

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS NO LEITE DE VACAS COM
MASTITE**

MARISTELA MARTINS DE SOUZA HALVERSON

**CAMPO GRANDE, MS
2017**

MARISTELA MARTINS DE SOUZA HALVERSON

FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS NO LEITE DE VACAS COM
MASTITE

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cássia Rejane Brito Leal

CAMPO GRANDE, MS

2017

*“Só existem dois dias no ano em que você
não pode fazer nada para ser mais feliz, ontem e amanhã”.*

Dalai Lama

*Às minhas filhas, Lina e Natalia,
que na inocência da infância
tiveram a grandeza da compreensão.*

A vocês, o meu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela sabedoria e discernimento que me permitiram realizar este trabalho, por iluminar meu caminho e guiar meus passos nos momentos de incerteza e decisão.

Aos meus pais, Marcos Antônio Martins de Souza e Maria da Penha Giurizatto Martins de Souza, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos de vida e princípios que me tornaram uma pessoa digna e capaz de realizar sonhos.

Ao meu esposo, Martin Richard Halverson, pela compreensão, amor, apoio e, principalmente, por ter cuidado tão bem de nossas filhas nos momentos em que eu estive ausente.

Às minhas filhas, Lina Martins Halverson e Natalia Martins Halverson, por tantos momentos felizes, de amor e carinho. Vocês são o melhor de mim.

Aos meus familiares e amigos que me ajudaram em muitos momentos desta trajetória, sempre com atitudes e palavras de incentivo.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cássia Rejane Brito Leal pela oportunidade, ensinamentos transmitidos e apoio durante toda a pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof^o Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos por todos os esclarecimentos e conhecimentos que contribuíram muito para este trabalho.

Ao médico veterinário, Rodrigo Leite Soares, residente do Programa de Residência em Medicina Veterinária Preventiva da UFMS, que esteve ao meu lado durante toda a pesquisa sem poupar esforços para que fosse bem sucedida.

À Lúcia Teresinha Restel da Silva, responsável técnica pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFMS, pela amizade e auxílio no laboratório.

Ao Lair Covizzi Junior, residente do Programa de Residência em Medicina Veterinária Preventiva e ao Thiago Gonsalo da Silva, acadêmico de Medicina Veterinária da UFMS, pela ajuda na realização dos exames.

A todos os acadêmicos e estagiários do curso de Medicina Veterinária da UFMS que contribuíram para a realização desta pesquisa.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação da UFMS pelos ensinamentos e dedicação.

A todos os meus colegas de trabalho da empresa Diagno Vet Laboratório Veterinário e da Instituição Universidade Anhanguera-Uniderp Agrárias, pela compreensão e apoio.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivo específico	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Mastite bovina	15
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.3 Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.4 Resistência a antimicrobianos	18
4 REFERÊNCIAS.....	21
ARTIGO 1 - MASTITE BOVINA POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> , ASPECTOS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	29

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Micro-organismos isolados de leite de vacas com mastite em oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul.....	35
Tabela 2 - Características fenotípicas e genotípicas de 61 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundos de leite de vacas com mastite em oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul.. ..	36
Tabela 3 – Perfil de sensibilidade antimicrobiana de 61 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de amostras de leite de vacas com mastite em oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain heart infusion (Infusão cérebro coração)</i>
CA-MRSA	<i>Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus meticilina resistente associado a comunidade)</i>
CCS	<i>Contagem de células somáticas</i>
CIM	<i>Concentração inibitória mínima</i>
CMT	<i>California Mastitis Test (Teste de mastite Califórnia)</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas e de Laboratório)</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)</i>
HA-MRSA	<i>Healthcare-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus meticilina resistente hospitalar)</i>
LA-MRSA	<i>Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus resistente a meticilina associado a animais de produção)</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus meticilina resistente)</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PBP	<i>Penicillin-binding protein (Proteína de ligação da penicilina)</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)</i>
SCN	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>
SE	<i>Enterotoxina</i>

RESUMO

A mastite bovina é uma inflamação das glândulas mamárias causada por grande variedade de agentes como bactérias e fungos, provocando grande prejuízo para a bovinocultura de leite. Dentre os patógenos causadores da enfermidade, *Staphylococcus aureus* é o agente etiológico que mais se destaca. O uso de antibióticos tanto para profilaxia como para tratamento da mastite, pode levar ao aparecimento de patógenos resistentes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar perfil de resistência antimicrobiana e detecção do gene *mecA* em *S. aureus* isolados em amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica, oriundas de oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul. Foram obtidas por conveniência 237 amostras, das quais 61 (25,73%) apresentaram crescimento de *S. aureus*. Estes isolados foram submetidos às provas de catalase, coagulase, hemolisina, testes de susceptibilidade antimicrobiana usando a técnica de disco-difusão e PCR para detecção do gene *mecA*, associado à MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina). Na avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos, os mais eficientes (100% de eficácia) foram amoxicilina + ácido clavulânico, bacitracina, cefalotina, cefoxitina, enrofloxacina, gentamicina, marbofloxacina, norfloxacina e vancomicina, seguidos por azitromicina, doxiciclina e oxacilina com 98,36% de sensibilidade, neomicina (96,72%), eritromicina (93,45%) e tetraciclina (90,16%). Foi observada resistência maior a alguns antimicrobianos β -lactâmicos como amoxicilina (26,23%), penicilina G (23,95%) e ampicilina (22,95%). Análises moleculares pela técnica de PCR identificaram o gene *mecA* em 1,64% (1/61) das amostras. Os resultados do presente estudo evidenciam a presença de *S. aureus* como agente etiológico de mastite bovina mais prevalente nas propriedades leiteiras analisadas. A susceptibilidade do agente a diversos antimicrobianos testados *in vitro* é um fator positivo e favorece o controle da doença quando detectada, mas a presença de um isolado portador do gene *mecA* merece maior atenção para não se propagar aos rebanhos leiteiros e promover risco à saúde pública.

Palavras-chave: Leite, *mecA*, MRSA, antimicrobiano.

ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammation of the mammary glands caused by a wide variety of pathogens, including bacteria and fungi, and is responsible for significant losses in the dairy industry. Amongst bacterial causes of the disease, *Staphylococcus aureus* is the principal etiological agent. The use of antimicrobials as prophylactics and for treatment of mastitis can lead to antimicrobial resistant strains of *S. aureus*. The objective of this work was to characterize antimicrobial resistance profile and detect the *mecA* gene of *S. aureus* in milk samples from cows with clinical or subclinical mastitis, collected from eight dairy farms in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. A total of 237 samples were collected, of which 61 (25.73%) presented growth of *S. aureus*. These samples were tested for catalase, coagulase, hemolysin production, antimicrobial resistance using the disk diffusion agar method e PCR for identification the *mecA* gene, which is associated with MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*). The most efficient antimicrobials tested for antimicrobial resistance included: amoxicillin + clavulanic acid, bacitracin, cephalixin, cephalotin, enrofloxacin, gentamycin, marbofloxacin, norfloxacin and vancomycin, all with 100% efficacy, followed by azithromycin, doxycycline and oxacillin with 98.36%, neomycin with 96.72 %, Erythromycin with 93.45% and tetracycline with 90.16%. *S. aureus* isolates were resistant to several β -lactam antibiotics, including amoxicillin (26.23%), penicillin G (23.95%) and ampicillin (22.95%). PCR analysis identified the *mecA* gene in 1.64% (1/61) of the samples. The results of the present study show the presence of *S. aureus* as the most prevalent etiological agent of bovine mastitis in the dairy farms analyzed. The susceptibility of the bacteria to several antimicrobials tested *in vitro* may facilitate control of the disease when detected, but the presence of an isolate carrying the *mecA* gene calls for greater attention in order to avoid dissemination to the dairy herds and to reduce risk to public health.

Key Words: Milk, *mecA*, MRSA, antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

A mastite é a principal doença na bovinocultura de leite e impacta negativamente a economia, pois afeta a produção e a qualidade do leite em rebanhos comerciais. Além de reduzir o rendimento industrial dos derivados lácteos, a mastite também tem aspecto importante na saúde humana, por veicular patógenos que podem causar zoonoses, e que geram produtos metabólicos e enterotoxinas, apresentando riscos ao consumidor de leite e derivados (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). Bactérias e fungos são os principais agentes causadores dessa inflamação das glândulas mamárias, que se apresenta de forma clínica ou subclínica. Entre os patógenos mais frequentes da mastite bovina, estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e outros, como *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* e *Listeria monocytogenes*. Dentre estes, *Staphylococcus aureus* se destaca por ser o agente infeccioso mais prevalente e persistente das infecções intramamárias e o que mais causa prejuízos à pecuária leiteira. (PELLEGRINO *et al.*, 2011).

Como um dos principais agentes da mastite bovina, *S. aureus* pode colonizar a pele do teto, o canal do teto ou o interior da glândula mamária, principalmente se houver lesão nesta região. Na maioria das vezes, a transmissão ocorre por meio das mãos do ordenhador e toalhas de uso múltiplo. O agente se instala no interior da glândula mamária, fixando-se às células epiteliais e causando uma infecção. Mecanismos patogênicos incluem fatores de virulência, ou seja, moléculas produzidas pelo patógeno que aumentam a capacidade da bactéria colonizar o hospedeiro e danificar tecidos, incluindo toxinas, adesinas, enzimas e imunomoduladores, (WATKINS *et al.*, 2012). Estes fatores causam necrose do estroma e parênquima mamário, que resulta em perda de função secretora, reduzindo a produção de leite e, uma vez infectado, o quarto mamário passa a ser um reservatório do agente.

As infecções causadas por *S. aureus* geralmente apresentam-se na forma subclínica, mas casos agudos podem resultar em mastite gangrenosa e morte do animal. Devido a sua grande capacidade de invasão, *S. aureus* se instala em partes mais profundas da glândula mamária, e geralmente há formação de tecido fibroso no

foco da infecção, o que impede ou dificulta o acesso dos antimicrobianos às bactérias. Isto ajuda a explicar o fato de que infecções causadas por *S. aureus* são de longa duração, tendem a cronicidade e têm baixa taxa de cura espontânea ou mesmo com o uso de antibióticos. As dificuldades para controle de *S. aureus* ocorrem em razão de falhas na detecção de todos os animais infectados, uma vez que a mastite subclínica não mostra alterações na glândula mamária e nem no aspecto do leite. Além disso, a resistência do agente aos antimicrobianos dificulta o tratamento (SANTOS e FONSECA, 2006).

Staphylococcus aureus também possui grande importância por causar patologias com quadros clínicos variados em uma gama de hospedeiros, como mastite em bovinos e ovinos, lesões supurativas em suínos, botriomicose, artrites e mastites em equinos, piodermites, infecções urinárias e disco espondilites em cães, lesões de pele e artrites em aves. Em humanos pode causar infecções brandas de pele, tecidos moles e trato urinário e ainda, patologias mais graves, como síndrome da pele escaldada, gastroenterite, endocardite, meningite, pneumonia, osteomielite, síndrome do choque tóxico e septicemia (MCVEY *et al.* 2016).

Dentro deste mesmo contexto, existe ainda uma preocupação crescente relacionada com o aumento da resistência das bactérias aos antimicrobianos usados na terapêutica. A combinação do uso indiscriminado dos primeiros antimicrobianos ao longo de décadas, e a capacidade de *S. aureus* se tornar resistente a eles, provocou surgimento de cepas resistentes a penicilina durante a década de 50. Como consequência, o tratamento de *S. aureus* com penicilina foi largamente substituído pela meticilina. Em 1961, foi descoberto o primeiro caso de *S. aureus* resistente a esta droga, e a bactéria foi denominada MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Atualmente, este nome histórico permanece para o grupo de cepas de *S. aureus* que mostrou resistência sequencial ao grupo de antimicrobianos baseados na penicilina, e que continua desenvolvendo resistência múltipla contra uma lista crescente de antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, incluindo oxacilina, cefalosporinas e carbapenens (CDC, 2017). A eficácia do uso de antimicrobianos tem sido comprometida pelo aparecimento de agentes patogênicos resistentes, e a história da MRSA têm grande importância na etiologia das doenças, tanto para o ser humano, quanto para os animais (OLIVER e MURINDA, 2012).

Disseminação e aumento do número de cepas de MRSA tem sido uma preocupação dos órgãos responsáveis pela saúde pública. Manter o controle sob

MRSA envolve também a participação do setor de produção de leite uma vez que o agente pode ser transmitido através dele para a população humana. Elaboração de estratégias efetivas para monitoramento, profilaxia e tratamento, principalmente a respeito do uso sensato de antimicrobianos é de suma importância (FITZGERALD, 2012).

Estudos realizados no Brasil para avaliar a susceptibilidade de patógenos causadores de mastite bovina aos antimicrobianos têm mostrado um crescente aumento da resistência, principalmente quando o agente envolvido é *S. aureus* (SILVA *et al.* 2012). Deve-se levar em consideração o fato de que a mastite é a principal causa do uso de antimicrobianos na pecuária leiteira, tanto para tratamento como para prevenção da doença (RUEGG, 2009).

No Brasil a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana tem sido realizada rotineiramente pela técnica de difusão de disco, segundo a recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), cujos critérios de interpretação da medida do halo de inibição que determinam a resistência ou sensibilidade são baseados em cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) (CLSI, 2017).

A susceptibilidade a antimicrobianos também pode ser avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), método quantitativo que permite determinar a dose adequada do antimicrobiano para inibição bacteriana (WINN, JR *et al.*, 2010). Esta técnica permite o uso de amostras clínicas, isoladas de animais com mastite, para a determinação da concentração mínima dos antimicrobianos a ser alcançada no úbere, possibilitando refinamento de estratégias de tratamento. Conhecer a susceptibilidade do agente aos antimicrobianos é importante para que não haja utilização indiscriminada e errônea destes fármacos, o que favorece cada vez mais a ocorrência de resistência do micro-organismo às drogas utilizadas na terapêutica (BRITO *et al.*, 2001).

Diante da importância de *S. aureus* na mastite bovina e sua relevância em saúde pública, este estudo teve como objetivo pesquisar a ocorrência de mastite bovina causada por *S. aureus* em oito propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso do Sul, determinando a frequência do micro-organismo e seu perfil de resistência, por meio de provas bioquímicas e moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a presença de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite clínica ou subclínica, oriundo de propriedades localizadas em Mato Grosso do Sul, e caracterizar o seu perfil de resistência antimicrobiana.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de *S. aureus* isolados no leite de bovinos com mastite na região estudada.
- Determinar o perfil de resistência antimicrobiana de *S. aureus* isolados de leite de bovinos com mastite pelo teste disco-difusão.
- Detectar a presença do gene de resistência *mecA* nos isolados de *S. aureus* avaliados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mastite Bovina

Mastite bovina é a inflamação da glândula mamária, podendo ser de origem traumática, alérgica, metabólica e infecciosa. A mastite infecciosa é a mais importante, por ser mais frequente e causar prejuízos consideráveis para o produtor e para a indústria leiteira, afetando a produção e a qualidade do leite em rebanhos comerciais, além de reduzir o rendimento industrial dos derivados lácteos. A mastite também tem aspecto importante na saúde humana, por veicular pelo leite e derivados patógenos que podem causar zoonoses, além de enterotoxinas que oferecem riscos ao consumidor (GUIMARÃES e LANGONI, 2009).

A doença é classificada como mastite clínica ou subclínica. Na sua apresentação clínica é facilmente diagnosticada pelas alterações macroscópicas do úbere e/ou do leite, como a presença de edema no quarto mamário, endurecimento

do teto, dor a palpação, aumento da temperatura, vermelhidão e em alguns casos a presença de coágulos, pus e sangue no leite. Nos quadros mais severos, o animal apresenta febre, perda de apetite, emagrecimento desidratação e septicemia, que pode evoluir para morte (FREITAS *et al.*, 2005).

Entretanto, na forma subclínica, alterações no leite e no úbere não são perceptíveis visualmente e o diagnóstico deve ser feito com a utilização do *California Mastitis Test* (CMT) e/ou contagem de células somáticas como exames de triagem, e confirmação com exame de cultura e isolamento do agente presente no leite (SCHALM e NOORLANDER, 1957).

3.2 *Staphylococcus aureus*

Alexander Ogston, cirurgião escocês, em 1880 descobriu a causa do pus, observando microscopicamente grupos de organismos redondos isolados de pus de pacientes pós-cirurgias, e inoculando e cultivando estas bactérias em ovos de galinha (OGSTON, 1881). Ogston não foi a primeira pessoa a descrever “micrococci” (da palavra grega “kokkos”, que significa frutinha), que em forma de corrente tinha sido designado de “*Streptococci*” por Billroth (1874). In 1882, Ogston deu o nome de “*staphylococci*,” para a massa de bactérias, da palavra Grega “staphyle”, que significa massa de uvas (OGSTON, 1882). Em 1884, Anton J. Rosenbach, um cirurgião alemão, isolou duas cepas de *Staphylococcus*, nomeando-as pela pigmentação das colônias: *Staphylococcus aureus*, do latim *aurum* para dourado, e *Staphylococcus albus* (atualmente *epidermidis*), da palavra em latim *albus* para branco (ROSENBACH, 1884).

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos, medindo aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos. Apresentam-se, microscopicamente, isolados ou aglomerados em forma de “cachos de uva” e podem causar diversas doenças ao ser humano e aos animais, cuja severidade irá variar de acordo com as características de virulência da bactéria e o hospedeiro envolvido (WINN Jr *et al.*, 2010). Embora seja classificado como patógeno oportunista, *S. aureus* tem um amplo repertório de infecções possíveis. Normalmente, é um colonizador transitório de pele ou da mucosa de humanos e de animais, podendo causar doença quando ocorre lesão da pele ou comprometimento

do sistema imunológico do hospedeiro. *S. aureus* é onipresente no ambiente, podendo ser encontrado em um terço das pessoas ao redor do mundo. O processo da doença tem dois possíveis mecanismos conhecidos: produção de toxinas e colonização que causa invasão e destruição tecidual. Esta bactéria produz muitos fatores de virulência, como enzimas coagulase e termonuclease, e toxinas como as hemolíticas (hemolisinas), as enterotoxinas, entre outros, causando graves infecções ao acessar uma porta de entrada do hospedeiro. Pelo fato de *S. aureus* estar se tornando resistente a muitos agentes antimicrobianos, as infecções causadas por esta bactéria estão se tornando cada vez mais perigosas, principalmente em ambiente hospitalar (REYGAERT, 2013).

3.3 Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*

A capacidade de *S. aureus* causar infecções está relacionada a expressão de vários fatores de virulência como proteínas de superfície, biofilmes, exoenzimas, exotoxinas e toxinas esfoliativas. Todos esses fatores permitem a adesão da bactéria aos tecidos do hospedeiro e evasão do sistema imunológico causando infecções e efeitos tóxicos. *S. aureus* tem pelo menos 25 diferentes toxinas, 15 componentes de superfície reconhecidos como moléculas de adesão, 20 moléculas de evasão do sistema imune e vários outros fatores de virulência conhecidos (FLUIT, 2012; COSTA *et al.*, 2013; EL ABA *et al.*, 2016).

A coagulase é uma enzima que converte o fibrinogênio em fibrina, provocando a deposição dessa fibrina em torno do microorganismo e dificultando a fagocitose celular. É apontada como a primeira linha de defesa do *S. aureus* e indica potencial de virulência por proteger as células da fagocitose ((MARTINEZ *et al.*, 2001; SANDEL e McKILLIP, 2004).

Isolados de *S. aureus* também secretam hemolisinas (alfa, beta, gama e delta). As hemolisinas alfa e beta induzem mudanças pró-inflamatórias nas células, que inativam o sistema imune por efeito citotóxico direto, resultando na degradação dos tecidos (NAGASE *et al.*, 2002).

Sendo assim, diversos fatores de virulência estão presentes nas infecções estafilocócicas, porém a intoxicação alimentar depende apenas da produção de enterotoxinas (SEs) (LE LOIR *et al.*, 2003). As enterotoxinas clássicas são divididas em cinco tipos sorológicos (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) baseado na

antigenicidade das mesmas. *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas representam os principais agentes de intoxicação alimentar para os humanos, principalmente por produzirem enterotoxinas resistentes à inativação pelas proteases gastrointestinais tais como pepsina, além de apresentarem termorresistência. Como exemplo, a enterotoxina A mantém sua atividade biológica após 28 minutos a 121°C. Portanto, embora a bactéria seja destruída pelo calor, as toxinas permanecem em alimentos cozidos (JARRAUD *et al*, 2001; ORWIN *et al*, 2001)

3.4 Resistência a antimicrobianos

Uma preocupação crescente está relacionada com o aumento da resistência de bactérias aos antimicrobianos usados na terapêutica, sendo *Staphylococcus aureus* o principal micro-organismo investigado nos estudos de susceptibilidade a antimicrobianos (MALINOWSKI *et al*. 2002). Hoje a atividade de produção animal tem sido considerada como um dos fatores que contribuem para o evento da resistência. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera fontes de *S. aureus* no setor animal com potencial de causar infecções na população humana e classificam os antimicrobianos de acordo com sua importância indicando quais devem ser reservados para uso exclusivo na população humana e quais devem ser utilizados na área veterinária, citando as bactérias implicadas na transmissão entre animais e humanos (AGISAR, 2011).

O aumento da densidade populacional nos lotes e rebanhos requer o emprego de antimicrobianos na profilaxia ou controle de infecções, que por sua vez tem levado à seleção de linhagens bacterianas mais resistentes, por pressão de seleção (SANTOS, 2013).

A mastite é a principal causa do uso de antimicrobianos, na pecuária leiteira, tanto para tratamento como para prevenção da doença (RUEGG, 2009). A eficácia do uso desses antimicrobianos pode estar comprometida pelo aparecimento de agentes patogênicos resistentes a eles e que têm grande importância na etiologia da doença, tais como *S. aureus*. (OLIVER e MURINDA, 2012). A ampla utilização de antimicrobianos a partir de 1950, fez com que houvesse o aparecimento da resistência. O uso indiscriminado dos princípios químicos, a utilização de dosagens erradas, ou tempo inadequado de tratamento, são alguns dos fatores que

provocaram a seleção de cepas resistentes, conferindo ao micro-organismo a capacidade de resistir à ação das drogas, seja por mutações espontâneas ou mediação por plasmídeos (LOWY, 2003).

Staphylococcus aureus é um dos micro-organismos nos quais mais se observa resistência a antimicrobianos e com uma preocupante rapidez. No início da década de 40, após alguns anos da introdução da penicilina no tratamento de infecções causadas por este micro-organismo, surgiram cepas resistentes à droga que eram capazes de produzir betalactamases, anteriormente denominadas de penicilinases. Estima-se que aproximadamente 80% de todos isolados de *S. aureus* sejam penicilina-resistentes (DEURENBERG, 2007). Outros antimicrobianos β -lactâmicos foram desenvolvidos como meticilina e oxacilina. Poucos anos depois da descoberta da meticilina, cepas de *S. aureus* resistentes a ela foram observadas e denominadas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). A meticilina foi retirada do mercado, mas o termo MRSA permanece atualmente pela sua relevância histórica para descrever o fenômeno de resistência ao grupo de β -lactâmicos (SANTOS *et al.*, 2007; GOTO, 2009).

Algumas drogas usadas em combinação aos β -lactâmicos, como amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam, têm capacidade de inibir a ação das β -lactamases e destruir o micro-organismo, mas isto não soluciona por completo o problema da resistência (MAITI, 1998; GREENWOOD, 2008). Existem quatro mecanismos gerais de resistência das bactérias à ação dos antimicrobianos: entrada limitada da droga por diminuição da permeabilidade da parede celular do patógeno, modificação do sítio de ação da droga devido a mudança estrutural do alvo, inativação da droga por enzimas produzidas pelo patógeno e bomba de efluxo da droga. Embora exista uma grande variedade de mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, um dos mecanismos mais importantes é a produção de β -lactamases, que são enzimas capazes de hidrolizar o anel β -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e outros antimicrobianos relacionados, tornando-os inativos (ZYGMUNT *et al.*, 1992).

O mecanismo de resistência à meticilina está relacionado à presença de uma proteína, denominada PBP2a, resultante de um gene cromossômico, denominado *mecA* que caracteriza MRSA. A PBP2a substitui a PBP (penicillin binding protein), enzima envolvida na construção da parede celular, isso acarreta em menor afinidade

de ligação do antimicrobiano ao patógeno, permitindo o seu desenvolvimento (LIM e STRYNADKA, 2002). O gene *mecA* não é encontrado exclusivamente em MRSA, sendo possível estar presente em outras bactérias, inclusive *Staphylococcus coagulase negativo*. O gene *mecA* também pode ser transferido horizontalmente de uma espécie de bactéria para outra. A possibilidade de compartilhamento horizontal de material genético entre bactérias deu a Barbara McClintock (McCLINTOCK, 1950) o Prêmio Nobel de Medicina em 1983. Este mecanismo, denominado de “Elementos Móveis Genéticos” foi apontado como importante na transmissão de MRSA (FITZGERALD *et al.*, 2012).

Em poucas décadas o MRSA tornou-se um problema para os hospitais, sendo um desafio diário aos profissionais de saúde. Hoje em dia está comprovado que indivíduos na comunidade, fora de ambiente hospitalar, também podem adquirir este patógeno. Nestes indivíduos, MRSA é denominado de CA-MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente associada à comunidade) e são encontrados entre pessoas saudáveis, sendo cada vez mais frequentes infecções entre grupos de pessoas que praticam esportes de contato, em escolas, ou que tem condições sanitárias precárias. Estima-se que uma a cada três pessoas tem *S. aureus* presente na pele, e que aproximadamente 2% da população têm CA-MRSA. Cepas encontradas em hospitais ou outros setores de saúde são denominados de HA-MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente hospitalar), sendo mais comuns entre pacientes com sistema imunológico comprometido, adquiridos principalmente durante procedimentos invasivos, como cirurgias, e que podem causar infecções mais graves que afetam tecidos moles, ossos, articulações, corrente sanguínea, coração e/ou pulmão. Portanto, estas cepas associadas à comunidade ou adquiridas na comunidade, denominadas CA-MRSA, não estão epidemiologicamente relacionadas às HA-MRSA adquiridas em hospitais, pois são classificados de acordo com o ambiente em que são prevalentes. (LOPES, 2005; GELATTI *et al.*, 2009). Segundo Drago (2007), MRSA foi o agente responsável por mais de 50% dos casos clínicos de doenças causadas por *S. aureus* nos Estados Unidos.

Atualmente, sabe-se que existem cepas tipicamente encontradas entre populações de animais de produção, denominados de LA-MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina associado a animais de produção - “Livestock”). Transmissão entre animais e humanos tem sido registrada, inclusive entre vacas leiteiras e funcionários das fazendas (JUHASZ-KASZANYITZKY *et al.*, 2007).

Estudos realizados evidenciam que as cepas CA-MRSA na população humana são de origem animal. Sabe-se que a cepa epidêmica CA-MRSA (CC97), hoje presente na população humana em quatro continentes, dentro do estudo genômico da *S. aureus*, foi identificada como de origem bovina (SPOOR *et al.*, 2013). Os autores concluíram que existem perigos evidentes da transmissão de MRSA entre a população humana e a bovina. CA-MRSA (CC97) é uma das cepas do grupo atualmente presente no Brasil (SCHUENCK *et al.*, 2009). Também já foi relatada a presença de MRSA em animais de companhia (cães) e no leite de vacas portadoras de mastite subclínica, inclusive no Brasil (SILVA *et al.*, 2014). Esses estudos mostram a importância do diagnóstico de animais que apresentam mastite, principalmente os portadores da forma subclínica da doença.

Educação do setor de produção leiteira sobre boas práticas de manejo, para evitar transmissão na interface animal-homem e homem-animal, detecção precoce para que seu produto não seja consumido, e desenvolvimento de estratégias para tratamento de mastites com cuidados apropriados, são pontos fundamentais para o controle da transmissão do agente. Identificação de MRSA no rebanho bovino implica em questões de saúde pública, sendo importante a participação e cooperação em programas internacionais de monitoramento de MRSA, para ter acesso à estratégias e medidas de controle mais coerentes (SCHUENCK *et al.*, 2009).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGISAR-Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. World Health Organization (WHO). 2011. 3rd Revision

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53(5), p. 531-537, 2001.

BILLROTH, T. **Coccobacteria séptica**, 240 pp, 1874.

CDC-CÓDIGO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. Lei 8.078 de 11/09/90. Brasília, Diário Oficial da União. Atualizado em 2017.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-seventh edition. CLSI document M100-S27. 2017. Clinical and Laboratory Standard Institute.

COSTA, A.R.; BATISTÃO, D.W.; RIBAS, R.M.; SOUSA, A.M.; PEREIRA, M.O. AND BOTELHO, C.M. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. In A. MENDEZ VILAS, Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: **Science, Technology and Education**, vol. 1, p. 702-710, 2013:

DEURENBERG, R.H.; VINK, C., KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E.E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p. 222-235, 2007.

DRAGO, L.; DE VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M. R. In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Diseases**, v.7, p.111, 2007.

EL-BAZ, R.; EID RIZK, D.; BARWA, R.; HASSAN, R. Virulence factors profile of *staphylococcus aureus* isolated from different clinical sources. **New Egyptian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 126-132, 2016.

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

FITZGERALD, J.R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. **Trends in Microbiology**. v. 20, p.192–198, 2012

FLUIT, A.C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 735–744, 2012;

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JR; J.W.; STAMFORD T.L.M.; et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados do leite de vacas com mastite no Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 171-177, 2005.

GELATTI, L.; BECKER, A.; BONAMIGO, R.; AZEVEDO, P. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, Oct., 2009.

GOTO, H.; SHIMADA, K.; IKEMOTO, H.; OGURI, T. Study Group on Antimicrobial Susceptibility of Pathogens Isolated from Respiratory Infections. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from more than 10,000 patients with infectious respiratory diseases: a 25-year longitudinal study. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v.15, p. 347-360, 2009

GREENWOOD, D. **Antimicrobial Drugs: Chronicle of a Twentieth Century Medical Triumph**. New York, NY: 2008, Oxford University Press, p. 85-139.

GUIMARÃES F.F.; LANGONI H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.16, p. 38-41, 2009.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 669-677, 2001.

JUHASZ-KASZANYITZKY, E., JANOSI, S., SOMOGYI, P., DAN, A., VAN DER GRAAFVAN BLOOIS, L., VAN DUIJKEREN, E., WAGENAAR, J. A.. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 13, p. 630–632, 2007.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LIM D.; STRYNADKA, N.C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Structural Biology**, v.11, p. 870-876, 2002.

LOPES, H.V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.7(3): p. 34-36, 2005.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111(9), p. 1265-1273, 2003.

MAITI, S.N.; PHILLIPS, O.A.; MICETICH, R.G.; LIVERMORE, D.M. Beta-lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. **Current Medicinal Chemistry**, v.5, p. 441-456, 1998.

MALINOWSKI, E.; KLOSSWSKA, A.; KACZMAROWSKI, M.; LASSA, H.; KUZMA, K. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, p.46:289-294, 2002.

MARTINEZ, T. C. N.; LABORDA, S. S.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M. *et al.* Caracterização de *Staphylococcus sp.* isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 1, n. 2, p. 48-53, 2001.

MCCLINTOCK, BARBARA. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 36, p. 344-355, 1950.

MCVEY, D.S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2016, 617p.

NAGASE, N.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 12, p. 1169-1172, 2002.

OGSTON, A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. **British Medical Journal**, v. 1, p. 369-375, 1881.

OGSTON A. Micrococcus poisoning. **Journal of Anatomy and Physiology**, v.17, p. 24-58, 1882.

OLIVER, S.P.; MURINDA, S.E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, p. 165-185, 2012.

ORDEN, J.A.; GOYACHE, J.; HERNANDEZ, J.; DOMENECH, A. SUAREZ, G.; GOMEZ-LUCIA, E. Production of staphylococcal enterotoxins and TSST-1 by coagulase negative Staphylococci isolate from ruminant mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.39, p. 144-148, 1992.

ORWIN, P.; LEUNG, D.; DONAHUE, H.; NOVICK, R. AND SCHLIEVERT, P. Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p.2916-2919, 2001.

PELLEGRINO, M.S.; FROLA, I.D.; ODIERNO, L.M.; *et al.* Mastitis bovina: resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.12, n.7, 2011.

PEREIRA, M.A.; PEREIRA, J.L.; SERRANO, A.M.; BERGDOLL, M.S. Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, v.14, n.68, p. 32-39, 2000.

REYGAERT, W.C. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. In: Méndez-Vilas, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, p. 297–305, 2013.

ROSENBACH, A.J. Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-**Krankheiten des Menschen. Wiesbaden**, J.F. Bergmann, 1884. p. 18.

RUEGG, P.L. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. **Journal of Animal Science**, v. 87, p.43-55, 2009.

SANDEL, M.K.; McKILLIP, J.L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v. 15, p. 5–10, 2004.

SANTOS, M. V. Mastite bovina e o uso de antibióticos. **Mundo do Leite**, v.61, p.18 - 20, 2013.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole. 2006. P.314.

SANTOS, A. L.; OLIVEIRA, D.; SANTOS 2, C.; et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p. 413-423, 2007.

SCHUENCK, R.P.; NOUÉR, S.A.; DE OLIVEIRA, W. C.; et al. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 434–441, 2009.

SILVA, E.R.; SILVA, T.R.M.; PEREIRA, A.M.G. et al. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina subclínica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p.118-123, 2012.

SILVA N.C.C.; GUIMARÃES F.F.; MANZI M.P.; et al. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.106, p. 227-233, 2014.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental and observation lading to development of California mastitis test. **Jounal of American Veterinary Medical Association**, v.130,p.199-204,1957.

SPOOR, L.; MCADAM, P.; WEINERT, L.; et al. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated MRSA. **mBio**, v. 13, p. 1-6, 2013.

VELÁZQUEZ, M.M.E. Emergence and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Public Health of Mexico**, v.5: p.1-17, 2005.

VERNOZY-ROSAND, J.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C. BES, M.; BRUM, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 271-280, July 1996.

WATKINS, R. R.; DAVID, M. Z.; SALATA, R. A. Current concepts on the virulence mechanisms of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 6, p. 1179-1193, 2012.

WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; et al. **Diagnóstico microbiológico**: 2010. **Texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1465p.

WONG, A.C.L.; BERGDOLL, M.S. **Staphylococcal food poisoning**. In: **CLIVER, DO; RIEMANN, H.P. Foodborne Diseases**. 2.ed. Amsterdam: Academic Press, 2002. p. 231- 248.

ZYGMUNT, D.; STRATTON, C.W.; KERNODLEI, D.S.. Characterization of Four 13-Lactamases Producedby *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 440-445, 1992.

CAPITULO 2

ARTIGO

Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*, aspectos de virulência e resistência antimicrobiana

Bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, virulence aspects and antimicrobial resistance

Maristela Martins de Souza Halverson¹, Rodrigo Leite Soares², Cássia Rejane Brito Leal³, Carlos Alberto do Nascimento Ramos³.

¹Médica Veterinária Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

²Médico Veterinário Residente do Programa de Residência em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

³Professor Adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo: O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana e detecção do gene *mecA* de *Staphylococcus aureus* isolados em amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica, oriundas de oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul. Foram obtidas 237 amostras, das quais 61 (25,73%) apresentaram crescimento de *S. aureus*. A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo teste de difusão em disco e os antimicrobianos mais eficientes (100% de eficácia) foram amoxicilina + ácido clavulânico, bacitracina, cefalotina, cefoxitina, enrofloxacina, gentamicina, marbofloxacina, norfloxacina e vancomicina, seguidos por azitromicina, doxiciclina e oxacilina com 98,36% de sensibilidade, neomicina (96,72%), eritromicina (93,45%) e tetraciclina (90,16%). Foi observada maior resistência a alguns antimicrobianos β -lactâmicos como amoxicilina

(26,23%), penicilina G (23,95%) e ampicilina (22,95%). Análise molecular realizada pela técnica de PCR identificou o gene *mecA* associado à resistência de *S. aureus* a meticilina em um isolado de *S. aureus* (1/61) que corresponde a 1,64%. Os resultados do presente estudo evidenciam a presença *S. aureus* como agente etiológico de mastite bovina mais prevalente nestas propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul. A suscetibilidade destes isolados a diversos antimicrobianos testados *in vitro* é um fator positivo que favorece o controle da doença quando detectada, mas a presença de isolado portador do gene *mecA* merece maior atenção para não se propagar nos rebanhos leiteiros e promover risco para a saúde pública.

Palavras-chave: Leite, *mecA*, MRSA, antimicrobiano.

Abstract: The aim of this study was to characterize the antimicrobial resistance profile and to detect the *mecA* gene of *Staphylococcus aureus* in milk samples from cows with clinical or subclinical mastitis collected from eight dairy farms within the state of Mato Grosso do Sul (MS), Brazil. A total of 237 samples were obtained, of which 61 (25.73%) presented growth of *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial resistance testing employed the disk diffusion agar method. The most efficient antimicrobials tested included: amoxicillin + clavulanic acid, bacitracin, cephalexin, cephalotin, enrofloxacin, gentamycin, marbofloxacin, norfloxacin and vancomycin, all with 100% efficacy, followed by azithromycin, doxycycline and oxacillin with 98.36%, neomycin with 96.72 %, Erythromycin with 93.45% and tetracycline with 90.16%. *S. aureus* isolates were resistant to several β -lactam antimicrobials, including amoxicillin (26.23%), penicillin G (23.95%) and ampicillin (22.95%). PCR analysis identified the *mecA* gene in 1.64% (1/61) of the samples. The results of the present study identify the presence of *S. aureus* as an etiological agent in bovine mastitis cases in dairy farms in MS, Brazil. The susceptibility of these isolates to several antimicrobials tested *in vitro* is a favorable outcome, facilitating control of the disease when detected, however the presence of the *mecA* gene indicates a need for caution, in order to avoid dissemination amongst dairy herds and a risk to public health.

Key words: Milk, *mecA*, MRSA, antimicrobial.

Introdução

A mastite causada por *Staphylococcus aureus* caracteriza-se como a de maior ocorrência e importância nos rebanhos mundiais (Fagundes e Oliveira, 2004; Sampimon *et al.*, 2009) estando frequentemente associada à forma subclínica (Adesiyun *et al.*, 1998; Werckenthin *et al.*, 2001; Chagas *et al.*, 2012), podendo potencialmente contaminar o leite e outros produtos lácteos, representando um risco para a saúde pública (Adesiyun *et al.*, 1998; Capurro *et al.*, 1999). As infecções por *S. aureus* também são agravadas pela capacidade do micro-organismo de adquirir resistência a diversas drogas antimicrobianas (Werckenthin *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2007; Ganesh *et al.*, 2011), sendo o principal micro-organismo envolvido nos estudos de resistência em casos de mastites em gado leiteiro (Malinowski *et al.*, 2002). A produção de β -lactamases e a modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), codificadas pelo gene *mecA* que caracteriza *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), representam alguns dos mecanismos de resistência descritos, sendo os principais em relação às drogas β -lactâmicas. Além da resistência, *S. aureus* pode produzir diversas toxinas e proteínas extracelulares que contribuem para a virulência do micro-organismo, como exemplo coagulase, termonuclease, hemolisinas e enterotoxinas (Winn, Jr. *et al.*, 2010).

Staphylococcus aureus com resistência a antimicrobianos representam um problema mundial, sendo necessário o conhecimento de sua distribuição em diferentes espaços geográficos. A associação de métodos genotípicos e fenotípicos permite um diagnóstico mais preciso dos diferentes isolados de *S. aureus*, possibilitando a implementação de melhores estratégias de controle contra o agente. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar a ocorrência *S. aureus* no leite de bovinos com mastite clínica e subclínica em propriedades de Mato Grosso do Sul, caracterizando o perfil de resistência antimicrobiana *in vitro* e detecção do gene *mecA*, por meio de testes microbiológicos e moleculares.

Material e Métodos

Amostras

Por conveniência foram obtidas 237 amostras de leite cru de vacas com mastite clínica ou subclínica, após realização de *California Mastitis Test* (CMT) conforme Schalm e Noorlander, (1957), durante os meses de julho de 2016 a março de 2017. Estas amostras foram oriundas de oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul, localizadas nos municípios de Aquidauana, Campo Grande, Jaraguari e Nova Alvorada do Sul. As amostras foram coletadas em tubos estéreis (aproximadamente 10 mL), após higienização do óstio papilar com álcool etílico 70% e desprezo dos primeiros jatos de leite. As propriedades possuíam tempo de atividade leiteira entre 5 e 10 anos, sistema de ordenha mecanizada, realizavam CMT e em casos confirmados de mastite faziam uso de antimicrobianos como amoxicilina com ácido clavulânico, bacitracina, cefalosporina, ciprofloxacina, cloxacilina e gentamicina.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas sob refrigeração e enviadas ao Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sendo processadas em menos de 24 h ou mantidas congeladas se o tempo de processamento fosse superior a 24 h.

Isolamento microbiológico e identificação de *S. aureus*

Os procedimentos de isolamento e identificação de *S. aureus* e de outros micro-organismos foram executados conforme descrito por Winn Jr, *et al.* (2010). O cultivo primário foi realizado em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C por até 72 horas. As amostras que apresentaram crescimento negativo ou até dois patógenos isolados foram consideradas para o estudo por serem provenientes de vacas com mastite confirmada. Após crescimento, realizou-se a análise morfotintorial pela coloração de Gram (Carter, 1988) e as colônias identificadas como cocos Gram-positivos, dispostos em grupos irregulares, foram submetidas ao teste de catalase, coagulase, prova da fermentação do manitol a 7,5% de NaCl. Teste de hemólise foi realizado em ágar sangue, contendo 5% de sangue desfibrinado de ovino, conforme recomendações do *National Mastitis Council–NMC* (2004). Os isolados que apresentaram resultados

positivos para todos esses testes foram classificados como *S. aureus* e foram conservados em caldo BHI, adicionados de 20% de glicerol e estocados a -20°C.

Sensibilidade a antimicrobianos

Os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados de *S. aureus* foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em ágar Mueller Hinton segundo Bauer *et al.* (1966), na qual foram testados os seguintes antimicrobianos: azitromicina (15 mcg), amoxicilina (10 mcg), amoxicilina + ácido clavulânico (30 mcg), ampicilina (10 mcg), bacitracina (10 UI), cefalotina (30 mcg), cefoxitina (30 mcg), doxicilina (30 mcg), eritromicina (15 mcg), enrofloxacina (5 mcg), gentamicina (10 mcg), marbofloxacina (5 mcg), neomicina (30 mcg), norfloxacina (10 mcg), oxacilina (1 mcg), penicilina (10 UI), tetraciclina (30 mcg) e vancomicina (30 mcg). Amostra ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

Avaliação molecular

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo descrito por Araújo *et al.* (2009) com adaptações. Uma colônia do isolado de *S. aureus* foi repicada e crescida em microtubo com caldo BHI durante 48 horas a 37°C de incubação. O microtubo foi centrifugado (10.000xg por 5 minutos) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de SDS 20% (Dodecil sulfato de sódio), homogeneizado em vortex e encubando a 65°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e novamente agitado em vortex e posterior adição de 300µL de solução de precipitação de proteínas (Acetato de potássio 5M, Ácido acético glacial 11%). Os microtubos foram centrifugados (10000 xg por 10 minutos) e o sobrenadante transferido para outro microtubo com capacidade para 1,5 mL. Foi adicionado então 1 mL de etanol 100% para precipitação do DNA. Após outra etapa de centrifugação (10000 xg por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70%. Após mais uma etapa de centrifugação (10000 xg por 2 minutos), o sedimento foi submetido a secagem em temperatura ambiente. Após este período foram adicionados 100 µL de água ultrapura (*nuclease free*) para diluição do DNA em 300 µL de tampão TE1x (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA - pH 8.0). A quantidade e integridade dos

DNAs extraídos foram avaliados por meio de espectrofotometria (*BioPhotometer Plus*; Eppendorf®) e eletroforese em gel de agarose (1%), respectivamente.

A detecção do gene *mecA* foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com Lee, (2003). As reações foram realizadas em volume final de 25 µl nas seguintes condições: H₂O (q.s.p 25 µl), tampão 10X(10 mM tris-HCL, pH 8.3, 50 µM KCl), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), Primer (10 pMol de cada), Taq DNA polimerase (1,25 U), aproximadamente 100 ng de DNA. As sequências dos primers utilizados foram *mecA*-F: 5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3' e *mecA*-R: 5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3'. A termociclagem ocorreu em 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por um minuto. Uma etapa adicional de extensão foi realizada a 72° por 5 minutos.

Os produtos de amplificação com 533 pb (pares de base) foram visualizados sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com GelRed (Biotium) de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado marcador de pares de base de 50pb (Ludwig Biotec) para mensuração dos fragmentos amplificados. Como controle positivo foi utilizado DNA de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) cedido pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e água nuclease-free como controle negativo.

Resultados e Discussão

Foram analisadas 237 amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica e verificou-se que 136 (57,38%) foram positivas ao exame microbiológico e 101 (42,62%) foram negativas. Os resultados positivos no exame clínico ou CMT, mas negativos no exame microbiológico podem indicar uso de antimicrobianos pouco tempo antes da análise ser realizada, interferindo no crescimento do patógeno, ou ainda um processo inflamatório de etiologia não bacteriana, como também sugere Freitas *et al.* (2005).

Os microrganismos isolados das 237 amostras de leite de vaca com mastite encontram-se na Tabela 1, na qual os agentes mais prevalentes foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., e *Staphylococcus* coagulase negativa. *Staphylococcus aureus* como principal patógeno isolado está de acordo com os achados de Brito *et al.* (1999) que encontraram *S. aureus* com maior prevalência nas infecções

da glândula mamária dos rebanhos na zona da Mata e Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais. Somente em uma das oito propriedades não foi isolado *S. aureus*.

Tabela 1 – Micro-organismos isolados de leite de vacas com mastite em oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul.

Micro-organismos	N.º absoluto
<i>Staphylococcus aureus</i>	61
<i>Streptococcus</i> spp.	31
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	26
<i>Micrococcus</i> spp.	22
<i>Corynebacterium</i> spp.	10
Outros	8

Neste estudo, *S. aureus* foi isolado em 25,73% (61/237) das amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica analisadas. Estes resultados são superiores aos observados por Brabes *et al.* (1999) em fazendas leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais, onde a ocorrência de *S. aureus* no leite de vacas com mastite foi de aproximadamente 10,40% e também superior aos achados de Fagundes *et al.* (2010), nas cidades de São Carlos e Ribeirão Preto, que encontraram 7,3% de ocorrência de *S. aureus* nas vacas com mastite subclínica.

Sabe-se que as frequências de mastite por *S. aureus* variam de acordo com a região, manejo dos animais, condições de higiene durante a ordenha e outros fatores (Jayarao *et al.*, 2004; Zecconi *et al.*, 2000). Além disso, altas prevalências normalmente estão associadas com as más condições de higiene do ordenhador, dos tetos e úberes das vacas (Oliveira *et al.*, 2009). Embora no presente estudo os proprietários tenham alegado conhecimento e uso de medidas preventivas antes, durante e após a ordenha, com corriqueiro diagnóstico dos casos subclínicos via CMT, ainda assim, de um modo geral, assume-se que nos rebanhos avaliados as medidas não têm se mostrado eficientes no controle da mastite bovina causada por *S. aureus*, quando comparados aos estados de Minas Gerais e São Paulo. Estes estados possuem maior tradição na produção leiteira, tecnologia, experiência e mão de obra qualificada, já a maioria das propriedades analisadas no presente estudo possui aproximadamente 10 anos de atividade.

As características fenotípicas de identificação e genotípica dos *S. aureus* isolados estão relatadas na tabela 2. *Staphylococcus aureus* são toxigênicos e causam

hemólise em ágar sangue, sendo a produção de hemolisina considerada fator de virulência por favorecer a permanência do agente na glândula mamária do animal (Lahouassa *et al.*, 2007). Por tratar-se de uma toxina citolítica, a produção da mesma está associada às alterações patológicas observadas durante o curso de infecções estafilocócicas, tais como a formação de abscessos, lesões hemorrágicas e necróticas (Dinges *et al.*, 2000; Burnside *et al.*, 2010).

Tabela 2 – Características fenotípicas e genotípicas de 61 *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite em oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul.

Características	Reações positivas
Catalase	61
Coagulase	61
Hemólise	61
Fermentação do Manitol	61
Gene <i>mecA</i>	1

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana de 61 amostras de *S. aureus* analisados encontra-se na tabela 3. A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos realizada pelo teste de disco-difusão revelou que os antimicrobianos mais eficientes (100% de eficácia) foram amoxicilina + ácido clavulânico, bacitracina, cefalotina, cefoxitina, enrofloxacina, gentamicina, marbofloxacina, norfloxacina e vancomicina, seguidos por azitromicina, doxiciclina e oxacilina com 98,36% de sensibilidade, neomicina (96,72%), eritromicina (93,45%) e tetraciclina (90,16%). Os maiores índices de resistência foram observados em alguns antimicrobianos β -lactâmicos, como amoxicilina (26,23%), ampicilina (22,95%) e penicilina G (23,95%).

Diversos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana realizados em várias regiões do Brasil demonstram um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para *S. aureus* (Brito *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2012), uma vez que o uso inadequado de antimicrobianos, como a aplicação em subdosagens e período insuficiente de tratamento dos animais, pode gerar o surgimento de isolados resistentes e comprometer a eficiência dos mesmos (Fontana *et al.*, 2010).

Tabela 3. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de 61 isolados de *Staphylococcus aureus* de amostras de leite de vacas com mastite em oito propriedades leiteiras de Mato Grosso do Sul.

Antimicrobiano	Resistente		Intermediário		Sensível	
	n°	%	n°	%	n°	%
Amoxicilina+Ac. Clavulânico	0	0	0	0	61	100
Bacitracina	0	0	0	0	61	100
Cefalotina	0	0	0	0	61	100
Cefoxitina	0	0	0	0	61	100
Enrofloxacina	0	0	0	0	61	100
Gentamicina	0	0	0	0	61	100
Marbofloxacina	0	0	0	0	61	100
Norfloxacina	0	0	0	0	61	100
Vancomicina	0	0	0	0	61	100
Azitromicina	1	1,64	0	0	60	98,36
Oxacilina	1	1,64	0	0	60	98,36
Doxicilina	1	1,64	0	0	60	98,36
Neomicina	2	3,28	0	0	59	96,72
Eritromicina	3	4,91	1	1,64	57	93,45
Tetraciclina	5	8,20	1	1,64	55	90,16
Ampicilina	14	22,95	0	0	47	77,05
Penicilina G	14	22,95	0	0	47	77,05
Amoxicilina	16	26,23	0	0	45	73,77

n° Número

% Calculada de acordo com o total de *Staphylococcus aureus* isolados

Embora a maioria dos antimicrobianos tenha apresentado elevada eficácia, os índices de resistência para amoxicilina, ampicilina e penicilina G nos rebanhos estudados são preocupantes, uma vez que estas pertencem ao grupo de antimicrobianos beta-lactâmicos e são comumente relatados por apresentarem altos índices de resistência (Tavares, 2000; Freitas *et al.*, 2005). Em casos extremos, a resistência pode atingir os 90%, como já observados por Fontana *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2012). Isso normalmente decorre do uso intensivo desses princípios ativos na rotina veterinária para o tratamento de infecções intramamárias em vacas secas ou lactantes, ou mesmo de outras patologias de causas infecciosas em rebanhos brasileiros, como já apontado por Costa *et al.* (2013). Apesar de haver uma grande variedade de mecanismos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, sabe-se que os dois principais são a

produção de enzimas β -lactamases (capazes de hidrolizar o anel β -lactâmico, tornando-os inativos) e a presença de PBP2a codificada pelo gene *mecA* (REYGAERT, 2013).

Dentre os 61 isolados de *S. aureus* analisados para detecção do gene *mecA*, apenas 1,64% (1/61) apresentou amplificação para o gene, resultado inferior ao observado por Dias *et al.* (2011), que encontraram o gene *mecA* em 11% (18/145) dos *S. aureus* de amostras de leite na microrregião de Sete Lagoas, MG. Apesar da baixa frequência, a detecção de isolados portadores do gene se torna preocupante, uma vez que se não tratados de forma adequada, podem se disseminar pelo rebanho durante o manejo de ordenha e também passar a afetar a saúde pública.

Staphylococcus aureus portadores do gene *mecA*, normalmente possuem uma resistência intrínseca à antimicrobianos β -lactâmicos, devido ao gene *mecA* codificar a PBP2a, uma PBP induzida e alterada que promove baixa afinidade de ligação com antimicrobianos β -lactâmicos (Ciftic *et al.*, 2009; Winn, Jr. *et al.*, 2010), no entanto o isolado de *S. aureus*, em que se amplificou *mecA*, não apresentou resistência a nenhum antimicrobiano. Isto pode ser explicado pelo fato do MRSA possuir um caráter heterogêneo com o nível de resistência variando de acordo com as condições de cultivo e os β -lactâmicos testados, como sugere Ciftic *et al.* (2009). Com base nessa informação, a metodologia de cultivo adotada no presente estudo possivelmente não proporcionou condições adequadas (adição de NaCl ao meio, incubação prolongada, incubação a baixas temperaturas) para a expressão gênica e apresentação fenotípica de resistência. Outra possibilidade também apontada por Moussalen *et al.* (2007) é que o gene *mecA* não é o único responsável para expressão fenotípica de resistência, pois existem outros fatores envolvidos, tais como a atuação reguladora do operon *femAB*, sendo essenciais para a expressão da resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus*. O operon *femAB* codifica proteínas envolvidas na biossíntese da parede celular da bactéria e que influencia o nível de resistência a meticilina, sendo essencial para expressão de resistência a beta-lactâmicos em isolados *mecA* positivos. Já a falta do operon *femAB* causa a hipersusceptibilidade a meticilina, apesar da presença da PBP2a em *S. aureus mecA*.

Outro fato que pode se observar no presente estudo é que os isolados resistentes a β -lactâmicos não possuíam a presença do gene *mecA*, nem mesmo o isolado fenotipicamente resistente a oxacilina. Neste caso assume-se que essa resistência se

deve a outro mecanismo, como possivelmente a produção de beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*. Esta hipótese também pode ser reforçada pela alta sensibilidade dos isolados (100%) à amoxicilina + ácido clavulânico observados no presente estudo, que segundo Williams, (1999) as drogas usadas em combinação aos β -lactâmicos, como amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam, têm capacidade de inibir a ação das β -lactamases, permitindo a ação das penicilinas e destruindo o micro-organismo.

Embora pertençam ao grupo dos β -lactâmicos, a utilização das cefalosporinas avaliadas *in vitro* demonstrou garantir uma resposta eficiente (100%) para resolução de quadros clínicos e subclínicos de mastite nos animais avaliados. Isto porque apesar das β -lactamases catalisarem a mesma reação, existe diversas dessas enzimas e estas são classificadas segundo sua estrutura primária e características funcionais e bioquímicas, e apresentam diferentes atuações. Enzimas classificadas como classe A ou grupo II, hidrolisam penicilinas e cefalosporinas; classe B ou grupo III, carbapenêmicos; classe C ou grupo I, cefalosporinas; classe D, penicilinas e cloxacilina; e grupo IV (penicilinases), penicilinas (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995). Segundo Lacey, (1984) a maioria (90%) das cepas de *Staphylococcus aureus* produz penicilinases, portanto isto explicaria a não atuação dessa enzima sob as cefalosporinas testadas, uma vez que não hidrolisa e interfere na eficiência dessas drogas.

Apesar da hipótese mais provável de resistência dos β -lactâmicos no presente estudo ser mediante produção de β -lactamase, não é descartada a possibilidade da presença de outros genes que podem induzir a expressão da resistência, como gene homólogo *mecA*_{LGA251} ou outras classes de PBPs (por exemplo, PBP3 e PBP4), como também sugere Mendonça *et al.* (2012), após observar baixa correlação entre a resistência fenotípica observada e a detecção dos complexos gênicos *mecA* e *blaZ* em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina nas regiões Sul-Fluminense e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Embora as frequências de isolados *S. aureus* resistentes tenham sido baixas quando comparados com os achados de outros autores (Fontana *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012), os resultados do presente estudo evidenciam a presença e possibilidade de disseminação desses agentes nos rebanhos leiteiros do Mato Grosso do Sul, incluindo até isolados portadores do gene *mecA*, o que se não levado em consideração pode vir a

impactar e causar um sério problema no campo e na saúde pública. Estratégias devem ser consideradas para desenvolver um protocolo de diagnóstico mais apropriado, a fim de atender as necessidades da indústria, com foco na identificação e monitoramento de MRSA. A conscientização sobre o uso sensato de antimicrobianos na produção animal, seguindo orientações existentes sobre estratégias de profilaxia e tratamento, considerando as recomendações da OMS sobre quais antimicrobianos podem ser utilizados na produção animal e quais devem ser reservados somente para uso na população humana, pode fazer parte de um programa que visa o bem estar do rebanho, segurança da saúde pública e sustentabilidade da indústria.

Conclusão

Staphylococcus aureus está presente como principal agente etiológico de mastite bovina em propriedades leiteiras em Mato Grosso do Sul, constituindo um risco a saúde pública. A suscetibilidade a diversos antimicrobianos testados *in vitro* é um fator positivo que favorece, mas não garante, o controle da doença quando detectada, no entanto, a presença de isolado portador do gene *mecA*, é um problema eminente e merece maior atenção para não se propagar entre rebanhos e população humana.

Considera-se também importante que outros genes de resistência a antimicrobianos sejam pesquisados, uma vez que o gene *mecA* não é o único responsável pela expressão fenotípica desta característica.

Referências

- ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *J. Food Prot.*, v.61, p.629-632, 1998.
- AMBLER, R.P. The structure of b-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser.*, v.27, p.321-331, 1980.
- ARAUJO, F.R.; RAMOS, C.A.N.; LUIZ, H.L.; et al. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Comunicado Técnico, n.5, p.120, 2009.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.493-496, 1966.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.53,n.5, p.531-537, 2001.

BURNSIDE, K., LMEBO, A. & REYES, M. et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *Public Library of Science*, v.5, p.1-16, 2010.

BUSH, K., JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*, 39:1211-1233, 1995.

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

CARTER, G.R.; Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária. Roca, São Paulo. 1988. 250p.

CHAGAS, L.G.S.; MELO, P.C.; BARBOSA, N.G. et al. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Candida* sp em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil. *Biosci. J.*, v.28, n 6, p.1007-1014, 2012.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E.E. et al. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 40, p.254-261, 2009.

COSTA, G.M.; BARROS, R.A.; CUSTÓDIO. et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. *Arquivo Instituto de Biologia*, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

DIAS, N.L.; SILVA, D. C. B.; OLIVEIRA, D.C.B.S. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. v.63, n.6, p.1547-1552, 2011.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M. & SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Review*, v.13, p.16-34, 2000.

FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A. et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, p. 376-380, 2010.

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

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arqs Inst. Biológico*, v.72, p. 171-177, 2005.

FONTANA, V.L.D. S.; GIANNINI, M.J.S.; LEITE, C.Q.F. et al. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene β -lactamasis in *Staphylococcus aureus*. *Vet. Zootec.* V.17, p.552-559, 2010.

GANESH, V.K.; BARBU, E.M.; DEIVANAYAGAM, C.C.S. et al. Structural and biochemical characterization of *Staphylococcus aureus* clumping factor/ligand interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, v.286, n. 29,p.25963-25972, 2011.

JAYARAO, B.M.; WOLFGANG, D.R. Bulk-tank milk analysis - A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 19, n. 1, p. 75-92, 2004.

LAHOUESSA, H.; MOUSSAY, E. & RAINARD, P. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, v.38, p.12-21, 2007.

LACEY, R.W. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. *Br. Med. Bull.*, 40: 77-83, 1984.

LEE, J,H; Methicillin (Oxacillin) – Resistent *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Veterinary Public Health*. v.69, n.11, p. 6489-6494, 2013.

MALINOWSKI, E.; KLOSSWSKA, A.; KACZMAROWSKI, M. et al. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, v.46, p.289-294,2002.

MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D.A. et al. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* v.32, p. 859-864, 2012.

MOUSSALLEM, B.C.; KURY, C.M.H.; MEDINA-ACOSTA, E. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus*

spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo *Revista Científica da FMC*, v.2, n.2, 2007.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. *National Mastitis Council*, Arlington. 2004. 46p.

OLIVEIRA, A.A.; MELO, C.B.; AZEVEDO, H.C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.1, p.226-230, 2009.

REYGAERT, W.C. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. In: Méndez-Vilas, A. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, p. 297–305, 2013.

SAMPIMON, O.; BARKEMA, H.W., BERENDS, I. et al. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *J. Dairy Res.*, v.76, p.129-136, 2009.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental and observation lading to development of California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.130,p.199-204,1957.

SILVA, E.R.; SILVA, T.R.M.; PEREIRA, A.M.G. et al. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina subclínica. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.6, n.2, p.118-123, 2012.

SILVA, W.P.S.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO BERNADETTE, D.G.M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology.*, n.31, p. 103-106, 2000.

TAVARES, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.3, p. 281-301, 2000.

WERCKENTHIN, C.M.; CARDOSO, J.; LOUISMARTEL & SCHWARZ. Antimicrobial resistance in *Staphylococci* isolated from animals with particular reference to bovine. *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *J. Vet. Res.*, v.32, n.2, p.341-362, 2001.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, v.12, p. 3-7, 1999.

WINN, JR.W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; et al. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2010, 1465p.

ZECCONI, A.; HAMANN, J.; BRONZO, V. et al. Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.480, p.287- 293, 2000.