL, 64,0µg/mL, 128,0µg/mL até 256,0µg/mL em ágar MH.

Os isolados foram repicados no ágar MH contendo as distintas concentrações de oxacilina e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi avaliado através do crescimento da colônia no ágar. Logo, o valor da concentração do ágar posterior ao que apresentou o último crescimento bacteriano, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (KOHNER et al., 1999).

4.4.2.3. Teste de suscetibilidade à cefoxitina

A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar MH (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. O disco de cefoxitina (30 µg) foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37⁰C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (KOHNER et al., 1999). Diâmetro acima de 19 mm indicou sensibilidade ao antibiótico.

4.5. Produção de betalactamases

É um teste cromogênico que detecta a capacidade da beta-lactamase hidrolisar o anel beta-lactâmico através de uma cefalosporina cromogênica, ocorrendo uma mudança de cor quando houver ruptura do anel beta-lactâmico (REIS et al., 2001). A metodologia foi realizada segundo as recomendações técnicas do fabricante, na qual um fragmento de cada colônia foi colocado na superfície da fita e a coloração branca indicou prova positiva e conseqüente produção de betalactamase (Probac do Brasil).

4.6. Biotipificação de *S.aureus*

4.6.1. Produção de estafiloquinase

Foi agregado fibrinogênio (Sigma) dissolvido em solução salina a 0,1%, ao ágar nutritivo e aquecido a 55°C durante 10 minutos a fim de precipitar a fibrina. Imediatamente antes de verter o meio de cultura nas placas foi adicionado plasma

canino (0,5%) e uma placa sem plasma canino foi utilizada como controle negativo. As placas contendo o inóculo foram incubadas durante 24hs a 35°C. A presença de zonas claras ou de lises ao redor das colônias indicou a ação da estafiloquinase produzida (DEVRIESE, 1984).

4.6.2. Produção de β -hemólise

Os isolados foram inoculados em placas de ágar sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado) e incubados a 37°C durante 24hs. A presença de zonas de hemólise parcial rodeando as colônias indicou prova positiva (DEVRIESE, 1984).

4.6.3. Coagulação de plasma bovino

A 0,1mL de cultivo bacteriano de 18hs foi adicionado 0,5mL de plasma bovino diluído 1:3 em solução fisiológica. Os tubos foram incubados por 6-24 horas a 37°C e observados após 4h, 6h, 18h e 24h para a visualização da formação de coágulo (DEVRIESE, 1984).

4.6.4. Crescimento em ágar cristal violeta

Os isolados foram inoculados em ágar simples contendo 6 μ g/mL de cristal violeta e incubados durante 24hs a 37°C. Após este período foram observadas as colorações e os tipos de colônias crescidas, sendo os isolados foram classificados:

A: colônias amarelas com ou sem margens violetas.

C: colônias azuis ou violetas com ou sem a presença de uma borda alaranjada.

Após os resultados das quatro provas, se definiu o ecotipo (quadro 3).

Quadro 3. Classificação de *S.aureus* em ecovares proposta por Devriese (1984)

BIOTIPO*	Estafiloquinase	B-hemólise	Coagulação de plasma bovino	Crescimento em ágar cristal violeta**
Humano	+	-/+	-	C
Bovino	-	+	+	A
Aviário	-	-	-	A
NE 1	-	+	-	C
NE 2	-	+	-	A
NE 3	+	+	-	A
NE 4	+	+	-	A
NE 5	-	-	-	C

* NE: não específico ** A: colônias amarelas com ou sem margens violetas, C: colônias azuis ou violetas com ou sem a presença de uma borda alaranjada.

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

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

4.7.1. Extração do DNA bacteriano

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

No presente trabalho foram desenvolvidos os protocolos de extração segundo Pacheco et al. (1997) e Coelho et al. (2007), porém em ambas as técnicas não foram obtidas quantidade e qualidade de DNA adequadas. Portanto foi realizada a extração do DNA segundo protocolo de Senna et al., (2002) onde cada colônia crescida em ágar Trypticaseína 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 12.000 rpm por 2 min. Após três lavagens com tampão TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA – ph 8.0) foram adicionadas 4U de lisostafina (Sigma) a 100µl de TE contendo o precipitado. Após incubação à 37°C por 30 minutos, os microtubos foram levados ao banho-maria a 100°C por 10 minutos, e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 500 µl de tampão (SENNA et al., 2002).

4.7.2. Amplificação dos genes através da técnica de PCR

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 10X (10 mM Tris_HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de Cl₂Mg, 1mM de cada iniciador (Bioneer- Seul, Coréia do Sul), 0,2 mM de dNTP (Fermentas-Burlington, Canadá) e 2 U de *TAQ* polimerase (Fermentas- Burlington, Canadá) em um volume total de reação de 20µl contendo 5µl do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002).

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

4.7.2.1. Genes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-positivos

Todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR para identificação genotípica das espécies *S.aureus* (*DNAr*) (STRAUB et al., 1999), *S.intermedius* (*nuc 3 e 4*) e *S.hyicus* (*nuc 1 e 2*) (SILVA et al., 2003), independente dos resultados obtidos através das provas fenotípicas anteriormente realizadas. Os iniciadores e ciclos utilizados estão expostos no quadro 4.

Quadro 4. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de identificação das espécies.

Gene (fragmento)	Espécies	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
DNAr (930 pb)	<i>S.aureus</i>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1
<i>nuc3</i> e 4 (431pb)	<i>S.intermedius</i>	GCC CCT GCA ATG AGA GG CGG ACC ACT TTC CGT C	2
<i>nuc 1</i> e 2 (330 pb)	<i>S.hyicus</i>	CGC CGT TCT CTC TTT GG CGC CTC TCA CAT CCG	2

*1. (94°C 40s., 64° C 1 min., 72°C 1 min 12s.) x 30 ; 2. (95°C 50s., 42°C 2 min., 72°C 4 min) x 40 e 72°C 1 min.

4.7.2.2. Genes de virulência de *Staphylococcus* spp coagulase-positivos

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação dos genes envolvidos na produção de “slime”, *icaA* e *icaD* (VASUDEVAN et al., 2003) e PCR multiplex para os genes de produção de hemolisinas, *hla* e *hlb* (NILSSON et al.,1999) em todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos. Os iniciadores e ciclos utilizado estão expostos no quadro 5.

Quadro 5. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

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

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

4.7.2.3. Genes de virulência de *Staphylococcus aureus*

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação do gene de coagulase, *coa* (KARAHAN ; CETINKAYA, 2006), de proteína A, *spaA* (REINOSO, 2004) e de regulação de exorproteínas, *agr* (RNA III) (REINOSO, 2004) em *S.aureus*. Os iniciadores e ciclos utilizado estão expostos no quadro 6.

Quadro 6. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus aureus*.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>agr</i> (v**)	CAT AGC ACT GAG TCC AAG GA CAA TCG GTG ACT TAG TAA AAT G	1
<i>spaA</i> (v)	CAA GCA CCA AAA GAG GAA GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC	2
<i>coa</i> (v)	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	3

*1. 94°C 3min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 2. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 3. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min. ** variável

4.7.2.4. Genes de resistência de *Staphylococcus* spp coagulase-positivos

Foi realizada a técnica de PCR para a possível amplificação dos genes *mecA* (COELHO et al.,2007) e *femA* (ZOCCHÉ et al., 2006) em todos os *Staphylococcus* spp coagulase-positivos. Os iniciadores e ciclos utilizado estão expostos no quadro 7.

Quadro 7. Iniciadores e ciclos empregados nos ensaios de amplificação dos genes de resistência de *Staphylococcus* spp coagulase-positivos.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos
<i>femA</i> (132pb)	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	1
<i>mecA</i> (513pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1

*1. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min 30s) x 30 e 72°C 5min.

4.7.3. Técnica de RAPD

As concentrações utilizadas em todas as reações de RAPD-PCR foram Tampão 10X (10 mM Tris_HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de ClMg₂, 5pmol de cada iniciador (Bioneer) (quadro 7), 0,2 mM de dNTP (Fermentas) e 2 U de *TAQ* polimerase (Fermentas) em um volume total de reação de 20µl contendo 5µl do DNA extraído.

Foram utilizados 4 iniciadores (quadro 8) com a finalidade de se escolher os dois que apresentassem maior número de bandas, intensidade e alta reprodutibilidade. A reação foi programada para desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto; seguida de 4 ciclos de 94°C por 5 minutos; 37°C por 5 minutos e 72°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 37 °C 1 minuto e 72°C 2 minutos e, extensão final de 72°C 10 minutos (REINOSO, 2004).

Quadro 8. Iniciadores utilizados na técnica de RAPD.

Nome	Iniciadores (5' - 3')
OLP 6	P6- GAGGGAAGAG
OLP 11	P11- ACGATGAGCC
OLP 13	P13- ACCGCCTGCT
OLP 14	P14- ACCACCCACC

Os produtos da reação foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os perfis eletroforéticos obtidos foram definidos pela intensidade, presença e ausência de bandas e, considerados diferentes quando, pelo menos, uma banda polimórfica fosse detectada.

Para a investigação da diversidade e das relações de clonalidade entre as sub-populações bacterianas, os perfis de amplificação foram submetidos à análise visual e automatizada com auxílio do software do programa QuantiOne (BIORAD).

4.8. Análise estatística

Os perfis de suscetibilidade aos fármacos testados foram expressos em porcentagens que foram analisadas de forma descritiva.

Os percentuais de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) dos testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina foram calculados considerando a presença do gene *mecA* como predição para a resistência á oxacilina, seguindo as fórmulas abaixo:

% Sensibilidade = verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos negativos

% Especificidade= verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos positivos

% VPP= verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos positivos

% VPN= verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos negativos

A associação entre os testes fenotípicos e genotípicos foi avaliada através do Teste de Qui-quadrado (X^2) e Fisher, com intervalo de confiança de 95% (IC=95%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-positivos

Após a semeadura de 228 amostras de leite, foi possível isolar um total de 150 *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos expostos na Tabela 2.

Tabela 2. *Staphylococcus* spp.coagulase-positivos isolados de diferentes propriedades e respectivas cidades.

Identificação das Propriedades	Cidades	Isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos
1	QUATIS	1, 2, 3, 4, 5, 129,130,131,132,133,125,127,128
2	QUATIS	6, 7, 134,135,136
7	QUATIS	34
11	QUATIS	45
3	JUIZ DE FORA	8, 9, 10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23, 126
25	JUIZ DE FORA	135,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,14 7,148,149,150
4	SEROPÉDICA	24,25,26,27,28,29,127
6	SEROPÉDICA	31,32,33
8	SEROPÉDICA	35,36,37,38
10	SEROPÉDICA	41,42,43,44,45
5	RESENDE	30
9	RESENDE	39,40
17	RESENDE	78,79,80,81,82,83
18	RESENDE	84,85,86,87,88,
19	RESENDE	89,90
20	RESENDE	91,92
12	BARRA MANSA	46,47,48,49,50,51,52,60,125,128
14	BARRA MANSA	61,62,63,64,65
15	BARRA MANSA	66,67,68,69,70,71,72,73,126
16	BARRA MANSA	74,75,76,77
13	RIO DE JANEIRO	53,54,55,56,57,58,59
21	RIO DE JANEIRO	93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,10 6,107
22	RIO DE JANEIRO	108,109,110,111,112,113,114,115
23	VASSOURAS	116,117,118,119,123,124
24	VASSOURAS	120,121,122

Para a amplificação dos genes de identificação das espécies (figura 4) e de todos os outros propostos, a extração do DNA que melhor proporcionou quantidade e material de qualidade foi através do protocolo utilizando-se a lisostafina.

Através da identificação genotípica das espécies, foi encontrado um total de 34% (50/150) de *S.aureus*, 22% de *S.intermedius* (34/150), 12% de *S.hyicus* (18/150) e 48% (48/150) dos isolados foram classificados como *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos, pois não apresentaram os genes específicos para as espécies identificadas fenotipicamente. As espécies identificadas e as propriedades estão expostas no anexo I.

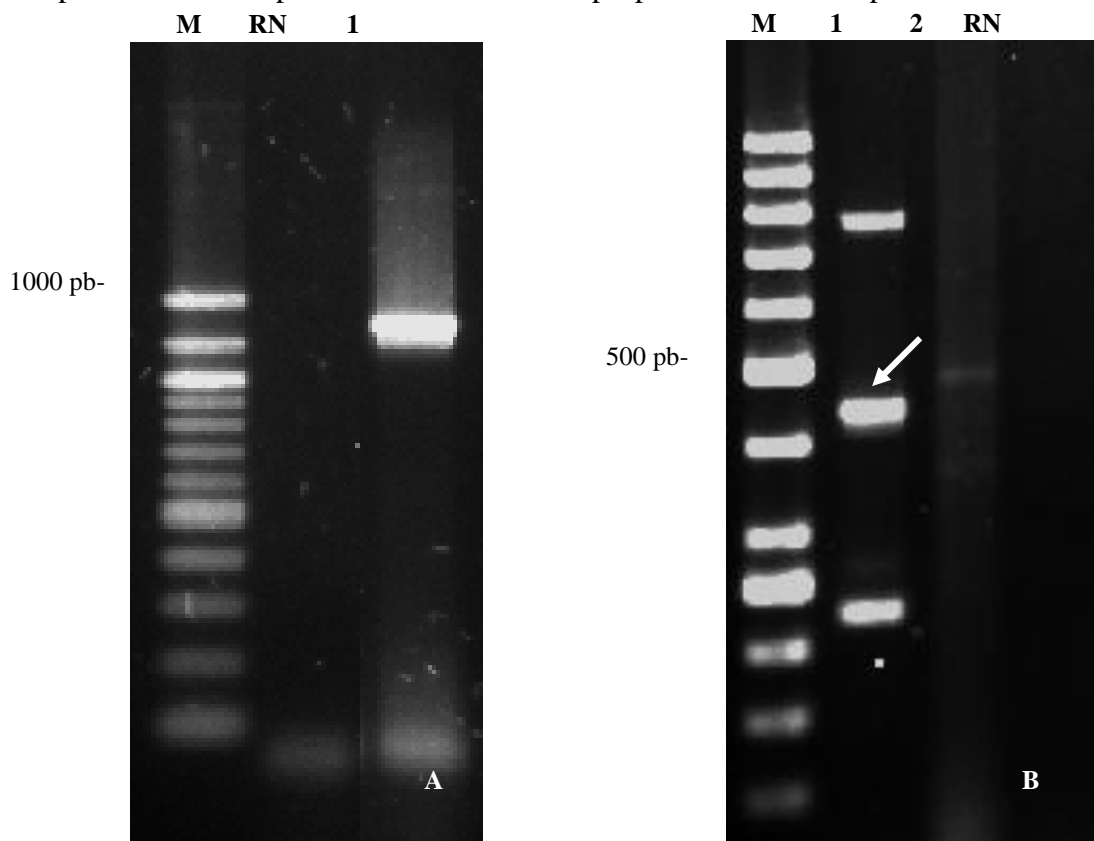


Figura 4. Genes de identificação das espécies *S.aureus* e *S.intermedius* isolados de mastite bovina em gel de agarose 1%. **A:** gene *DNAr* de *S.aureus* (930pb). M: marcador de peso molecular (50pb), RN: Reação negativa, 1: isolado 7. **B:** gene *nuc* 3 e 4 de *S.intermedius* (431 pb). 1: isolado positivo (2), indicado pela seta. M: marcador de peso molecular (50pb), 2: isolado negativo (21), RN: Reação negativa.

O gene *nuc* de *S.intermedius* amplificou mais de um fragmento, porém apresentou a banda esperada de 431pb corroborando com os resultados obtidos por Silva et al. (2003), que também encontrou tal perfil. Temperaturas de anelamento menores que 50°C podem possibilitar ampliações inespecíficas e, como a enzima *Taq* DNA polimerase apresenta uma velocidade de catálise média de 1000 bases por minuto, o tempo de extensão utilizado neste estudo também poderia estar acima do necessário para a síntese dos fragmentos propostos, o que possibilitaria que a enzima atuasse de forma inespecífica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Outra explicação para esta alta variabilidade, seria que o gene alvo para os *primers* NUC3 e NUC4 (gene *nuc*) apresenta seqüências de bases nitrogenadas repetitivas, que permitiriam o anelamento dos *primers* em mais de um ponto, originando fragmentos amplificados com tamanhos diferentes (SILVA et al.,2003)

Após a detecção dos genes, os três testes bioquímicos (produção de acetoina, fermentação da maltose e redução de nitratos) utilizados na identificação fenotípica das espécies estafilocócicas foram avaliados quanto à sua sensibilidade, utilizando como padrão ouro a detecção dos genes específicos. Os resultados indicaram que a metodologia de identificação fenotípica apresentou sensibilidade acima de 83%. Muitos autores indicam que é necessária a execução de mais testes fenotípicos para identificação de estafilococos, uma vez que os testes devem apresentar uma sensibilidade mais próxima de 100% (CHRISTENSEN et al, 1982; BENTLEY et al., 1967). Em função disso é importante reconhecer que não existe uma técnica de tipificação que permite uma diferenciação definitiva (com exceção do sequenciamento do genoma completo). Portanto é de fundamental importância o estabelecimento de critérios de utilização destes métodos para que os resultados obtidos sejam reprodutíveis e precisos (REINOSO,2004).

A espécie *Staphylococcus aureus* apresentou prevalência superior quando comparadas outras espécies identificadas, corroborando com trabalho desenvolvido por Langoni et al. (2000) que trabalhando com 7902 e 850 amostras de leite provenientes de casos de mastites subclínicas e clínicas, respectivamente, onde o agente foi encontrado em 32,68% das amostras de casos clínicos e 18,88% dos casos subclínicos, com isolamento de *S.aureus* em 22,48% dos casos clínicos e em 11,38% dos subclínicos. Brabes et al. (1999) relataram que em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, o *Staphylococcus aureus* está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros. As taxas de isolamento de *S.aureus* são variáveis de acordo com diferentes autores, entretanto, o mesmo tem sido considerado como de maior significado nas infecções intramamárias. Castrejón e Perea (1994) relataram a sua presença em 85% dos 50 casos de mastite clínica, e Obritzhauser, Deutz et al., (1995) em 27,3% dos casos.

De acordo com Waage et al., (1999), Freitas et al., (2005) e Cunha et al., (2006) outras espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos também podem ser agentes etiológicos de mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros. Em estudo desenvolvido por Moroni et al., (2006), verificou-se que o *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* foram isolados em 12,20% e 4,88%, respectivamente, das 82 amostras avaliadas. A importância de *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* é pouco discutida na etiologia das mastites, sendo espécies mais associadas a cães e suínos respectivamente. Provavelmente, o contato íntimo de outros animais com bovinos nas propriedades pode ter favorecido a contaminação das vacas leiteiras.

5.2. Perfil de suscetibilidade dos *Staphylococcus* spp coagulase-positivos

Após o teste de difusão em disco, os percentuais de resistência foram avaliados considerando todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (figura 5).

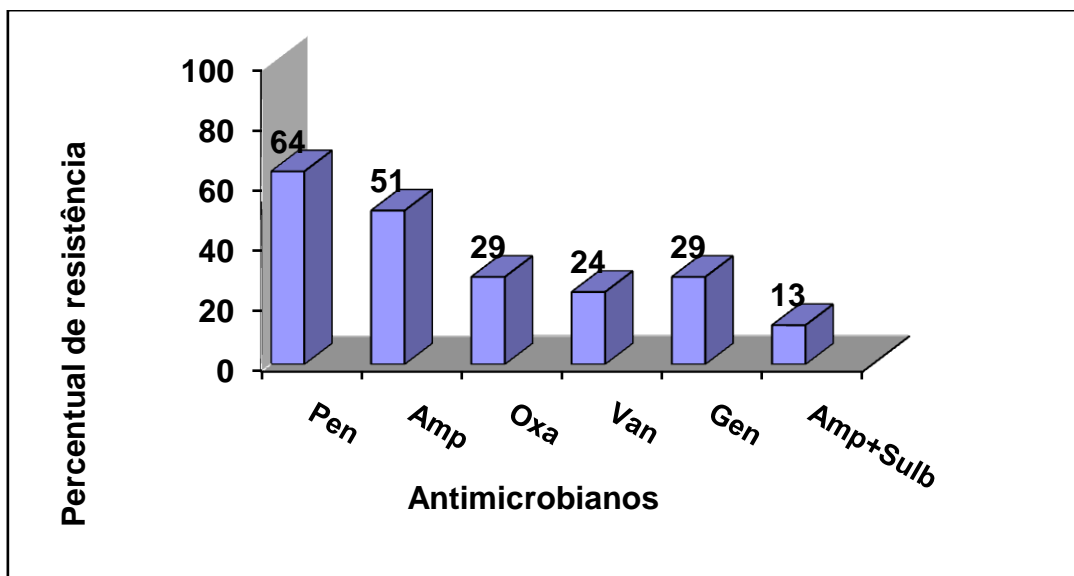


Figura 5. Gráfico apresentando o percentual de resistência dos *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina.

Foi encontrado um percentual de resistência à penicilina de 64%. No Brasil, mais de 70% das cepas de *Staphylococcus aureus* mostram-se resistentes às penicilinas, por isso seu uso não é mais indicado em infecções por estes microrganismos (COSTA et al., 1994). Em trabalho desenvolvido, em 9 países europeus, por Vintoy et al., (2003), um total de 32,4% dos 815 *S.aureus* isolados de mastite bovina foram resistentes à penicilina e Corrêa (2003) analisou 95 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite mastítico bovino no Brasil e observou um percentual mais elevado de resistência à ampicilina (78,94%) e penicilina (77,98%). Acredita-se que tais achados possam ser atribuídos a provável capacidade de produção da beta-lactamase das cepas isoladas (ARCHER et al., 1994), a freqüente utilização destes princípios ativos nas propriedades objeto desta investigação (FREITAS et al., 2005) e ao uso inadequado destes medicamentos (FAGLIARI et al., 1990; ANDRADE et al., 2000). Os betalactâmicos são freqüentemente utilizados no tratamento da mastite bovina no Brasil e os antimicrobianos mais utilizados, como a penicilina e ampicilina são os que freqüentemente induzem a resistência devido ao uso indiscriminado (COELHO et al., 2007).

O percentual de resistência à gentamicina (29%) é considerado elevado quando comparado ao trabalho desenvolvido por Langoni et al. (2000) que revelaram a gentamicina como o antibiótico que apresentou maior (98,6%) ação “in vitro” sobre os *S. aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2002), Nader Filho et al e Andrade et al. (2000), cujos valores de resistência foram de 0%, 5,4% e 4,9% , respectivamente. Todavia, Domingues et al. (1994), Costa et al. (2000) e Freitas et al. (2005), obtiveram valores de sensibilidade inferiores, quais sejam, 20%, 46% e 51%, respectivamente. Apesar dos distintos percentuais de resistência, acredita-se que os resultados obtidos possam corroborar com a afirmação de Langoni et al. (2000), segundo a qual a gentamicina continua sendo um antibiótico eficaz no tratamento das mastites bovinas de origem estafilocócica.

No presente trabalho o percentual de resistência à oxacilina foi de 29%. Brito et al. (2001) comprovaram que todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de infecções intramamárias bovinas no Brasil foram sensíveis à oxacilina. Resultados de outros estudos também indicam resistência à oxacilina, porém sempre a associam a *Staphylococcus* spp. isolados de humanos e discutem que este não é um problema de

grande importância na Medicina Veterinária (DE OLIVEIRA et al., 2000; GENTILINI et al., 2000). A resistência à oxacilina é um problema cosmopolita e a sua resistência indica que os demais betalactâmicos também serão de pouca eficácia limitando assim as alternativas de tratamento (ERSKINE et al., 2004). Uma das principais alternativas no tratamento das infecções causadas por estafilococos resistentes à oxacilina é a utilização da vancomicina. No presente estudo foi encontrado um percentual de 24% resistência, contrapondo resultados encontrados por Freitas et al. (2005) que avaliaram o perfil de suscetibilidade de 59 *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de leite mastítico e verificaram 100% de sensibilidade à vancomicina. Apesar do teste de difusão em disco ser o mais utilizado para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana é necessário que se estabeleça a concentração inibitória mínima para a confirmação da resistência à vancomicina, pois a emergência mundial de clones bacterianos de origem animal resistentes a glicopeptídeos 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 enterococos resistentes à vancomicina (VRE), a explicação apontada para a seleção dos clones resistentes é a 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. Adicionalmente, 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 (CHANG et al., 2003). Sabe-se que países europeus adotaram um forte programa de abolição do uso de promotores de crescimento e monitoramento da resistência antimicrobiana em isolados de origem animal. 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 (SAHA et al., 2008). Considerando o percentual bastante significativo, 24% de resistência a vancomicina nos isolados testados, deve-se em etapa futura aprofundar a avaliação da resistência a vancomicina por distintos métodos fenotípicos, como também pela detecção do gene *vanA*.

Foi encontrado um percentual de resistência de 13% à associação entre penicilina e sulbactam. Em trabalho desenvolvido por Calvinho et al., (2002) todos os *S.aureus* foram sensíveis à associação de amoxicilina e ácido clavulânico e, De Oliveira et al.,(2000) também reportaram a favorável atividade da associação entre penicilina e ácido clavulânico frente a estafilococos. Acredita-se a resistência a esta associação se deva principalmente à hiperprodução de betalactamases.

O percentual de resistência também foi calculado considerando cada espécie identificada (figura 6) e não foi encontrada diferença significativa entre os percentuais de resistência avaliados em *S.aureus* e *S.intermedius* que são os agentes do gênero mais comumente envolvidos na mastite bovina.

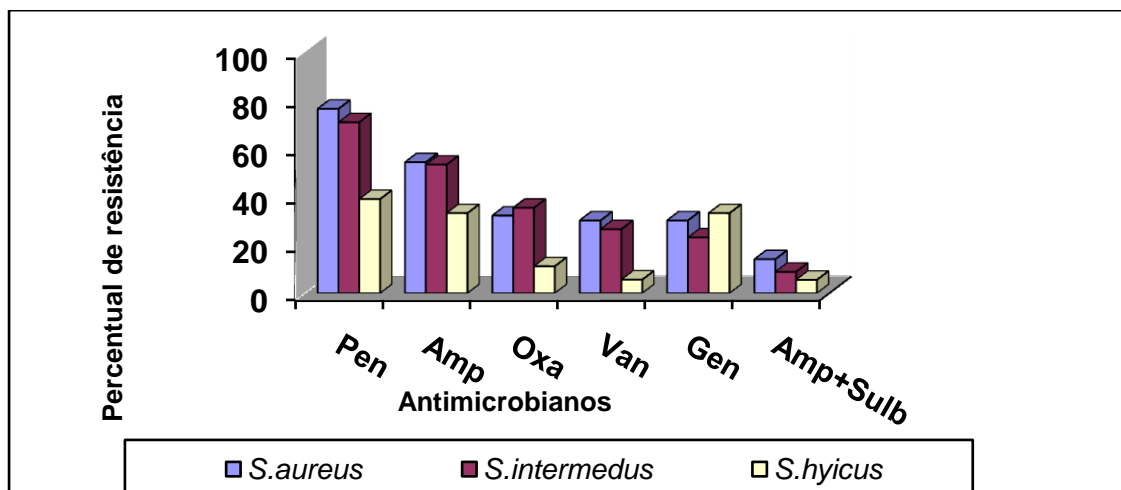


Figura 6. Gráfico apresentando o percentual de resistência das diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase positivas isoladas de mastite bovina.

Os *Staphylococcus* spp. foram classificados em antibiotipos segundo os seus perfis de suscetibilidade. A tabela 3 apresenta a frequência dos 20 perfis estabelecidos.

Tabela 3. Antibiotipos de todos os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (n=150) isolados de mastite bovina.

Antibiotipos	Resistência aos antimicrobianos*	Freqüência	Percentual
1	PEN, AMP e GEN	12	8%
2	PEN e AMP	31	20,6%
3	PEN, AMP, GEN, OXA, VAN e ASB	16	10,6%
4	PEN, AMP, OXA e VAN	2	1,3%
5	- **	45	30%
6	PEN, AMP, VAN e ASB	1	0,6%
7	PEN, AMP, GEN, OXA e VAN	4	2,6%
8	AMP	2	1,3%
9	PEN, AMP, OXA, VAN e ASB	2	1,3%
10	PEN, AMP, GEN e ASB	1	0,6%
11	PEN, AMP, GEN e VAN	1	0,6%
12	PEN	8	5,3%
13	PEN e OXA	4	2,6%
14	PEN, GEN, OXA e VAN	2	1,3%
15	PEN, OXA e VAN	8	5,3%
16	PEN, AMP e OXA	2	1,3%
17	AMP e GEN	1	0,6%
18	GEN	5	3,3%
19	OXA	2	1,3%
20	PEN, AMP, GEN e OXA	1	0,6%

* PEN: penicilina, AMP: ampicilina, OXA: oxacilina, AMO: amoxicilina, VAN: vancomicina, GEN: gentamicina, ASB: ampicilina + sulbactam. ** Sensíveis a todos os antimicrobianos testados

O antibiotipo de maior frequência foi o de sensibilidade a todos os antimicrobianos (perfil 5), seguido dos perfis 2 e 3, que representa resistência à

penicilina e ampicilina e, à penicilina, ampicilina e gentamicina, respectivamente. É possível utilizar característica de suscetibilidade “in vitro” para estabelecimento de proximidade clonal entre os isolados de distintas propriedades considerando os antibiogramas encontrados. Estes resultados podem indicar diferenças de manejo e prática de antibioticoterapia e particularmente o tipo de antimicrobiano frequentemente utilizado.

Devido ao fato do perfil predominante ter sido o de sensibilidade a todos os antimicrobianos (30%), esta técnica não apresentou elevada capacidade discriminatória dos isolados. Porém foi possível diferenciar os perfis encontrados nas distintas espécies identificadas (tabela 4).

Tabela 4. Antibiogramas das diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivas (n=150) isoladas de mastite bovina.

Antibiogramas*	<i>S.aureus</i> (n/%)	<i>S.intermedius</i> (n/%)	<i>S.hyicus</i> (n/%)
1	5 / 10	-	3 / 16,6
2	10 / 20	10 / 29,4	1 / 5,5
3	7 / 14	3 / 8,8	1 / 5,5
4	2 / 4	-	-
5	10 / 20	9 / 26,4	9 / 50
7	1 / 2	3 / 8,8	-
8	1 / 2	1 / 2,9	-
11	1 / 2	-	-
12	4 / 8	2 / 5,8	1 / 5,5
13	2 / 4	2 / 5,8	-
14	-	2 / 5,8	-
15	6 / 12	1 / 2,9	-
16	-	1 / 2,9	1 / 5,5
18	1 / 2	-	2 / 11

* Os perfis 6, 9, 10, 17, 18, 19 e 20 foram encontrados em *Staphylococcus* spp. não identificados.

Os perfis 3 e 15 (resistência à maioria dos antimicrobianos) apresentaram prevalência superior em *S.aureus* confirmando a elevada resistência desta espécie e apontando para necessidade de um melhor monitoramento antimicrobiano em mastites causadas por tal agente. Ainda que o controle da mastite seja fundamentado na adoção de medidas higiênico-sanitárias, a antibioticoterapia pode exercer um importante papel especialmente se considerada a possibilidade da redução das infecções intramamárias e, a conseqüente eliminação das prováveis fontes de infecção. Porém, o elevado custo dos exames laboratoriais tem inibido a realização do isolamento, identificação e dos testes de sensibilidade “in vitro” dos agentes etiológicos da mastite bovina (FREITAS et al., 2005). Desse modo, na maioria das vezes, a escolha do medicamento anti-mastítico tem se baseado apenas no quadro clínico da enfermidade (FAGLIARI et al., 1990). Diante destes fatos, prejuízos ainda maiores têm sido experimentados pelos produtores rurais em decorrência dos insucessos obtidos no tratamento da mastite bovina (FREITAS et al., 2005).

5.2.1. Resistência aos betalactâmicos

5.2.1.1. Produção de betalactamases

Um total de 94,6% (n=142) dos isolados foram positivos para a produção de betalactamases e dentre os isolados negativos (n=8) apenas 1 apresentou resistência à penicilina e ampicilina sendo os outros sensíveis a todos os outros antimicrobianos. Em trabalho desenvolvido por De Oliveira et al. (2000), de 811 isolados de *S.aureus* testados, 57% foram positivos para a produção da enzima. A produção de betalactamase em conjunto aos testes de suscetibilidade podem ser utilizados como métodos rápidos de detecção de resistência aos betalactâmicos, principalmente à penicilina (OSTERA et al.,1999).

5.2.1.2. Testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina e gene *mecA*

De acordo com os resultados dos cinco testes fenotípicos de avaliação da suscetibilidade à oxacilina realizados, os isolados apresentaram 27 perfis de suscetibilidade (tabela 5), confirmando a heterogeneidade da resistência dos *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos à oxacilina.

Tabela 5. Perfis de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de *Staphylococcus* spp. (n=150) nos distintos testes fenotípicos.

Perfis (nº de isolados)	Testes				
	Difusão em disco simples	Difusão em disco modificada	Ágar “screen”	CIM* Placa	CIM* Caldo
1 (21)	S	R	R	S	R
2 (15)	S	S	S	S	R
3 (12)	S	S	S	R	R
4 (12)	S	R	S	R	R
5 (9)	S	R	R	R	R
6 (9)	S	S	S	S	S
7 (7)	R	R	R	R	R
8 (6)	R	R	S	R	R
9 (6)	R	R	R	S	R
10 (5)	S	R	S	S	R
11 (4)	R	R	S	S	R
12 (4)	R	S	S	S	R
13 (4)	S	S	R	S	R
14 (4)	S	S	R	R	R
15 (4)	S	S	R	R	S
16 (3)	R	R	R	S	S
17 (3)	R	S	S	S	S
18 (3)	R	S	S	R	S
19 (3)	S	S	S	R	S
20 (3)	R	R	R	R	S
21 (3)	S	R	R	S	S
22 (2)	R	S	S	R	R
23 (2)	S	R	S	S	R
24 (2)	R	R	S	R	S
25 (2)	S	R	S	S	S
26 (1)	R	R	S	S	S
27 (1)	S	S	R	S	S

* Concentração Inibitória Mínima

O reconhecimento desta heteroresistência vem sendo um problema, devido às diferenças de características de crescimento. Possivelmente uma população heteroresistente contenha tanto organismos suscetíveis que exibam crescimento atípico de estafilococos não-heteroresistentes, quanto organismos resistentes que cresçam mais lentos, ou em condições distintas de temperatura e concentração de NaCl (AARESTRUP et al., 1991).

Após os testes fenotípicos, os isolados foram avaliados quanto à presença do gene *mecA* através da técnica de PCR e um total de 70,7% (n = 106) dos isolados foi positivo (figura 7). Gortel e colaboradores (1999) obtiveram 54% de amostras de estafilococos positivas para o gene *mecA*. Um percentual mais elevado foi encontrado em trabalho desenvolvido por Grisold (2002), cujos autores detectaram 108 genes *mecA* em 109 isolados de MRSA.

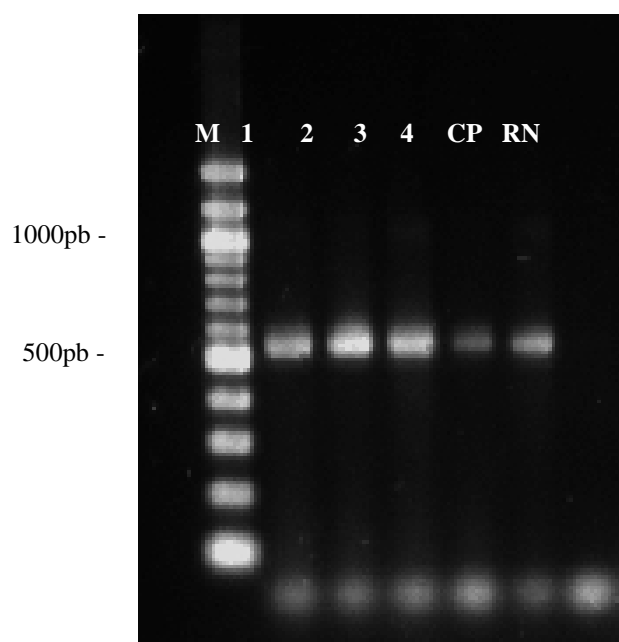


Figura 7. Gene *mecA* (513 pb) de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina em gel de agarose a 1%. M: marcador de peso molecular (100pb); 1-4: isolados positivos (1, 3, 4 e 6); CP: controle positivo; RN: reação negativa.

Os testes fenotípicos foram avaliados quanto à sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativos e positivos, considerando o fato de que uma vez positivo ou negativo para o gene de resistência, o isolado deveria apresentar-se resistente ou sensível, respectivamente, no teste fenotípico. A tabela 6 apresenta os valores encontrados após a análise estatística considerando todos os *Staphylococcus* spp. e cada espécie avaliada.

Tabela 6. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de suscetibilidade à oxacilina.

Testes *	<i>S.aureus</i> (n=50)				<i>S.intermedius</i> (n=34)				<i>Staphylococcus spp.</i> (n=150)			
	**S	E	VPP	VPN	S	E	VPP	VPN	S	E	VPP	VPN
DD	32,5	60	76	18	39,2	83,3	91,6	22,7	33	84	84,6	49
DM	78,7	11,7	63,4	22,2	55,1	0	76,2	0	36	51	63,3	47,2
AS	64,1	27,7	75,7	17,6	46,4	50	81,2	16,6	59,4	70	86,6	50,1
MC	87,5	0	77,7	0	75	16,6	80,7	12,5	75	21	60,3	62,5
MP	57,5	50	82,1	22,7	71,4	83,3	95,2	38,4	47	37	63,3	48,8

* Testes de suscetibilidade à oxacilina = DD: difusão em disco simples, DM: difusão em disco modificada, AS: ágar “screen”, MC: microdiluição em caldo, MP: microdiluição em placa. **S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo.

Foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a sensibilidade e especificidade dos testes avaliados quando os estafilococos foram considerados como um único grupo (*Staphylococcus spp.* coagulase-positivos) e quando as espécies foram analisadas separadamente.

O teste de ágar “screen” (figura 8) foi o mais específico e sensível quando os estafilococos foram avaliados juntos.

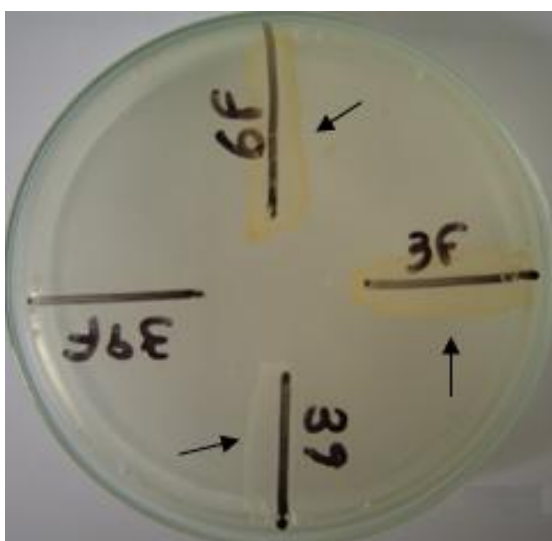


Figura 8. Resistência à oxacilina avaliada através do teste de ágar “screen”. As setas indicam as colônias crescidas em meio contendo oxacilina (6µl/mL).

Muitos trabalhos vêm validando este teste como sendo capaz de detectar isolados de *Staphylococcus spp.* resistentes à oxacilina e positivos para o gene *mecA* (SWENSON et al., 2001). Este é um teste simples e bastante econômico quando comparado aos testes de avaliação da concentração inibitória mínima, mas que deve ser executado de forma cuidadosa, onde cada colônia crescida, mesmo que pequena, deve ser considerada resistente. Deve-se também averiguar corretamente o tempo e temperatura de incubação do inóculo antes de ser utilizado, bem como dos testes. A sua sensibilidade e especificidade foram baixas quando as espécies foram avaliadas

separadamente. Essa diminuição pode ser explicada devido ao fato de que *Staphylococcus* spp. não *aureus* e não *intermedius* possam ter influenciado nestes valores.

A baixa sensibilidade encontrada no teste de difusão com disco simples é preocupante, uma vez que é o teste mais utilizado em laboratórios de rotina para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos, na técnica conhecida como antibiograma. Porém a sua elevada especificidade e valor preditivo positivo aumentam a capacidade de validação do teste, uma vez que este dificilmente apresenta isolados falso-resistentes.

Em *S.aureus* e *S.intermedius* a sensibilidade aumentou no teste de difusão em disco modificada (figura 9) quando comparada à difusão em disco simples. Em adição, os testes de microdiluição em caldo para determinação da CIM e ágar “screen” apresentaram sensibilidade superior a 46%. Os resultados encontrados corroboram com dados da literatura, que afirmam que a adição de 2% ou 4% de NaCl é ideal para uma detecção fidedigna da expressão da resistência antimicrobiana (SWENSON et al., 2001).

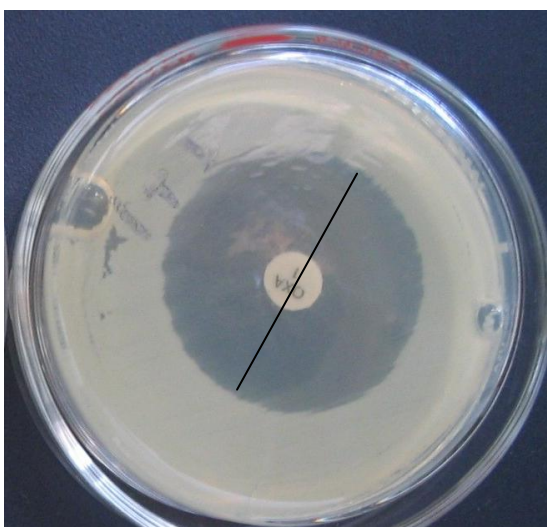


Figura 9. Resistência à oxacilina avaliada através do método de difusão em disco modificado. A linha demonstra o halo de sensibilidade à oxacilina avaliado em mm.

Houve diferença entre as especificidades aferidas nos testes de CIM, em ágar e em caldo. Isto pode estar relacionado ao fato que a leitura do teste em caldo se fez através da turbidez e esta pode ser subjetiva, sendo, portanto, uma prova que considera muitos isolados falso-positivos.

5.2.1.3. Teste de suscetibilidade à cefoxitina e gene *mecA*

O teste de difusão em disco utilizando-se cefoxitina foi mais sensível na detecção da resistência do que o disco de oxacilina (tabela 7) avaliados frente a todos os *Staphylococcus* spp. coagulase positivos.

Tabela 7. Percentual de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes de difusão com disco de oxacilina e cefoxitina.

Testes	<i>S.aureus</i> (n=50)			<i>S.intermedius</i> (n=34)			<i>Staphylococcus spp.</i> (n=150)					
	S**	E	VPP	VPN	S	E	VPP	VPN	S	E	VPP	VPN
OXA	32,5	60	76	18	39,2	83,3	91,6	22,7	33	84	84,6	49
CEF	77,5	20	79,4	18,1	88	12	81,4	42,8	70	27	70,2	27,5

*OXA: teste de difusão em disco para avaliação da suscetibilidade à oxacilina; CEF: teste de difusão em disco para avaliação da suscetibilidade à cefoxitina. S**: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo.

CAUWELIER et al. (2004), FELTEN et al. (2002) e SKOV et al (2003), obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade utilizando o mesmo teste para a cefoxitina. No entanto, Hussain et al. (2002), encontraram resultados muito semelhantes para a sensibilidade e especificidade da difusão em disco de oxacilina e cefoxitina. TERASAWA (2006) avaliou a detecção da resistência à oxacilina através do método de difusão em disco para a oxacilina (1µg) e cefoxitina (30µg) de acordo com as recomendações propostas pelo CLSI (2005). De acordo com os dados, não houve discrepâncias entre os resultados dos dois antimicrobianos, já que para todos os isolados a interpretação do teste foi a mesma. A sensibilidade e especificidade para os dois testes foram de 100% e 92%, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos por PALAZZO; DARINI (2006), o método de difusão em disco com cefoxitina e oxacilina podem ser utilizados como testes iniciais para determinação da suscetibilidade à meticilina em isolados de *Staphylococcus spp*, mas combinar os dois métodos poderia minimizar erros na detecção da resistência à meticilina nos isolados. A utilização do disco de cefoxitina juntamente com o disco de oxacilina em ágar suplementado com sal, a fim de aumentar a especificidade, pode ser uma alternativa para a detecção de isolados resistentes à oxacilina (SWENSON et al., 2005).

5.2.1.4. *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina

Dos 50 *Staphylococcus aureus*, um total de 80% (n=40) apresentou resistência à oxacilina em pelo menos um teste fenotípico e foi positivo para o gene *mecA*, sendo portanto, classificados como *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (ORSA). Todos foram produtores de betalactamases e todos apresentaram resistência superior a 15% a ampicilina+sulbactam, vancomicina e gentamicina (figura 10).

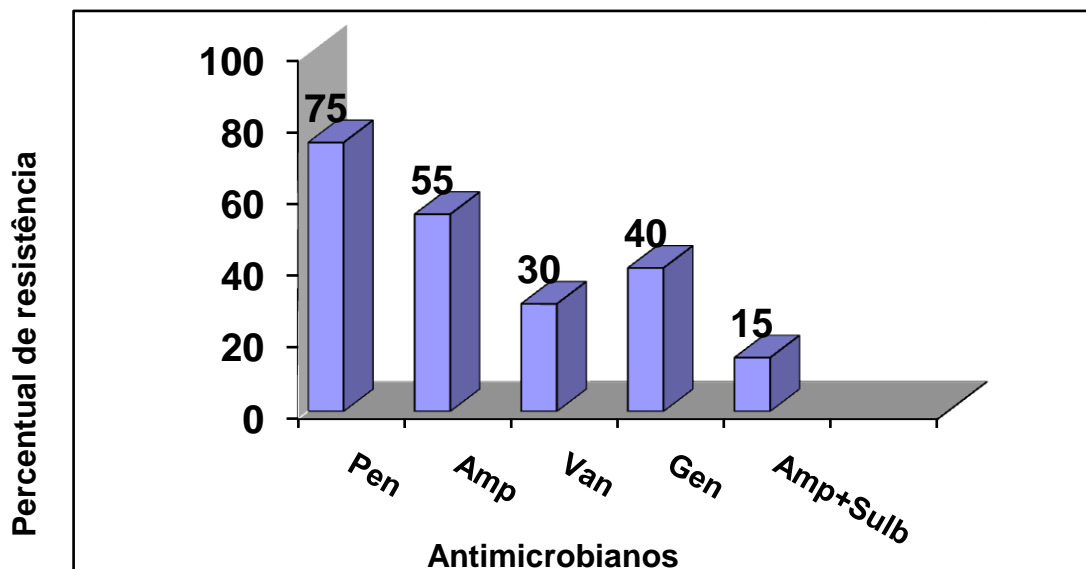


Figura 10. Gráfico apresentando o percentual de resistência dos ORSA isolados de mastite bovina aos diferentes antimicrobianos testados através da técnica de difusão em disco.

O antibiotipo prevalente (22,5%) nos isolados de ORSA foi o perfil 2 (penicilina e ampicilina resistentes), confirmando que a pressão seletiva influencia na expressão da resistência bacteriana expressam a resistência aos antimicrobianos mais utilizados na prática leiteira.

O valor encontrado de resistência à vancomicina aponta para o desenvolvimento de isolados resistentes a tal fármaco o que é preocupante, uma vez que tem sido a melhor alternativa de tratamento nas infecções causadas por MRSA. Freitas et al. (2005) observou cepas 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 microrganismos dificultando o tratamento dos animais. Martins et al. (1998) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos e aos mecanismos de transferência de resistência entre os microrganismos.

O surgimento de amostras de *Staphylococcus aureus* multirresistentes nas últimas décadas foi relacionado com a pressão seletiva exercida por antimicrobianos (FAGUNDES ; OLIVEIRA, 2004). Esta resistência proporciona às amostras ORSA uma vantagem seletiva para a colonização e infecção (STRUELLENS et al., 1992; SHLAES et al., 1997). A infecção ou colonização ORSA constitui um sério problema, uma vez que se trata de um microrganismo resistente à maioria dos antimicrobianos usualmente disponíveis para o tratamento de infecções estafilocócicas, tais como: betalactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, sulfametoxazol-trimetoprima e outros (GONÇALVES et al., 2007).

Ainda que o controle da mastite fundamente-se principalmente nas medidas higiênico-sanitárias, a terapia antimicrobiana exerce um papel importante no caso de infecções por patógenos contagiosos, tendo em vista a possibilidade de eliminar as infecções intramamárias e de reduzir, assim, prováveis fontes de infecção (ERSKINE et al., 1993). Considerando as perdas econômicas atribuídas à mastite e que as indicações

terapêuticas realizadas, na maioria das vezes, são de forma empírica, o estudo de sensibilidade aos antimicrobianos comumente utilizados na prática veterinária fornece dados importantes a fim de se evitar e desenvolvimento da resistência bacteriana.

5.2.1.5. *S.aureus* e gene *femA*

Apesar de a literatura descrever o gene *femA* como um marcador de espécie, no presente trabalho um total de 42% (n=21) dos *S.aureus* apresentou o gene (132 pb) (figura 11).

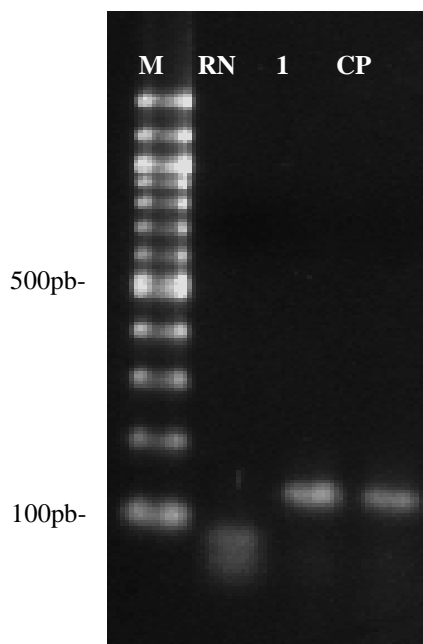


Figura 11. Gene *femA* (132 pb) de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina em gel de agarose (1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa, 1: isolado positivo (1), CP: controle positivo.

Em trabalho desenvolvido por Iamafuku et al., (1994), também não foi detectado o gene em todos os *S.aureus* e os autores relatam uma maior correlação entre este gene e a presença do gene *mecA* e conseqüente resistência à meticilina. No presente trabalho, de todos os *S.aureus* positivos para o gene *femA*, um total de 80,9% também apresentou o gene *mecA*. Segundo Vannuffel et al., (1995) o *femA* auxilia o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos beta-lactâmicos.

Estudos revelaram que a inativação do gene *femA* aumenta a suscetibilidade à meticilina em *S.aureus*. Este gene vem sendo associado a uma possível alteração na formação da cadeia de pentaglicina, alvo de alguns betalactâmicos (MAIDHOF et al.,1991).

5.3. Fatores de virulência

5.3.1. Produção de “slime” e genes *icaA* e *icaD*

Foi detectada produção de “slime” em 82,8% (n= 125) dos *Staphylococcus* spp. testados através da técnica utilizando microplaca (figura 12). Dentre estes, foi possível encontrar uma variação na produção, exposta na tabela 8.

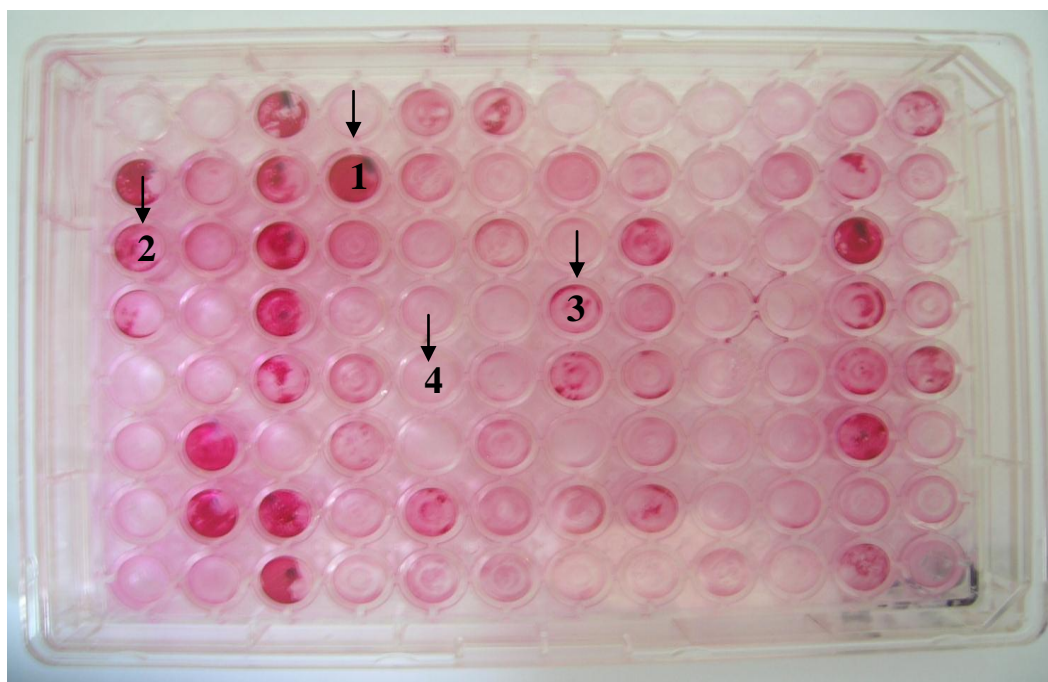


Figura 12. Técnica da microplaca revelando a produção de “slime”, por *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina. 1- isolado forte produtor (+++), 2- isolado produtor moderado (++) , 3- isolado fraco produtor (+), 4- isolado não produtor (-).

Tabela 8. Níveis de produção de “slime” das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (n=150) isolados de mastite bovina.

Espécies	Produção de “slime”*			
	-	+	++	+++
<i>S.aureus</i>	20% (n=10)	14% (n=7)	38% (n=19)	28% (n=14)
<i>S.intermedius</i>	14,7% (n=5)	29,4%(n=10)	11,8%(n=4)	44,1%(n=15)
<i>S.hyicus</i>	55,5% (n=10)	5,6%(n=1)	16,7% (n=3)	22,2% (n=4)
<i>Staphylococcus spp</i>	14,5%(n=7)	25% (n=12)	37,5%(n=18)	23%(n=11)

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

O percentual total de produção é considerado elevado quando comparado a outros trabalhos que detectaram 15% e 20% em *Staphylococcus* spp.. isolados de mastite (VASUDEVAN et al., 2003). Quanto à presença dos genes *icaA* (1315pb) e *icaD* (381pb) (figura 13), foi encontrado um percentual de 14% e 11,3%, respectivamente. O percentual encontrado de *Staphylococcus* spp. positivos para ambos os genes foi de 7,3%. A intensidade da produção de *slime*, avaliada na técnica de microplaca não foi relacionada com a presença dos genes através da análise estatística. A intensidade desta produção parece estar relacionada às características fenotípicas próprias dos estafilococos (ARCIOLA et al., 2001).

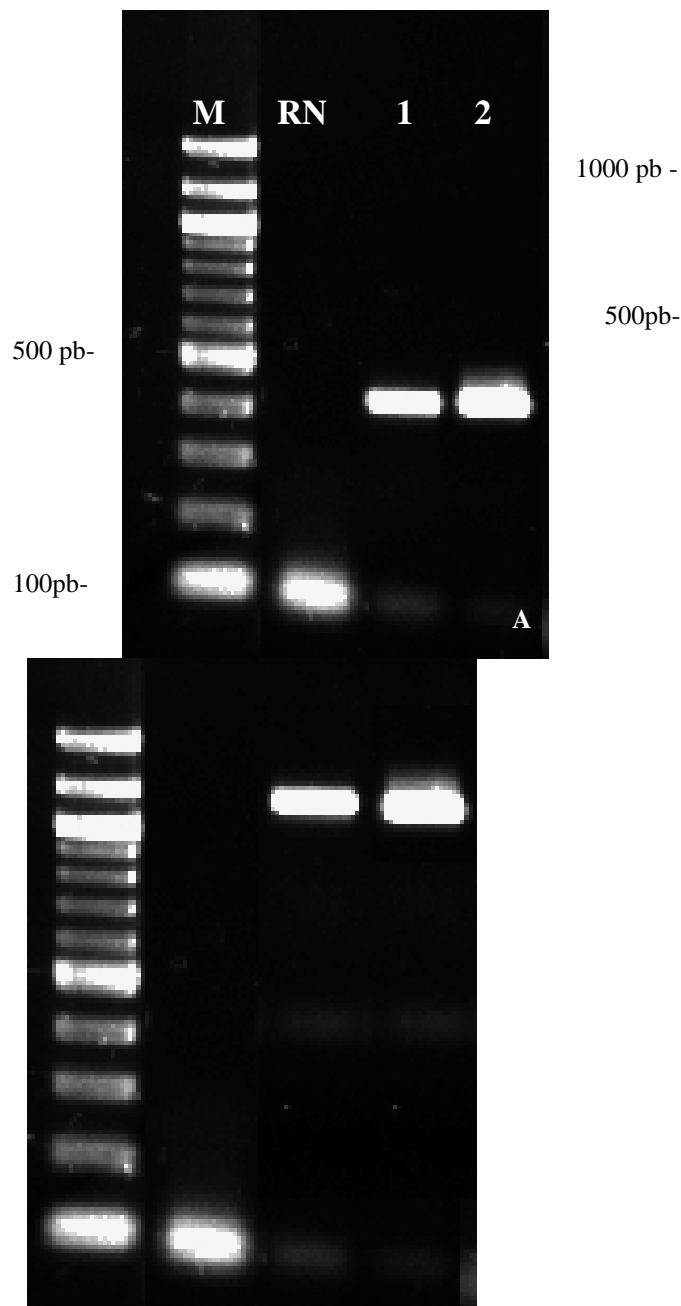


Figura 13. Genes *icaD* (A) e *icaA* (B) em *Staphylococcus* spp coagulase positivos isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5%. **A:** M: marcador de peso molecular (100pb); RN: reação negativa; 1-2: isolados positivos para o gene *icaD* (4 e 50). **B:** M: marcador de peso molecular (100pb); RN: reação negativa; 1-2: isolados positivos para o gene *icaA* (18 e 50).

Na técnica do ágar Vermelho Congo (figura 14) foi observado um crescimento de duas tonalidades de colônias negras (cinza escuro e negra), que totalizaram 18% de positividade para produção de “slime”.

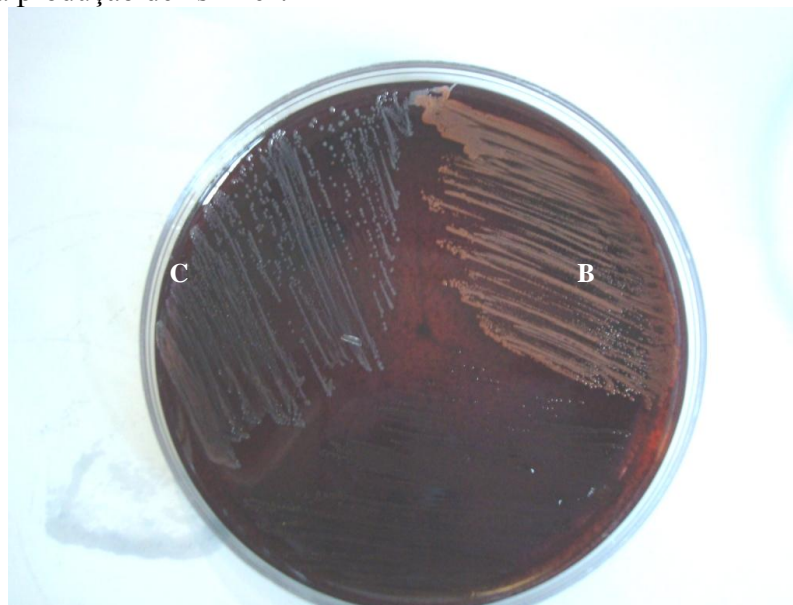


Figura 14. Colônias de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina crescidas em ágar Vermelho Congo. **A:** Colônia produtora de “slime” (muito negra); **B:** Colônia negativa para a produção de “slime” (vermelha) e **C:** Colônia quase produtora de “slime” (cinza).

A avaliação das características coloniais neste ágar não é quantitativa e muito subjetiva, uma vez que existem inúmeras variações de coloração que podem ocorrer desde a cor preta até a vermelha, como foi encontrado o presente trabalho (colônias cinzas e bordô).

Existem dados na literatura, que associam a presença de ambos os genes com as variações de coloração das colônias crescidas em ágar Vermelho Congo, mostrando que nem sempre que há a presença dos genes há concomitante produção de “slime” e conseqüente coloração negra da colônia (ARCIOLA et al., 2001). No presente trabalho esta associação não foi avaliada, pois apenas um isolado apresentou ambos os genes e demonstrou coloração negra (tabela 9) e 6% foi positivo para ambos os genes e não apresentou esta coloração. Este fato pode ser explicado pela não expressão dos genes destes isolados nas condições as quais foram submetidos, sendo possivelmente necessária uma maior concentração de açúcar no ágar ou maior tempo de incubação.

Tabela 9. Presença dos genes de produção de “slime” e característica de coloração em ágar vermelho congo por *Staphylococcus* spp coagulase-positivos isolados de mastite bovina.

Genes*		Vermelho Congo	Nº isolados (%)
<i>icaA</i>	<i>icaD</i>		
-	-	Bordô	43 (28,6)
-	-	Vermelho	60 (40)
-	-	Cinza	24 (16)
+	+	Vermelho	5 (3,3)
-	-	Preto	4 (2,6)
+	+	Bordô	4 (2,6)
-	+	Vermelho	3 (2)
+	-	Vermelho	2 (1,3)
-	+	Bordô	1 (0,6)
+	-	Preto	1 (0,6)
+	+	Preto	1 (0,6)
-	+	Bordô	1 (0,6)
-	+	Preto	1 (0,6)

* -: negativo; +: positivo.

Um total de 84,6% dos isolados foram negativos para ambos os genes e não apresentaram coloração negra no ágar vermelho congo, confirmando a especificidade da prova. Essa relação encontra suporte nos resultados obtidos através do teste X^2 expostos no anexo III.

5.3.2. Produção de hemolisinas e genes *hla* e *hlb*

Um total de 44,7% foi hemolítico, sendo 18,7% produtores de hemólise parcial, 15,4% total e 10,6% produtores de ambas as hemolisinas (figura 15). Logo, de todos os isolados produtores, 65,6% apresentaram a beta hemolisina corroborando com autores que observaram que os estafilococos de origem animal se caracterizavam por produzir principalmente esta hemolisina (DEMO, 1996). A beta toxina parece ter uma participação particular na mastite, pois a toxina aumenta o crescimento bacteriano na glândula mamária que apresenta tecido rico em esfingomiélin.

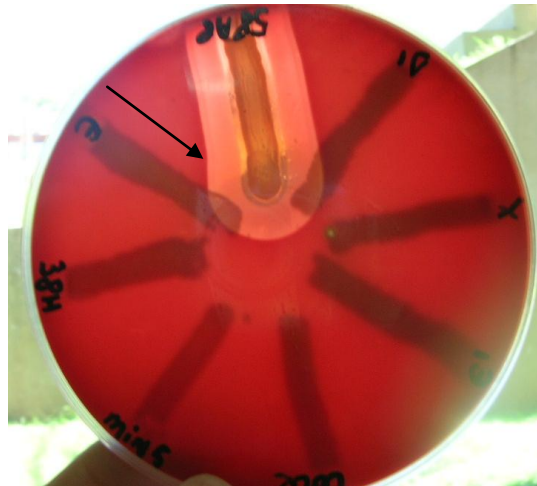


Figura 15. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina. A seta indica um isolado produtor de alfa e beta hemolisinas em placa de ágar sangue apresentando outros isolados negativos para a produção de ambas as hemolisinas.

Os múltiplos repiques realizados com os isolados podem explicar a não produção de hemolisinas por 55,3% dos estafilococos testados. Após a detecção dos genes *hla* e *hlb* (210pb e 300 pb, respectivamente) (figura 16) através da técnica de PCR multiplex, foi possível avaliar que 83,7% (n=86) dos isolados que foram não-hemolíticos foram negativos para ambos os genes (tabela 10).

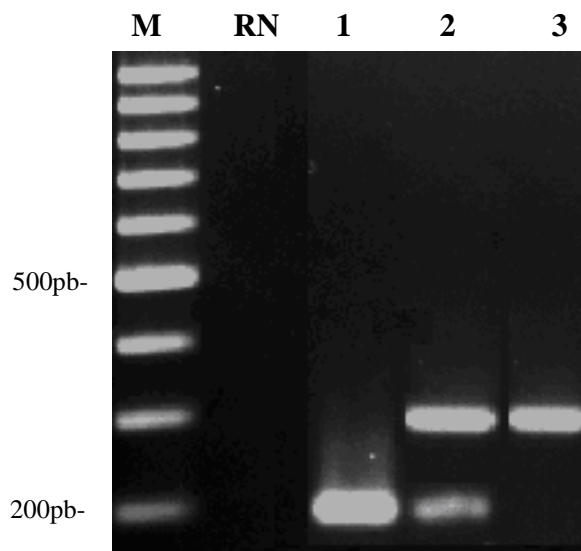


Figura 16. Genes *hla* (210pb) e *hlb* (300pb) em *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados de mastite bovina, através do PCR multiplex (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa, 1: isolado positivo para o gene *hla* (71), 2: isolado positivo para ambos os genes (72), 3: isolado positivo para o *hlb* (53).

Um total de 85% (n=17) e 81,1% (n=9) dos isolados produtores de hemolisina total e parcial apresentaram o gene *hla* e *hlb*, confirmando serem estes os genes envolvidos na produção de alfa-hemolisina e beta-hemolisina, respectivamente. Porém,

17,3% apresentaram algum tipo de hemolisina, mas foi negativo para ambos os genes, o que sugere o envolvimento de outros genes, possivelmente relacionados à expressão destas toxinas, que não foram amplificados no presente trabalho. Um total de 9,2% não expressou hemolisina porém foi positivo para pelo menos um gene. Este fato pode ser explicado pela não expressão dos genes nas condições “in vitro” fornecidas.

Tabela 10. Produção de hemolisinas e presença dos genes *hla* e *hly* em *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (n=150) isolados de mastite bovina.

Tipos de Hemolisinas*	Genes**		Nº de isolados (%)
	<i>hla</i>	<i>hly</i>	
PAR/TOT	-	-	24 (16)
PAR/TOT	-	+	1 (0,6)
PAR/TOT	+	+	8 (5,3)
PAR	-	-	2 (1,3)
PAR	-	+	8 (5,3)
PAR	+	+	1 (0,6)
TOTAL	+	-	17 (11,3)
TOTAL	+	+	3 (2)
NH	-	-	72 (48)
NH	-	+	1 (0,6)
NH	+	-	7 (4,6)
NH	+	+	6 (4)

* PAR/TOT: parcial e total, PAR: parcial, TOT: total, NH: não hemolítico.

** +: positivo, -: negativo.

O SHA foi positivo em 17 isolados (11,3%) sendo que destes, 70,5% não haviam apresentado hemolisinas. De todos os *Staphylococcus* spp. positivos para o sinergismo apenas 11,7% (n= 2) foram positivos para os genes *hla* e *hly*. Acredita-se que os isolados que desenvolvem tal fenômeno são portadores da gama hemolisina que é expressa somente em presença de β -hemolisina (REINOSO,2004). Ademais, acredita-se que o fenômeno de sinergismo hemolítico é independente da produção de hemolisinas, porém sua ação é considerada potencializadora para isolados que são hemolíticos, especialmente em *Staphylococcus aureus*, pois permite uma melhor colonização do úbere por estes microrganismos (WATTS, 1988).

5.3.3. Gene *spaA* em *S.aureus*

No presente trabalho todos os isolados de *S.aureus* foram positivos para o gene que codifica a região variável (X) do gene *spaA* (figura 17). Nenhum isolado apresentou bandas múltiplas e foi possível estabelecer 5 perfis segundo o tamanho da banda amplificada (tabela 11).

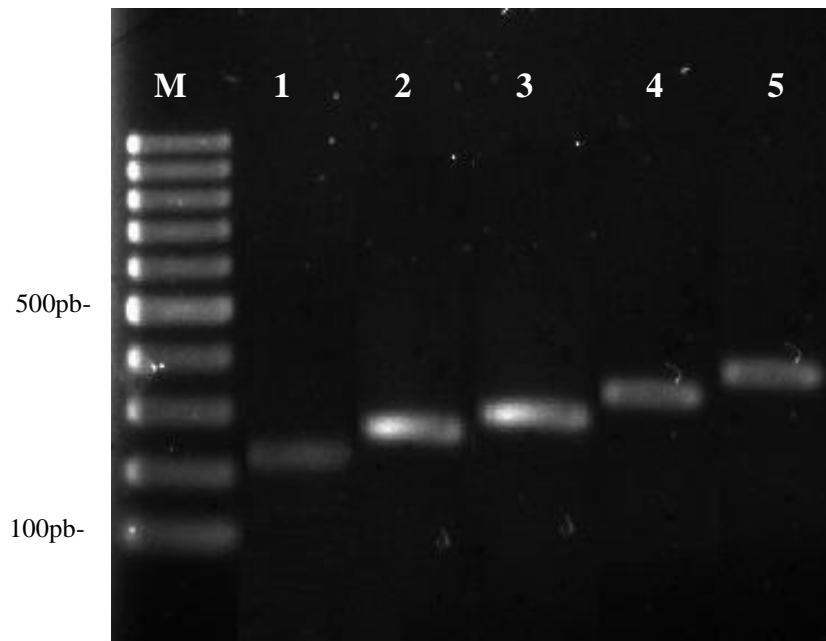


Figura 17. Gene *spaA* (região polimórfica) em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb), 1: isolado 53 (220pb); 2: isolado 48 (250pb); 3: isolado 67 (280pb); 4: isolado 86 (300pb) e 5: isolado 7 (315pb).

Tabela 11. Perfis estabelecidos segundo amplificação da região X do gene *spaA* em *Staphylococcus aureus* (n=50) isolados de mastite bovina.

Perfis (pb)	Número de repetições da região X	Frequência	Percentual
1(220)	9	5	10 %
2 (250)	10	5	10 %
3 (280)	11	2	4 %
4 (300)	12	6	12 %
5 (315)	13	32	64 %

Todos os isolados apresentaram valores igual ou superior a 9 repetições, sendo o perfil predominante o de 13 repetições (64%). Frenay et al. (1996) determinaram que cepas com mais de 11 unidades repetidas na região X tendem a ser mais epidêmicas, enquanto que a presença de 7 ou menos unidades indica que cepas esporádicas. Isso se justifica pelo fato de que quanto maior o número de repetições, maior a longitude da região de união à porção Fc das imunoglobulinas, favorecendo a colonização e conseqüente infecção.

Em trabalho desenvolvido por Akineden et al. (2001) os isolados de mastite bovina podem ser relacionados segundo os perfis apresentados através da amplificação de gene *spaA*. De acordo com os autores, os isolados que apresentam mesmo tamanho de banda estão proximamente relacionados.

O conhecimento destas relações é de grande utilidade na área da epidemiologia clínica, pois possibilita a implementação de medidas profiláticas no controle das mastites bovinas.

5.3.4. Gene *coa* em *S.aureus*

Todos os isolados de *S.aureus* foram positivos para o gene *coa* (figura 18) e apresentaram 3 perfis distintos sem bandas duplas (tabela 12) e o perfil predominante foi o de 520pb (86%).

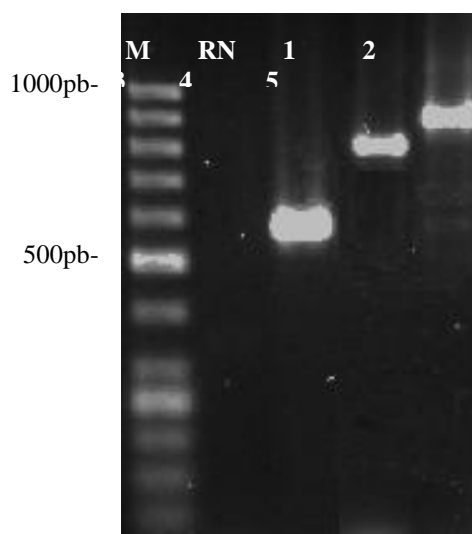


Figura 18. Gene *coa* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina (gel de agarose a 1,5%). M: marcador de peso molecular (100pb); RN: reação -ativa; 1: isolado 3 (520pb), 2: isolado 1 (800pb) e 3: isolado 52 (900pb).

Tabela 12. Perfis estabelecidos segundo amplificação do gene *coa* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

Perfis (pb)	Número de repetições da região polimórfica	Frequência	Percentual
1 (520)	6	43	86 %
2 (800)	9	5	10 %
3 (900)	11	2	4 %

A detecção de distintos perfis corrobora com o trabalho desenvolvido por Goh et al., (1992) que sugerem a presença de mais de uma forma alélica para o gene da coagulase. A amplificação do gene com os iniciadores utilizados não apresentou elevada diversidade como em trabalho realizado por Reinoso, (2004) que encontrou 8 distintas formas alélicas em *S.aureus* isolados de mastite bovina. Shopsin et al., (2000) também encontrou polimorfismos que variaram entre 3 e 7 repetições, sendo o perfil predominante o de 5 repetições.

A literatura informa que o relógio molecular do gene da coagulase sofre evoluções lentas em comparações a outros lócus e por isso apresenta pequenas variações entre cepas não relacionadas (SABAT et al., 2003). De acordo com os resultados, os isolados podem não ser diferenciáveis entre si devido à elevada prevalência de um único perfil, porém em adição aos perfis encontrados no gene *spaA*, pode-se distinguir ou estabelecer uma proximidade clonal entre *S.aureus* de uma mesma propriedade.

5.3.5. Gene *agr* em *S.aureus*

Um total de 74% (n=37) dos *S.aureus* foram positivos para o gene regulatório *agr*. Foram encontrados dois perfis (350pb e 550pb) distintos o que confirma o polimorfismo de tal gene. Dos isolados positivos, 83,7% (n=31) apresentaram a banda de 550pb. Este resultado corrobora com dados obtidos por Gilot; Van Leeuwen (2004) que encontraram associações estatísticas significativas entre os perfis de *agr* e o hospedeiro específico, onde o autor encontra prevalência do perfil de 550pb em isolados bovinos.

Segundo a literatura, o gene *agr* está relacionado à regulação de exoproteínas (TAKEUCHI et al.,2001). No presente trabalho, a presença deste gene foi avaliada em relação apenas à produção de hemolisinas (tabela 13), uma vez a detecção da expressão fenotípica da produção de “slime” apresentou resultados discrepantes e todos os *S.aureus* produziram coagulase.

Tabela 13. Produção de hemolisinas avaliada segundo a presença dos genes *agr*, *hla* e *hlb* em *Staphylococcus aureus*.

Tipo de Hemolisina	Genes			Nº isolados (%)
	<i>agr</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	
PAR/TOT	+	-	-	16 (32)
NH	+	-	-	6 (12)
TOT	+	+	-	5 (10)
NH	-	-	-	4 (8)
NH	+	+	-	4 (8)
NH	-	+	-	3 (6)
PAR/TOT	-	-	-	2 (4)
PAR	+	-	-	1 (2)
NH	-	+	+	1 (2)
NH	-	-	+	1 (2)
PAR	-	-	-	1 (2)
NH	+	-	+	1 (2)
PAR	+	+	+	1 (2)
NH	+	+	+	1 (2)
TOT	-	+	+	1 (2)
TOT	+	+	+	1 (2)
TOT	+	-	-	1 (2)

* PAR/TOT: parcial e total, PAR: parcial, TOT: total, NH: não hemolítico.

** +: positivo, -: negativo.

Segundo a análise estatística houve correlação entre a presença do gene *agr* e a produção de beta-hemolisina confirmando os dados encontrados na literatura que afirmam ser este um gene ativador da expressão de hemolisinas. Em trabalho desenvolvido por Takeushi et al. (2001), os autores confirmaram que alterações produzidas no gene *agr* promovem não produção de hemolisinas.

5.4. Tipagem dos *S.aureus*

Após a execução da técnica do RAPD utilizando-se 4 distintos iniciadores, foi possível avaliar que nenhum deles apresentou um adequado poder discriminatório. As figuras 19, 20 e 21 apresentam os perfis encontrados com os iniciadores OLP11, OLP13 e OLP14.

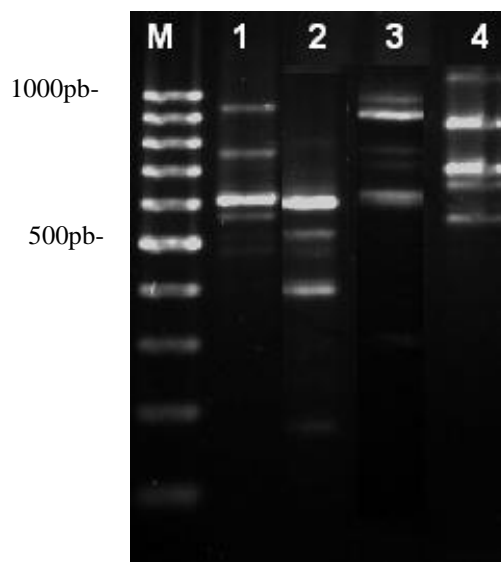


Figura 19. Padrão eletroforético dos perfis apresentados por *S.aureus* isolados de mastite bovina utilizando-se o iniciador OLP11. M. marcador de peso molecular (100pb), 1-4: distintos perfis.

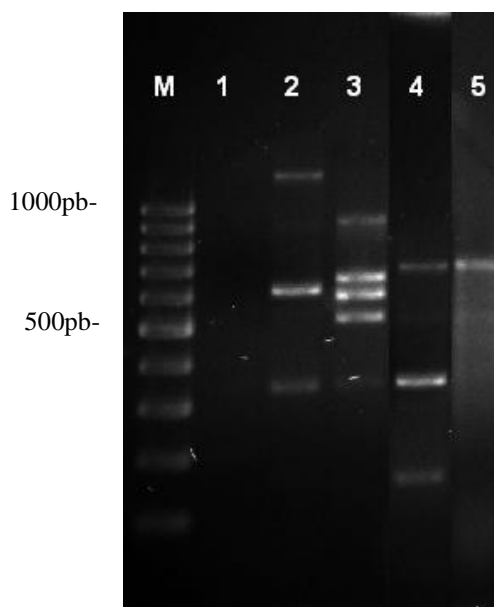


Figura 20. Padrão eletroforético dos perfis apresentados por *S.aureus* isolados de mastite bovina utilizando-se o iniciador OLP13. M. marcador de peso molecular (100pb), 1-5: distintos perfis.

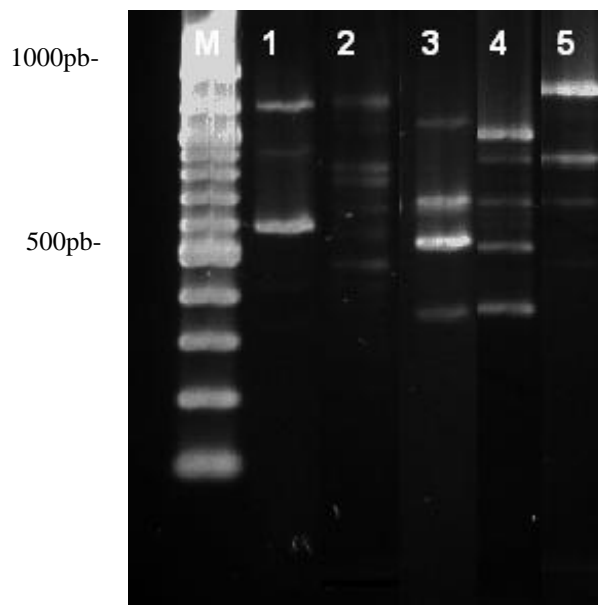


Figura 21. Padrão eletroforético dos perfis apresentados por *S.aureus* isolados de mastite bovina utilizando-se o iniciador OLP14. M. marcador de peso molecular (100pb), 1-5: distintos perfis.

Dentre as diversas técnicas utilizadas de tipagem molecular, RAPD é a de menor número de etapas e tempo para obter resultados além de fácil execução. Contudo, no presente trabalho a técnica apresentou baixa reprodutibilidade com os iniciadores utilizados que foram selecionados segundo técnica proposta por Reinoso et al. (2001). Estes autores utilizaram o RAPD para análise epidemiológica de *S.aureus* isolados de humanos e de vacas com mastite e, obtiveram resultados satisfatórios com os iniciadores OLP6, OLP11 e OLPP13. Portanto conclui-se que esta é uma técnica de pouca consistência de um laboratório para outro e dificulta a comparação entre dados obtidos em diferentes locais.

Em geral como não é necessário o conhecimento prévio sobre o genoma da espécie avaliada e os iniciadores utilizados são aleatórios, uma série de reações costuma ser realizada (cada reação um iniciador) para se avaliar o polimorfismo através de RAPD. No entanto alguns trabalhos têm sugerido que quando a variabilidade genética é elevada em uma população, o uso de poucos iniciadores, ou um menor número de reações seria suficientes, o que reduziria custo e tempo operacional (WILLIAMS et al., 1990).

Outro método utilizado para a genotipagem de estafilococos é o PFGE (“*pulsed-field gel electrophoresis*”) que é freqüentemente indicado para estudos com finalidade epidemiológica (CHANG et al. 2000). No PFGE as enzimas de restrição reconhecem sítios pouco freqüentes, o que resulta em fragmentos de DNA grandes e o número de fragmentos varia de um isolado para outro. A combinação desses fatores possibilita a formação de padrões eletroforéticos de fácil análise e comparação (BANNERMAN, 1995). Esta técnica tem sido considerada “padrão ouro” para a tipagem de estafilococos meticilina-resistentes em razão de seu elevado poder discriminatório, sua alta reprodutibilidade e sua boa correlação com dados epidemiológicos (SENNA et al., 2002). Seu uso, no entanto, tem sido limitado por ser uma metodologia trabalhosa e que requer equipamentos caros (SCHMITZ et al. 1998).

Após a execução dos testes de biotipificação, um total de 22 (44%) *S.aureus* foram classificados como ecovar bovino (figura 22) e 56% como ecovares não-específicos.

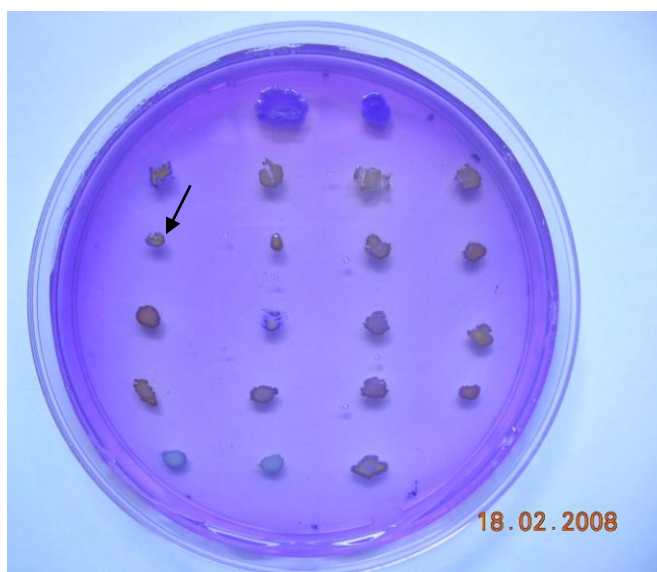


Figura 22. Crescimento de *S.aureus* em ágar cristal violeta. A seta indica coloração amarela com borda roxa, caracterizando o ecovar bovino.

Considerando-se que os isolados testados foram provenientes de mastite bovina, esperava-se encontrar este ecovar com maior frequência. A distribuição desse biótipo entre amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina tem sido variada. Predominou entre os isolados examinados por Hájek; Marsálek (1971) e Devriese (1984), com frequências de 89,1% e 38,3%, respectivamente, porém, não foi relatado por Aarestrup et al. (1995) em 105 espécies examinadas. Farah et al. (1988) testaram 110 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina e 2,7% apresentaram características do biótipo bovino, 77,3% do humano e 20% não apresentaram características específicas de hospedeiro. Com exceção do relato de Farah et al. (1988) que encontraram alta porcentagem do biótipo humano em *S. aureus* de mastite bovina, os biótipos aviário, ovino e humano têm sido encontrados em proporções menores (DEVRIESE, 1984; AARESTRUP et al., 1995).

O sistema de biotipagem é um método simples, que pode ser usado para estudo de um grande número de isolados. A predominância de determinados biótipos no rebanho pode estar relacionada com a presença de determinados fatores de risco, sugerindo a necessidade de se identificar esses fatores para que medidas de controle da doença possam ser implementadas com maior eficiência.

Os *S.aureus* isolados de cada propriedade foram avaliados quanto aos antibiótipos, ecovares e perfis apresentados dos genes *spaA*, *coa* e *agr* (anexo II). Foram detectados 7 *S.aureus* que apresentaram os mesmos ecovares, biótipos e tamanhos de fragmentos de *spaA* e *coa*, sendo 4 pertencentes às mesmas propriedades e 3 provenientes de propriedades distintas (tabela 14).

Tabela 14. *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes propriedades caracterizados segundo os perfis do gene *spaA*, *coa*, *agr*, ecovares e antibiótipos.

Propriedades*	Isolados	<i>spaA</i> (pb)	<i>coa</i> (pb)	<i>agr</i> (pb)	Ecovares	Antibiótipos
3(JF)	10,12	315	520	550	Bovino	4
3(JF)	14,16	315	520	550	NE	2
12(BM)	46,48	315	520	550	NE	3
16(BM)	76,77	250	520	350	Bovino	12
3(JF), 4(S), 17(R)	15,24,80	315	520	550	Bovino	5
1(Q), 12(BM)	3,47	315	520	550	Bovino	2
4(S), 3(JF)	13,29	315	520	550	Bovino	15

* Q: Quatis, BM: Barra Mansa, JF: Juiz de Fora, S: Seropédica, R: Resende

Apesar de terem sido encontrados isolados com mesmo perfil avaliado é necessário que se estabeleçam mais fatores discriminatórios para a real confirmação desta proximidade. Uma técnica molecular de tipagem de *S.aureus* amplamente utilizada é a eletroforese por campo pulsado (PFGE) que possui a capacidade de separar fragmentos de DNA maiores que 25kb mediante uma alternância de ângulo do campo eletroforético. Este método oferece vantagens sobre as outras técnicas de tipificação de *S.aureus*, uma vez que a literatura aponta para a sua elevada sensibilidade e reprodutibilidade e descreve este método como “padrão ouro” dentre todos os métodos de tipificação molecular (OLIVE; BEAN, 1999; BANNERMAN et al., 1995).

A epidemiologia molecular no campo das enfermidades infecciosas aponta para a detecção de polimorfismos genéticos entre cepas de microrganismos de importância clínica. As relações genéticas podem ser estabelecidas entre cepas sobre a base de medidas da heterogeneidade genética. O conhecimento destas relações é de grande utilidade na área da epidemiologia (REINOSO, 2004).

6. CONCLUSÕES

- A espécie *S.aureus* foi a prevalente dentre os estafilococos identificados;
- Os isolados apresentaram elevada resistência à penicilina e à ampicilina, tendo a associação entre ampicilina e sulbactam mostrado maior eficácia frente a estes;
- Foram encontrados 20 antibiótipos, sendo o de sensibilidade a todos os antimicrobianos o prevalente;
- Foram encontrados 27 perfis distintos nos testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina;
- Um elevado percentual de isolados produziu betalactamases e apresentou o gene *mecA* e, um total de 80% dos *S.aureus* foi classificado como MRSA
- Os testes de ágar “screen” e a avaliação da microdiluição em placa, apresentaram valores consideráveis de sensibilidade e especificidade;
- O gene *femA* não foi amplificado em todos os isolados de *S.aureus*;
- Foi encontrada uma baixa prevalência dos genes de produção de “slime” (*icaA* e *icaD*);
- Os *Staphylococcus* spp. produziram “slime” em diferentes escalas na técnica da microplaca e ágar vermelho congo apresentou-se como uma técnica específica.
- Um total de 65,6% dos estafilococos produtores de hemolisinas produziu a beta-hemolisina e, 85% e 81,1% dos isolados produtores de hemolisina total e parcial apresentaram o gene *hla* e *hly*, respectivamente;
- O sinergismo hemolítico foi positivo 11,3% dos isolados e destes 70,5% foram positivos para a gama hemolisina;
- Todos os *S.aureus* apresentaram o gene *spaA*, que revelou um único amplicon com tamanhos distintos, sendo o perfil predominante o de 315pb;
- Todos os *S.aureus* foram positivos para o gene *coa* que apresentou um único amplicon e o perfil prevalente foi o de 900pb;
- O gene *agr* foi detectado em 74% dos *S.aureus*, apresentou dois perfis de banda (350pb e 550pb) e apresentou relação com a produção de beta-hemolisina;
- A técnica de RAPD-PCR não apresentou significativa capacidade no poder discriminatório dos *S.aureus* com os iniciadores utilizados;
- A prova de biotipificação revelou o ecovar bovino como o prevalente nos *S.aureus*;
- Foram detectados 7 *S.aureus* que apresentaram os mesmos ecovares, biotipos e fragmentos de *spaA* e *coa* sendo 4 pertencentes às mesmas propriedades e 3 provenientes de propriedades distintas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M., WEGENER, H.C., ROSDAHL, V.T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Vet. Microbiol.*, v.45, p.139-150, 1995.

AARESTRUP, F. M. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canoidea gives possible evidence for hostspecificity and co-evolution of bacteria and hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.51, p.1343–1347, 1999.

AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORG, H.; 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45. p. 2054-2059, 2001.

ABDELNOUR, A.; ARVIDSON, S.; BREMELL, T.; RYDEN, C.; TARKOWSKI, A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun.*v.61 p.3879–3885,1993.

AGUILAR, B.; AMORENA, B; ITURRALDE, M. Effecto of slime on adherente 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, CH., WOLTER, W. Y ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v.8 p.959-964, 2001.

ALCARÁZ, L.E.; SATORRERS, S.E; LUCERO,R.M.;CENTORBI,O.N.P. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase negative staphylococci isolated from nosocomial species. *Brasilian Journal of Microbiology.* v. 34 p.41-45, 2003.

ALMEIDA, M. A. C. Prevalência de mastite subclínica em bovinos por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. na microregião de Garanhuns, Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997. 48p.

ALMEIDA R., MATTHEWS E., CIFRIAN A., GUIDRY A., OLIVER S. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* v.79 p.1021-1026, 1996.

ALONSO D.O.V. ; DAGGETT V. Staphylococcal Protein A: Unfolding Pathways, Unfolded States, and Differences between the B and E Domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* v. 97 p.133-138, 2000.

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

ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUISTA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade “in vitro” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*. v.1 n.1 p.53-57,2000.

ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; THANASSI, J.A.; PUCCI, M.J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v.38 n.3 p.447-454, 1994.

ARCIOLA, C.R.; COLLAMATI, S.; DONATI, E.; MONTANARO, L. A rapid PCR method for the detection of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in perioprosthesis infections. *Diagnostic Molecular Pathology*. v. 10 p. 130-137, 2001.

BANNERMAN T., HANCOCK G., TENOVER F., MILLER M. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 551 – 555, 1995.

BASCOMB, S.; MANAFI, M. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic gram-positive cocci. *Clinical Microbiol. Reviews*, v.11, n.2, p.318-340, 1998.

BAYLES K., WESSON C., LIU L., FOX L., BOHACH G., TRUMBLE W. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in Epithelial cells. *Inf. Inm.* v.66 p.336-342, 1998.

BERTOLATTI D, O'BRIEN F., GRUBB W. Characterization of drug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants in Western Australia. *Int J Environ Health Res.* v.13 p.43-54, 2003.

BITTENCOURT, J. V. M. Variabilidade Genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós- Graduação em Agronomia-Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 58 p, 2000.

BOOHT, J.M. Progress in the control of mastitis. International mastitis seminar. Tel Aviv. Proceedings...Tel Aviv: International Dairy Federation. v.2 p.3-10, 1995.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e -ativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Napgama* v.2 n.3 p.4-11, 1999.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O . Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Juiz de Fora, v.51, n.2, p.129-135, 1999.

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

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M. de; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural*, Santa Maria. v. 32 n.1 p-79-82, 2002.

BROWN, D.F.J. ; YATES, V.S. Methicillin susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* on media containing five percent sodium chloride. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.* v. 726, n.5, p.8, 1986.

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. *Epidemiol Infect.* v.126 p.445-452, 2001

CALVINHO, L. F., F. G. TOSELLI, W. R. WEIMANN, V. R. CANAVESIO, V. E. NEDER, AND I. A. IGUZQUIZA. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovinemastitis in the central dairy catchment area of Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* v.34 p.171–175, 2002.

CAPURRO, A.; CONCHA, C.; NILSSON, L.; ÖSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive Staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scand.*, v.40 p.315-321, 1999.

CARROL, P.; FRANCIS P. The basic phage set for typing bovine staphylococci. *J. Hyg. Camb.* v.95 p.665-669, 1985.

CASTREJÓN, M. E.; PEREA, C. R. Estudio de la resistencia a antimicrobianos que presentan los microorganismos productores de mastitis en vacas Holstein. In: CONGRESO PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 14. 1994, Acapulco. Proceedings... Acapulco. p. 45, 1994.

CAUWELIER, B.; GORDTS, B.; DESCHEEMAECCKER, P.; VAN LANDUYT, H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v.23 p.389–392, 2004.

CHAPMAN, G.; BERENS, C.; PETERS, A.; CURCIO, L. *Journal of Bacteriology.* XXVIII p. 343, 1934.

CHANG S, SIEVERT DM, HAGEMAN JC, BOULTON ML, TENOVER FC, DOWNES FP, SHAH S, RUDRIK JT, PUPP GR, BROWN WJ, CARDO D, FRIDKIN SK. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med.* v. 348 p.1342-7, 2003.

CHANG HR, LIAN JD, SHU KH, CHING CH, WU MJ, LAU YJ, HU BS, CHIN CH. Use of pulsed-field gel electrophoresis in the analysis of recurrent *Staphylococcus aureus* infections in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Nephrol* v.20 p. 463-467, 2000.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, M. L.; BARRET, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-

ative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 22 n. 6 p.996-1006, 1985.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standards. CLSI document M45-P, Wayne, Pa, 2005.

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.

COSTA, L. M.; RAMOS, I. B.; CARVALHO, D. G.; JÚNIOR, R. D. Análise da sensibilidade do *Staphylococcus aureus* hospital aos antimicrobianos no período 1988-1993. In: Programa Oficial e Resumos de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro e Infectologia, Porto Alegre, Resumo n. 111. p. 87, 1994.

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

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

CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G. da.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R. da.; OLIVEIRA, A. A. da.; SILVA, K. P. C. da.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arquivo Instituto de Biologia*, São Paulo, v.73 n.1 p.17-21, 2006.

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

DE OLIVEIRA, A. P.; WATTS, J. L.; SALMON,S.A. ;AARESTRUP, F.M. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States . *J Dairy Sci*. v.83 p.855–862, 2000.

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

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

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

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

DIEFFENBACH, C.W.; DVEKSLER, G.S. PCR Protocols. Academic Press, San Diego, California. p. 3-18, 1995.

DOMINGUES, P.F.; PADOVANI, C.R.; DOMINGUES, L.R. Estudo da eficácia *in vitro* dos antimicrobianos e quimioterápicos usados no tratamento da mastite bovina por *Staphylococcus* spp.. Hora Veterinária.n.82 p.27-29, 1994.

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. J. Dairy Sci. v.85 p.1111–1118, 2004.

ERSKINE, R. J., KIRK, J. H., TYLER, J. W., DeGRAVES, F. J. Advances in the therapy for mastitis. *Vet. Clin. N. Amer.*: Food Animal Practice. v. 9, n. 3, p. 499-513, 1993.

FAGLIARI, J.J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J.M. Sensibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica. *Ciência Veterinária*. v.4 n.2 p.11-13, 1990.

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

FARAH, I.O., PEDERSEN, E., HALGAARD, C. et al. Comparative characterization and biotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from human and bovine sources. *Acta Vet. Scand.*, v.29, p.303-310, 1988.

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

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E de; ZAFALON. L. F.; SOUZA, V.

de. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.36 n.4 p-1228-1234, 2006.

FIGUEIREDO, J.B. Mastite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa. In: Congresso Brasileiro De Reprodução Animal, Belo Horizonte: Anais CBRA. v.11, 180p, 1995

FITZGERALD, J. R.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMYTH, C. J. Molecular population and virulence analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. J. of Appl. Microbiol., n.88, p.1028-1037, 2000.

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

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

FRENAY H., BUNSCHOTEN A., SCHOULS L., VAN LEEUWEN W., VANDENBROUCKE-GRAULS C., VERHOEF J., MOOI F. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. v.15 p.60-64, 1996.

FUEYO, J. M. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 67, p. 139-145, 2001.

FUNGARO, M. H.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, Cap. 8, p.205-227, 1998.

GEHA, J.; UHL, J.R.; GUSTAFERRO, C.A.;PERSING, D. H. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. Journal of Clinical Microbiology. v.32, p.1768–1772, 1994.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A. Antimicrobial susceptibility of coagulase--ative stphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. Journal of Dairy Science, v. 85, p. 1913-1917, 2000.

GILLASPY, A. F., HICKMON, S. G., SKINNER, R. A., THOMAS, J. R., NELSON, C. L., SMELTZER, M. S. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. Infect Immun. v.63 p.3373–3380, 1995.

GILOT P.; VAN LEEUWEN W. Comparative analysis of *agr* locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. v.42 p.1265-1269, 2004.

GIRAUDO A., RAMPONE H., CALZOLARI A., NAGEL R. Phenotypic characterization and virulence studies of *agr-sae* double mutants of *Staphylococcus aureus*. Can. J. Microbiol. v.32 p.120-123, 1999.

GODDEN S.M.; JANSEN J.T.; LESLIE K.E.; SMART N.L.; KELTON, D.F. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. Can.Vet. J. v.43 p.38–42, 2002.

GOH, S. H.; BYRNE, S. K.; ZHANG, J. L.; CHOW, A. W. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 30 p.1642-1645, 1992.

GOMES, M.J.P. *Staphylococcus spp.*. LABACVET –II Microbiologia Clínica, 2007

GONÇALVES, A.J.R.; ROSENBAUM, R.; CARDOSO, R.L.L. Doenças estafilocócicas. *Arquivos Brasileiros de Medicina*. v.61 p.13-24, 2007.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M. E. ; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet. Microbiol.* v.98, n.23, p.7, 2004.

HÁJEK, V., MARSÁLEK, E. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zbl. Bakt. Hyg., Ser A*, v.271, p.176-182, 1971.

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

HENNEKINNE J. A., KEROUANTON A., BRISABOIS A. Y DE BUYSER M.L. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J Appl Microbiol.* v. 94 p.321-329, 2003.

HERMANS, K.; De HERDT, P.; BAELE, M.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Sequence analyses of a RAPD band differentiating high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet. Microbiol.*, v.82, n.1, p.61-7, 2001.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T. ; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* v.40, p.135-136, 2001.

ITO T; KATAYAMA Y.; ASADA K.; MORI N.; TSUTSUMIMOTO K.; TIENSASITORN C.; HIRAMATSU K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. v.45 p.1323-1336, 2001.

JAPONIA.; ALBORZI, A.; MANOOCHEHR, R.; POURABBAS, B. Modified DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant staphylococci. *Iran. Biom. J.* v.8, n.3, p.161-164, 2003.

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.

KAIDA, S. Nucleotide and deduced amino acid sequence of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. Nucleic Acids Research, London, v. 17, p. 8871, 1989.

KARAHAN M ; CETINKAYA B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. Vet J. 2007 v.174 n.2 p.428-431, 2006.

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

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C. ; WINN JR. Diagn. Microbiol. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2001.

KONG KF, VUONG C; OTTO M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. Int J Med Microbiol 296: 133–139, 2006.

KOREEN, L.; RAMASWAMY, S.V.; GRAVISS, E.A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B.N. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J Clin Microbiol. v.42 p.792–799, 2004.

KREISWIRTH B., KORNBLUM J., ARBEIT R., EISNER W., MASLOW J., MCGEER A., LOW D. Y NOVICK R. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Sci. v.259 p.227-230, 1993.

KRUT O., UTERMOHLEN O., SCHLOSSHERR X., KRONKE M. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Infect Immun. v.71 p.2716-23, 2003.

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

LEVY, C.E. Aspectos Microbiológicos. Infecção Hospitalar: prevenção e controle. São Paulo, Sarvier. p.591-598, 1997.

LINEHAN, D.; ETIENNE, J. ; SHEEHAN, D. Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially purified β -like toxin from *Staphylococcus schleiferi*. FEMS immunology and medical microbiology. v.36 (1-2) p. 95-102, 2003.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Biology of microorganisms. 8. ed. London: Prentice Hall International, 1997.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. v. 9 p. 34-39, 2001.

MAIDHOF, H., B. REINICKE, P. BLUMEL, B. BERGER-BACHI, H. LABISCHINSKI. *FemA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. J. Bacteriol. v. 173 p.3507-3513. 1991.

MANRIQUE, E. I.; GALVÃO L. L. Racionalização e controle de antimicrobianos. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo, Sarvier. p.117-130, 1997.

MARANGONI, D.V. *Staphylococcus aureus*. Inf. Hosp. : prevenção e controle. São Paulo, Sarvier. p. 573-591, 1997.

MARTINS, S.C.S.;FELIX, P. R. ; NASCIMENTO, G. G. F. Isolamento e caracterização de bactérias de diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade a quimioterápicos. Higiene Alimentar, Piracicaba. v.12 n.56 p.45-48, 1998.

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 Antibiogram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. J. Dairy Sci. v.90 p.1176-1185, 2007.

MORONI, P., PISONI,G., ANTONINI, M., VILLA, R., BOETHCER, P., CARLI, S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. J.Dairy Sci. v.89 p.2973-2976, 2006.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am., p.56-65, 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. A polymerase catalyzed chain reaction. In: WU, R (Eds.). Recombinant DNA – Part F. San Diego: Academic Press. p.335-350, 1987.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H. ; WATANBE, S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. v.29, p. 2240-2244, 1991.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D.; AMARAL, L.A. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina, à ação de antimicrobianos e quimioterápicos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.38 n.4 p.581-588, 1986.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Current concepts of bovine mastitis. 4.ed. Madison : NMC. 64p, 1996.

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

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

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

OBRITZHAUSER, W.; DEUTZ, A.; FUCHS, K. Vergleich von Klinischer und Bakteriologischer Untersuchung bei Akutmastiten von Milchkühen. *Tierärztl. Umsch.*, v. 50, p. 31-41, 1995.

OLIVE M.; BEAN P. Principles and applications of methods for DNA-based typing microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* v.37 p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, A.A.F.; M OTA, 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.

OSTERA, O.S, MARTIN, W., EDGE, V.L. Possible risk factors associated with penicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis in early lactation. *J. Dairy Sci.* 82:927–938, 1999.

OTTO, M., ECHNER, H., VOELTER, W., GOTZ, F. Pheromone crossinhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* v.69 p.1957–1960, 2001.

OTTO, M., ECHNER, H., VOELTER, W., GOTZ, F. Pheromone crossinhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* v.69 p.1957–1960, 2004.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA, D.F.; FERREIRA. L.C.S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 1521-1525, 1997.

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

PARK, P.W.; FOSTER, T.J.; NISHI E.; DUNCAN S.J.; KLAGSBRUN, M.; CHEN, Y. Activation of Syndecan-1 Ectodomain Shedding by *Staphylococcus aureus* α -Toxin and β -Toxin. *J. Biol. Chem.* V. 279 (1) p. 251-258, 2004.

PHONIMDAENG, P. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4: sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular Microbiology*. v. 4 p. 393-404, 1990.

PRESCOTT, M.L., HARLEY, J.P. AND KLEIN, D.A. Prokaryotic cell structure and function in Microbiology. WCB (Wm. C. Brown Publishers). p 33-72, 1996.

PRESTES, D. S., FILATI, A. CECIM, M. S. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam- Uma revisão. *Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia, Araguaiana*, v.9, n.1 p-48-59, 2003.

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

RABELLO, R.F. Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 100p. 2003.

RAUS, J.; LOVE, D. N. Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from veterinary clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.18, p.789-792, 1983.

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

REINOSO, E.; BETTERA, S.; FRIGERIO, C.; DIRENZO, M.; CALZOLARI, A.; BOGNI, C. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiol. Res.* v.159, p. 245-255, 2001.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* v.30 p.3217-3219, 1992.

RODRIGUES DA SILVA, E.; DA SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research, Ottawa*. v. 69, p. 260-264, 2005.

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

ROSEC J., GUIRAUD J., DALET C., RICHARD N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.* v.35 p.213-232, 1997.

SABAT A., KRZYSZTON-RUSSJAN J., STRZALKA W., FILIPEK R., KOSOWSKA K., HRYNIEWICZ W., TRAVIS J. , POTEMPA J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable number tandem repeat

analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin Microbiol. v.41 p.1801-1804, 2003.

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

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Sci., Washington. v.239 p.487-491, 1988.

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

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

SCHLEGELOVA, J., M. DENDIS, J. BENEDIK, V. BABAK, AND D. RYANEK. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. Veterinary Microbiology, Amsterdam. v. 92 p. 327-334, 2003.

SCHMITZ F.J., STEIERT M., TICHY H.V., HOFMANN B., VERHOEF J., HEINZ H.P., KÖHRER K., JONES M.E. Typing of methicillin-resistant *S. aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. J Med Microbiol. v. 47 p.341-351, 1998.

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

SHLAES, D. M.; GERDING, D. N.; JOHN JR, J. F.; CRAIG, W. A.; BONSTEINS, D. L.; DUNCAN, R. A.; EKMAN, M. R.; FARRER, W. E.; GREENE, W. H.; LORIAN, V.; LEVY, S.; MCGOWAN JR., J. E.; PAUL, S. M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F. C.; WATANAKUNADORN, C. Society of Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Clinical Infectious Diseases. v. 25 p. 584-599, 1997.

SHOPSIN B., GOMEZ M., WADDINGTON M., RIEHMAN M., KREISWIRTH B.N. Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. v.38 p.3453-3456, 2000.

SILVA, V. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, D. G. M. Biochemical characteristics of typical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and

environmental samples of brasilian dairy farms. Braz. J. of Microbiol., n.31, p.103-106, 2000.

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.

SINGER, M. S.; BERG*, L. M.; MCEVOY, C.; BERLIN, R. F.; BARGATZE, E. C. BUTCHER. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. Nat., n. 366, p. 695-618, 1993.

SKOV, R.; RMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A. R.; FRIMODT-MOLLER, N.; OLSSON LILJEQUIST, N.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. v.52 p.204–207, 2003.

SLIGHTOM, J. L.; DRONG, R. F.; CHEE, P. P. Polymerase chain reaction: gene detection, inverse PCR, and genetic engineering. In: GELVIN, S. B; SCHILPEROORT, R. A. (Eds.). Plant molecular biology manual. Dordrecht: Kluwer Academic Press. Section F4, p.1-24, 1995.

SORDELLI D.O., BUZZOLA F.R., GOMEZ M.I., STEELE-MOORE L., BERG D., GENTILINI E., CATALANO M., REITZ A.J., TOLLERSRUD T., DENAMIEL G., JERIC P., LEE J.C. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. J. Clin. Microbiol. v.38 p.846-850, 2000.

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. J. Food Prot. v.62 p.1150-1156, 1999

STRUELLENS, M. J., DELPLANO, A., GODARD, C., MAES, N., SERRUS, E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel eletrophoresis. Journal of Clinical Microbiology. v. 30 p. 2599-2602, 1992.

SWENSON,J.M., WILLIAMS,P.P, KILLGORE,G.,MOHR O'HARA, K. TENOVER, F.C. Performance of Eight Methods, Including Two New Rapid Methods, for Detection of Oxacillin Resistance in a Challenge Set of *Staphylococcus aureus* Organisms. Journal of Clinical Microbiology. v. 39 n.10 p.3785–3788, 2001.

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

TAKEUCHI, S., MAEDA,T., HASHIMOTO, N., IMAIZUMI,K., KAIDOH, T., HAYAKAWA Y. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. Veterinary Microbiology. v. 79 p.267-274, 2001.

TENOVER, F.C.; LANCASTER, M.V.; HILL, B.C.; STEWARD, C.D.; STOCKER, S.A.; HANCOCK, G. A.; O'HARA, C.M. ; CLARCK, N.C. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.* v.36, p.1.020-1.027, 1998.

TENOVER, F. C. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 32, p. 407-415,1994.

TERASAWA, L.B. Caracterização da Resistência à Oxacilina em Estafilococos Coagulase-Negativos Isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba – Paraná, Universidade Federal do Paraná, Dissertação de Mestrado, 2006.

THORNSBERRY, C. ; MCDUGAL, L.K. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin resistant (heteroresistant) staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* v. 11, p.1084-1091, 1983.

TOKUE, Y.; SHOJI, S.; SATOH, K. ; MOTOMYIA, M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.36, p. 6-9, 1992.

TRANter H.S. ; BREHM R.D. The detection and etiological significance of staphylococcal enterotoxins. *Reviews in Medical Microbiol.* v.5 p.56-64, 1994.

UBEDA, C., TORMO, M.A., CUCARELLA, C., TROTONDA, P., FOSTER, T.J., LASA, I., PENADES, J.R. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49: 193-210, 2003.

UZCUDUN, L.I. Biofilms bacterianos. *Actualidad.* v. 37 n. 15, 2004.

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

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

VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* v.25 p.6823-6831, 1991.

VIEIRA- DA- MOTTA, FOLLY, M. M.; SAKYIAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo. v. 32, p. 27-31, 2001.

VINTOY, J., F. M. AARESTRUP, C. E. ZINN, J. E. OLSEN. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet. Microbiol.* v.95 p.133–147, 2003.

VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 99, n. 15, p. 10102-10107, 2002.

VUONG, C., SAENZ, H. L., GOTZ, F. ; OTTO, M.. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* v.182 p. 1688–1693, 2000.

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

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

WAAGE, S., MORK, T., ROROS, A. AASLAND, D., HUNSHAMAR, A., ODGAARD, S. A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal Dairy Science*, v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999.

WATTS, J. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology.* v.16 p.41-46, 1988.

WEESE, J.S.; ROUSSEAU, J.; TRAUB-DARATZ, J.L.; WILLEY, B.M., MCGREER, A.J.; LOW, D.E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.226 p.580–583, 2005.

WELSH J. ; MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* v.18: 7213-7218, 1990.

WILLIAMS J., KUBELIK A., LIVAK K., RAFALSKI A., TINGEY S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* v.18 p.6531-6135, 1990.

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

ANEXOS

I- Espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-positivas provenientes de leite de vacas, com mastite, de distintas propriedades.

1.1.1

II- *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes propriedades caracterizados segundo perfis do gene *spaA*, *coa*, *agr*, ecovares e antibiótipos.

III- Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2)

ANEXO I

Espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivas provenientes de leite de vacas, com mastite, de distintas propriedades

Propriedade	Espécie (identificação)
1	<i>S.aureus</i> (1,3,5)
	<i>S.intermedius</i> (2,4,133)
	<i>S. hyicus</i> (130,132)
	<i>Staphylococcus</i> spp. (123,127,128,129,131)
2	<i>S.aureus</i> (7)
	<i>Staphylococcus</i> spp. (6,134,135,136)
3	<i>S.aureus</i> (8,9,10,12,13,14,15,16,17,18,19)
	<i>S.intermedius</i> (11,20,23)
	<i>Staphylococcus</i> spp. (21,22)
	<i>S. hyicus</i> (126)
4	<i>S.aureus</i> (24,25,27,28,29)
5	<i>S. hyicus</i> (26)
6	<i>S.aureus</i> (30)
7	<i>S.aureus</i> (31,32)
	<i>Staphylococcus</i> spp. (33)
8	<i>S.intermedius</i> (34)
9	<i>Staphylococcus</i> spp. (35,37,38)
	<i>S.intermedius</i> (36)
10	<i>S.intermedius</i> (39)
	<i>S.aureus</i> (40)
11	<i>S.aureus</i> (41)
	<i>S.intermedius</i> (43,44)
	<i>Staphylococcus</i> spp. (42)
12	<i>Staphylococcus</i> spp.
	<i>S.aureus</i> (46,47,48, 50,51,52)
13	<i>S.intermedius</i> (49)
	<i>S.aureus</i> (54,57)
	<i>S.intermedius</i> (58,59)
14	<i>Staphylococcus</i> spp. (53,56,60)
	<i>S.aureus</i> (65)
15	<i>S.intermedius</i> (63,64)
	<i>Staphylococcus</i> spp. (61,62)
16	<i>S.aureus</i> (66,67)
	<i>S.aureus</i> (69)
17	<i>S.intermedius</i> (70)
	<i>Staphylococcus</i> spp.(68,71,72,73)
18	<i>S.aureus</i> (74,75,76,77)
	<i>S.aureus</i> (78,80,81,82,83)
19	<i>Staphylococcus</i> spp (79)
	<i>S.intermedius</i> (84,87,88)
20	<i>S.aureus</i> (85,86)
	<i>S.intermedius</i> (90)
21	<i>Staphylococcus</i> spp. (89)
	<i>S.intermedius</i> (91,92)

	<i>S.intermedius</i> (93,94,99)
	<i>S.aureus</i> (96,97,98)
	<i>S. hyicus</i> (101,102,103,104,105)
21	<i>Staphylococcus</i> spp.(100,106,107)
	<i>S.intermedius</i> (108)
	<i>S. hyicus</i> (109,110,111,112,113)
22	<i>Staphylococcus</i> spp. (114,115)
	<i>S. hyicus</i> (116,118)
23	<i>Staphylococcus</i> spp. (117,119,124)
	<i>S. hyicus</i> (121)
24	<i>Staphylococcus</i> spp. (120,122)
	<i>S.intermedius</i> (146,148,149,150)
	<i>S. hyicus</i> (123)
25	<i>Staphylococcus</i> spp.(138,139,140,141,142,143,144,145,147)

ANEXO II

Staphylococcus aureus isolados de diferentes propriedades caracterizados segundo os perfis do gene *spaA*, *coa*, *agr*, ecovares e antibiótipos.

Propriedades	Isolados	<i>spaA</i> (pb)	<i>coa</i> (pb)	<i>agr</i> (pb)	Ecovares*	Antibiótipos
1	1	220	800	350	NE	1
1	3	315	520	550	Bovino	2
1	5	315	520	550	Bovino	13
2	7	315	520	550	NE	5
3	8	315	520	-	NE	2
3	10,12	315	520	550	Bovino	4
3	13	315	520	550	Bovino	15
3	14,16	315	520	550	NE	2
3	15	315	520	550	Bovino	5
3	17	315	520	-	NE	5
3	18	315	520	550	Bovino	1
3	19	315	520	550	NE	3
4	24	315	520	550	Bovino	5
4	25	315	520	550	NE	1
4	27	315	520	-	NE	2
4	28	315	520	550	NE	3
4	29	315	520	550	Bovino	15
5	30	315	520	-	NE	3
6	31	315	520	550	NE	5
6	32	315	520	550	NE	2
9	40	220	520	-	NE	3
10	41	220	520	350	NE	15
12	46,48	315	520	550	NE	3
12	47	315	520	550	Bovino	2
12	50	220	800	-	Bovino	2
12	51	220	520	350	NE	5
12	52	250	900	550	NE	5
13	54	315	520	-	Bovino	3
13	57	315	520	-	NE	15
14	65	315	520	-	NE	15
15	66	315	520	-	Bovino	2
15	67	280	520	350	NE	5
15	69	315	520	550	Bovino	7
16	74	300	800	550	Bovino	11
16	75	300	520	550	NE	12
16	76,77	250	520	350	Bovino	12
17	78	250	900	550	Bovino	2
17	80	315	520	550	Bovino	5
17	81	250	520	350	NE	1
17	82	300	520	550	NE	1
17	83	300	520	550	NE	5
18	85	300	520	-	NE	13
18	86	300	520	-	Bovino	15
21	96	280	520	-	Bovino	18
21	97	315	800	550	Bovino	8

21	98	315	800	550	Bovino	12
----	----	-----	-----	-----	--------	----

ANEXO III

Resultados obtidos através do teste de Qui-Quadrado (X^2). X Tabelado: 3,84 e Alfa 5%

Genes *icaA* e *icaD* X Crescimento em Ágar Vermelho Congo

Genes	Crescimento	
	positivo	negativo
Positivo	01	09
Negativo	28	103

Total: 141 X^2 (quiquadrado): **0,73**

Genes *icaA* e *icaD* X produção de “slime” em microplaca

<i>icaA</i> e <i>icaD</i>	Produção (+, ++, +++)	
	positivo	negativo
Positivo	10	2
Negativo	115	23

Total: 150 X^2 (quiquadrado): **23,0**

Gene *hla* X produção de alfa-hemolisina

<i>hla</i>	Alfa hemolisina	
	positivo	negativo
Positivo	28	14
Negativo	25	83

Total: 150 X^2 (qui-quadrado): **25,06**

Gene *hly* X produção de beta-hemolisina

<i>hly</i>	Beta hemolisina	
	positivo	negativo
Positivo	18	10
Negativo	26	96

Total: 150 X^2 (qui-quadrado): **20,28**

Gene *agr* X produção de alfa-hemolisina

<i>agr</i>	Alfa hemolisina	
	positivo	negativo
Positivo	23	14
Negativo	3	10

Total: 50 X^2 (qui-quadrado): **5,88**

Gene *agr* X produção de beta-hemolisina

<i>agr</i>	Beta hemolisina	
	positivo	negativo
Positivo	18	19
Negativo	3	10

Total: 50 X^2 (quiquadrado): **2,58**