

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Fernanda Fernandes dos Santos**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA  
À OXACILINA EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE  
MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

JUIZ DE FORA  
2014

**FERNANDA FERNANDES DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA  
À OXACILINA EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE  
MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Machado**

**Co-orientadora: Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito**

JUIZ DE FORA

2014

Santos, Fernanda Fernandes dos.

Caracterização fenotípica e molecular da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica bovina / Fernanda Fernandes dos Santos. -- 2014. 100 p. : il.

Orientador: Marco Antonio Machado

Coorientadora: Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. *Staphylococcus* spp. 2. resistência a antimicrobianos. 3. oxacilina. 4. *mecA*. 5. *SCCmec*. I. Machado, Marco Antonio, orient. II. Brito, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e, coorient. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Fernandes dos Santos

### **Caracterização fenotípica e molecular da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica bovina**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### Banca Examinadora

**Nome:** Marco Antonio Machado

**Titulação:** Dr. em Genética e Melhoramento

**Instituição:** Embrapa Gado de Leite

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Nome:** Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito

**Titulação:** PhD em Microbiologia e Imunologia Veterinárias

**Instituição:** Embrapa Gado de Leite

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Nome:** Aline Dias Paiva

**Titulação:** Dra. em Microbiologia Agrícola

**Instituição:** Universidade Federal de Juiz de Fora

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Nome:** Carla Christine Lange

**Titulação:** Dra. em Medicina Veterinária

**Instituição:** Embrapa Gado de Leite

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Oswaldo e Zenaide, ao meu irmão Leonardo, à minha avó Maria do Carmo, ao Felipe e aos meus amigos.**

Pela compreensão, carinho e apoio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho e colocar em minha vida pessoas especiais.

Aos meus pais, Oswaldo e Zenaide, pelo exemplo de vida e determinação, pelo apoio e amor.

Ao meu irmão, Leonardo, pelo apoio nos momentos de dúvidas e dificuldades.

À minha avó, Maria do Carmo por todas suas orações e torcida.

Às minhas amigas Érika, Laura, Letícia, Lia, Karina, Jerusa e Priscila por estarem sempre ao meu lado, me dando forças e me fazendo sorrir mesmo diante das dificuldades.

Ao Felipe pela compreensão, incentivo, carinho e por tornar a trajetória do mestrado ainda mais prazerosa.

À Dra. Maria Aparecida pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, por seus ensinamentos que foram fundamentais para o meu amadurecimento, pelo seu apoio e exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio pela oportunidade, pela orientação, por sua confiança e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Ana Luísa por sua colaboração com o presente trabalho.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Leite e do Laboratório de Genética Molecular, Dra. Letícia, Dra. Carla, Dr. João Batista, Dr. Alessandro Dra. Vanessa, Marcos Aurélio, Daniele e Sabine por sempre estarem dispostos a me ajudar e esclarecer minhas dúvidas, pelos conselhos, pelo apoio e incentivo, tão importantes neste período do mestrado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia do Leite e do Mestrado, Alessandra, Bianca, Caroline, Érica, Eliene, Iury, Janaina, Rafaela e Renata pela ajuda na realização dos experimentos, apoio, incentivo, pelos momentos divertidos e pela amizade.

À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de parceria.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Ao apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (Processo 578430/2008-8).

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos familiares e a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a realizar este trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

Entre os principais patógenos causadores da mastite bovina estão as bactérias do gênero *Staphylococcus*. Nas últimas décadas, a resistência à oxacilina (meticilina) neste gênero tem sido motivo de preocupação, pela possibilidade de redução da efetividade dos tratamentos da mastite, e pela possibilidade de transferência de determinantes de resistência de uma bactéria para outra. A resistência à oxacilina é mediada pela proteína PBP 2a, codificada pelo gene *mecA*, que confere resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inclusive às cefalosporinas e carbapenemas. O gene *mecA* faz parte de uma ilha genômica chamada *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), que pode incluir também outros genes de resistência. Neste trabalho, a resistência à oxacilina foi avaliada em 170 bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica, sendo 79 *S. aureus* e 91 *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (STACN). As bactérias foram provenientes de seis estados brasileiros, sendo quatro de Minas Gerais, 27 do Paraná, três de Pernambuco, onze do Rio Grande do Sul, 56 de Santa Catarina e 69 de São Paulo. O perfil de susceptibilidade a dez antimicrobianos utilizados na prática veterinária foi determinado pelo método E-TEST®. A caracterização fenotípica da resistência à oxacilina foi realizada através do teste de difusão com discos de oxacilina e cefoxetina, teste de diluição em ágar com oxacilina e E-TEST® com oxacilina. Em todas as amostras foi pesquisado, por PCR, o gene *mecA*, empregando dois pares de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam regiões diferentes do gene. As bactérias com fenótipo de resistência à oxacilina foram identificadas através do sequenciamento de um fragmento de 536 pb do rRNA 16S. Neste grupo foi pesquisado ainda o gene *mecC* e o gene *blaZ*, que codifica para a enzima  $\beta$ -lactamase. Os produtos de PCR foram sequenciados para confirmação dos resultados. Foi feita a análise molecular dos genes *mecA* por meio da tipagem do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) e das amostras *mecA* positivas através da macrorrestrrição do DNA cromossômico seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE). Com exceção da penicilina e da oxacilina, mais de 86% das estirpes de estafilococos apresentaram susceptibilidade à cefalotina, gentamicina, clindamicina, eritromicina, enrofloxacin, sulfonamida, sulfametoxazol +



trimetoprima e tetraciclina. Todas as estirpes de *S. aureus* foram susceptíveis à oxacilina, enquanto 29,7% das estirpes de STACN foram resistentes. STACN foram mais resistentes do que *S. aureus* à cefalotina e à eritromicina ( $p \leq 0,01$ ) e à gentamicina, clindamicina, e tetraciclina ( $p \leq 0,05$ ). A susceptibilidade das amostras *S. aureus* e de STACN foi semelhante para penicilina, enrofloxacina, sulfonamida e sulfametoxazol + trimetoprima. O teste de difusão em ágar com disco de cefoxetina apresentou maior sensibilidade e especificidade quanto à presença do gene *mecA*. Do total de amostras estudadas, 31 STACN foram fenotipicamente resistentes à oxacilina em pelo menos um dos testes realizados, e somente em dez foi detectado o gene *mecA*. As bactérias *mecA* positivas foram identificadas como *S. epidermidis* e classificadas em três pulsotipos (A, B e C) e quatro subtipos (A1, B1, B2 e B3). Entre as amostras com fenótipo de resistência à oxacilina 16 foram positivas para o gene *blaZ*, sendo sete *mecA* negativas e nove *mecA* positivas. Nenhuma das amostras analisadas amplificou o gene *mecC* e duas amplificaram o gene *mecA*-like de *S. sciuri*. Foram encontrados três tipos de SCC*mec*, os tipos I, IV e V. Os resultados sugerem que *S. epidermidis* pode ser um reservatório da resistência à oxacilina para outras espécies de estafilococos, tanto do homem quanto de animais. Estudos que gerem informações sobre o perfil fenotípico e molecular da resistência aos antimicrobianos em espécies de estafilococos devem ser realizados para o controle da disseminação da resistência e para que medidas terapêuticas sejam escolhidas adequadamente.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., resistência a antimicrobianos, oxacilina, *mecA*, SCC*mec*.

## ABSTRACT

Among the major pathogens of bovine mastitis are bacteria of the genus *Staphylococcus*. In recent decades, resistance to oxacillin (methicillin) in this genus has been a matter of concern for the possibility of reducing the effectiveness of mastitis treatments, and transferring of resistance determinants. The oxacillin resistance is mediated by PBP 2a protein, encoded by the *mecA* gene, which confers resistance to all  $\beta$ -lactam antibiotics, including cephalosporins and carbapenems. The *mecA* gene is part of a genomic island called staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), which may also include other resistance genes. Oxacillin resistance was studied in 170 *Staphylococcus* isolated from subclinical mastitis, 79 *S. aureus* and 91 coagulase-negative staphylococci (CNS). The bacterial strains were isolated from six Brazilian states; four from Minas Gerais, 27 from Paraná, three from Pernambuco, eleven from Rio Grande do Sul, 56 from Santa Catarina and 69 from São Paulo. The susceptibility profile to ten antimicrobial agents used in the veterinary practice was determined by E-TEST® method. Phenotypic characterization of oxacillin resistance was performed by disk diffusion test with oxacillin and cefoxitin, agar dilution test with oxacillin and E-TEST® with oxacillin. All strains were screened by PCR to detect *mecA* gene using two pairs of primers amplifying different regions of the gene. The strains with oxacillin resistance phenotype were identified by sequencing a 536 bp fragment of 16S rRNA gene. This group was also evaluated for the presence of the gene *mecC* and *blaZ*, which encodes for the enzyme  $\beta$ -lactamase. The PCR products were sequenced to confirm the results. Molecular analysis of *mecA* gene was carried out by the typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and the *mecA*-positive strains by macrorestriction of chromosomal DNA followed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). With the exception of penicillin and oxacillin, more than 86% of the strains presented susceptibility to cephalothin, gentamicin, clindamycin, erythromycin, enrofloxacin, sulfonamide, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline. All *S. aureus* strains were sensitive to oxacillin, while 29.7% of the CNS strains were resistant. The CNS were more resistant than *S. aureus* to cephalothin and erythromycin ( $p \leq 0.01$ ) and gentamicin, clindamycin, and tetracycline ( $p \leq 0.05$ ). The

agar diffusion test with cefoxitin disc showed higher sensitivity and specificity for the presence of the *mecA* gene. Considering the total strains studied, 31 CNS were phenotypically resistant to oxacillin in at least one of the tests, and only in ten CNS was detected the *mecA* gene. *mecA*-positive bacteria were identified as *Staphylococcus epidermidis* and classified into three pulsotypes (A, B and C) and four subtypes (A1, B1, B2 and B3). Among strains with oxacillin resistance phenotype, 16 were positive for *blaZ* gene, seven *mecA*-negatives and nine *mecA*-positive strains. Two of the oxacillin resistant strains amplified *mecA*-like gene of *S. sciuri* and none amplified *mecC*. Three SCC*mec* types were found, types I, IV and V. The results suggest that *S. epidermidis* can be a reservoir of oxacillin resistance to other species of staphylococci, both of human and animals. Studies that generate information about the molecular and phenotypic profile of antimicrobial resistance in staphylococcal species should be performed for controlling the spread of resistance and selection of appropriate therapeutic measures.

Keywords: *Staphylococcus* spp., antimicrobial resistance, oxacillin, *mecA*, SCC*mec*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da patogênese da mastite bovina.....	21
<b>Figura 2</b> - Representação básica da estrutura do complexo <i>mec</i> .....	33
<b>Figura 3</b> - Total de amostras de <i>Staphylococcus</i> estudadas (n=170) e o número de amostras resistentes à oxacilina em pelo menos um dos seguintes métodos: diluição em ágar com oxacilina, difusão em ágar com discos de oxacilina e cefoxetina nos estados de Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS) e Pernambuco (PE).....	53
<b>Figura 4</b> - Foto do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos por PCR multiplex para os genes <i>mecA</i> e rRNA 16S.....	54
<b>Figura 5</b> - Foto do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos por PCR para os genes <i>mecA</i> e rRNA 16S.....	57
<b>Figura 6</b> - Foto do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos por PCR multiplex para tipagem do cassete SCC <i>mec</i> .....	61
<b>Figura 7</b> - Foto do gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) representando o perfil de bandas obtidas pela clivagem do DNA cromossômico de amostras de <i>Staphylococcus epidermidis</i> portadoras do gene <i>mecA</i> com a enzima <i>SmaI</i> .....	62
<b>Figura 8</b> - Matriz de similaridade e dendrograma construído por meio do software NTSYS (Versão 2.21, Setauket, NY).....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados, tamanho dos fragmentos esperados e especificidade das reações de PCR multiplex para tipagem do cassete <i>SCCmec</i> .....	48
<b>Tabela 2</b> - Análise da concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos para 79 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite subclínica bovina em diferentes estados brasileiros.....	51
<b>Tabela 3</b> - Análise da concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos para 91 amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos isoladas de mastite subclínica bovina em diferentes estados brasileiros.....	52
<b>Tabela 4</b> - Número de amostras resistentes à oxacilina pelo método de ágar diluição, ágar difusão com disco de oxacilina e cefoxetina sobre o total de amostras analisadas em cada estado.....	53
<b>Tabela 5</b> - Resultado do sequenciamento de um fragmento de 533 pb do gene <i>mecA</i> .....	55
<b>Tabela 6</b> - Resultado do sequenciamento de um fragmento de 536 pb do rRNA 16S das 31 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina.....	56
<b>Tabela 7</b> - Resultado do sequenciamento de um fragmento de 517 pb do gene <i>blaZ</i> de 16 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina.....	58
<b>Tabela 8</b> - Resultado do sequenciamento de um fragmento do gene <i>mecA</i> -like de <i>S. sciuri</i> .....	58
<b>Tabela 9</b> - Número de amostras resistentes à oxacilina em cada teste fenotípico realizado e número de amostras positivas para o gene <i>mecA</i> .....	59
<b>Tabela 10</b> - Sensibilidade e especificidade dos testes fenotípicos para caracterização da resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos (n=91).....	59
<b>Tabela 11</b> - Resultado do antibiograma das amostras (n=10) de <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes à oxacilina e portadoras do gene <i>mecA</i> .....	60
<b>Tabela 12</b> - Número de amostras de <i>Staphylococcus epidermidis mecA</i> positivos (n=10) susceptíveis, resistentes e com perfil intermediário a dez antimicrobianos.....	60

<b>Tabela 13</b> - Resumos dos resultados encontrados para as dez amostras de <i>S. epidermidis mecA</i> positivas.....	64
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA-MRSA	<i>Community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> resistente à meticilina associado à comunidade)
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DAP	Ácido diaminopimélico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCA-MRSA	<i>Health-care associated methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> resistente à meticilina associado à assistência à saúde)
HU-UFJF	Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LA-MRSA	<i>Livestock-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> resistente à meticilina associado à pecuária)
LDH	Lactato desidrogenase
MRSA	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> resistente à meticilina)
MRSE	<i>Methicillin resistant Staphylococcus epidermidis</i> ( <i>S. epidermidis</i> resistente à meticilina)
MSCRAMM	<i>Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules</i> (Componentes da superfície microbiana que reconhecem as moléculas adesivas da matriz)
NAGase	N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMC	<i>National Mastitis Council</i>
pb	Pares de base
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i> (proteína ligadora de penicilina)

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de campo pulsado)
PIA	<i>Polysaccharide intercellular adhesin</i> (adesina intracelular polissacarídica)
PVL	Leucocidina Panton-Valentine
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
CP	<i>Capsular polysaccharides</i> (polissacarídios capsulares)
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SCC	<i>Somatic cell count</i> (Contagem de células somáticas)
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> (cassete cromossômico estafilocócico mec)
SpA	<i>Staphylococcus protein A</i> (proteína A estafilocócica)
STACN	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativos
TBE	Tampão Tris Borato - EDTA
TE	Tampão Tris - EDTA
TLC	Tampão de lise de células
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TSST-1	<i>Toxic shock syndrome toxin-1</i> (toxina 1 da síndrome do choque tóxico)
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> (método da média aritmética não ponderada)
VP	Voges-Proskauer



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1. IMPORTÂNCIA DA MASTITE BOVINA.....	20
1.2. ETIOLOGIA DA MASTITE BOVINA.....	22
1.3. O GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	23
1.3.1. Mastite bovina por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
1.3.2. Mastite bovina por <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos.....	28
1.4. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM <i>STAPHYLOCOCCUS</i> DA MASTITE.....	30
1.4.1. Resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> de mastite bovina.....	32
1.4.2. Detecção da resistência à oxacilina.....	34
1.5. DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA.....	35
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
2.1. OBJETIVO GERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS.....	38
3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE E-TEST®.....	38
3.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR COM DISCOS DE OXACILINA E DE CEFOXETINA.....	39
3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR.....	40
3.5. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	41
3.6. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES <i>mecA</i> E rRNA 16S.....	42
3.7. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS RESISTENTES À OXACILINA.....	44
3.8. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>blaZ</i> .....	44
3.9. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>mecA</i> HOMÓLOGO.....	45
3.10. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	46
3.11. SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> e rRNA 16S.....	46

3.12. TIPAGEM DO SCC <i>mec</i> por PCR MULTIPLEX.....	47
3.13. ANÁLISE DO DNA CROMOSSÔMICO POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	48
3.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
<b>4. RESULTADOS</b> .....	51
4.1. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE DEZ ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE E-TEST®.....	51
4.2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO.....	52
4.3. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>mecA</i> e rRNA 16S.....	54
4.4. SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>mecA</i> E DO GENE rRNA 16S.....	54
4.5. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>blaZ</i> e <i>mecC</i> ( <i>mecA</i> homólogo).....	57
4.6. RELAÇÃO ENTRE OS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES DE CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA.....	58
4.7. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS mecA</i> POSITIVOS A DOZE ANTIMICROBIANOS.....	59
4.8. TIPAGEM DO SCC <i>mec</i> por PCR MULTIPLEX.....	61
4.9. ANÁLISE DO DNA CROMOSSÔMICO POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	61
4.10. RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA AS DEZ AMOSTRAS DE <i>S. epidermidis</i> PORTADORAS DO GENE <i>mecA</i> .....	64
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73
<b>APÊNDICE A</b> - RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DE 170 AMOSTRAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADOS DE LEITE BOVINO (STACN: <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativo).....	85
<b>APÊNDICE B</b> - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA....	90

<b>APÊNDICE C - RESULTADOS DOS TESTES FENÓTIPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 31 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. COAGULASE-NEGATIVOS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE D - LOCAL DE PAREAMENTO DOS PRIMERS UTILIZADOS NA PESQUISA DO GENE <i>mecA</i>.....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença infecciosa mais comum entre os rebanhos leiteiros do mundo e que gera maior perda econômica para os produtores e para os laticínios. Além de afetar negativamente na produção e na qualidade do leite, a mastite é um importante problema de saúde e bem-estar animal. Vários micro-organismos já foram relatados como causa da mastite bovina, a maioria deles, bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* e do grupo dos coliformes.

Nas últimas décadas, o surgimento de estirpes de estafilococos resistentes à oxacilina (metecilina) tem sido motivo de preocupação, devido à redução da efetividade dos tratamentos da mastite e pela possibilidade de transferência de genes de resistência entre bactérias.

A resistência à oxacilina se deve, principalmente, à produção da *penicillin-binding protein* (proteína ligadora de penicilina) PBP 2a, que possui baixa afinidade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. O gene *mecA*, que codifica para PBP 2a, está localizado em um elemento genético móvel denominado SCC*mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*), composto pelo complexo de genes *mec*, que codificam o gene *mecA* e seus reguladores, e pelo complexo de genes *ccr*, que codificam as recombinases responsáveis por sua mobilidade. Além destes genes, o SCC*mec* pode transportar determinantes de resistência a outros antimicrobianos (ITO et al., 2003; FRANÇOIS et al., 2004).

A detecção da resistência a oxacilina é feita por meio de testes fenotípicos e moleculares. As técnicas moleculares são também empregadas para confirmar e delinear o padrão de transmissão durante um surto, permitindo distinguir entre a propagação clonal de uma estirpe e a transferência horizontal de genes. Por este motivo, são amplamente utilizadas no monitoramento da distribuição global de bactérias resistentes a antimicrobianos e na avaliação de medidas de controle (AARTS et al., 2001).

A análise genética de bactérias do gênero *Staphylococcus* resistentes à oxacilina indica que pode ocorrer transferência destes micro-organismos entre animais e o homem e transferência horizontal de genes de resistência. A emergência de *S. aureus* resistentes à oxacilina em rebanhos leiteiros, por exemplo,

pode estar associada ao contato com outras espécies relacionadas, como os estafilococos coagulase-negativos. Além disto, devido à possibilidade de aquisição de resistência a múltiplos antimicrobianos, *Staphylococcus* resistentes à oxacilina podem ser um problema futuro tanto para o tratamento de infecções no homem quanto para o tratamento da mastite bovina (OLIVER e MURINDA, 2012).

Considerando a importância de um diagnóstico preciso na escolha do tratamento adequado e a importância de se conhecer o perfil fenotípico e molecular de bactérias resistentes a antimicrobianos, este trabalho teve como objetivo caracterizar a resistência à oxacilina em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite subclínica bovina, oriundas de rebanhos leiteiros de seis estados brasileiros.

### 1.1. IMPORTÂNCIA DA MASTITE BOVINA

A mastite bovina é a inflamação da glândula mamária que normalmente ocorre em resposta a uma infecção. Seu grau de severidade depende da natureza do agente patogênico e de fatores relacionados ao animal, como idade, raça, saúde, estado imunológico e lactação (VIGUIER et al., 2009).

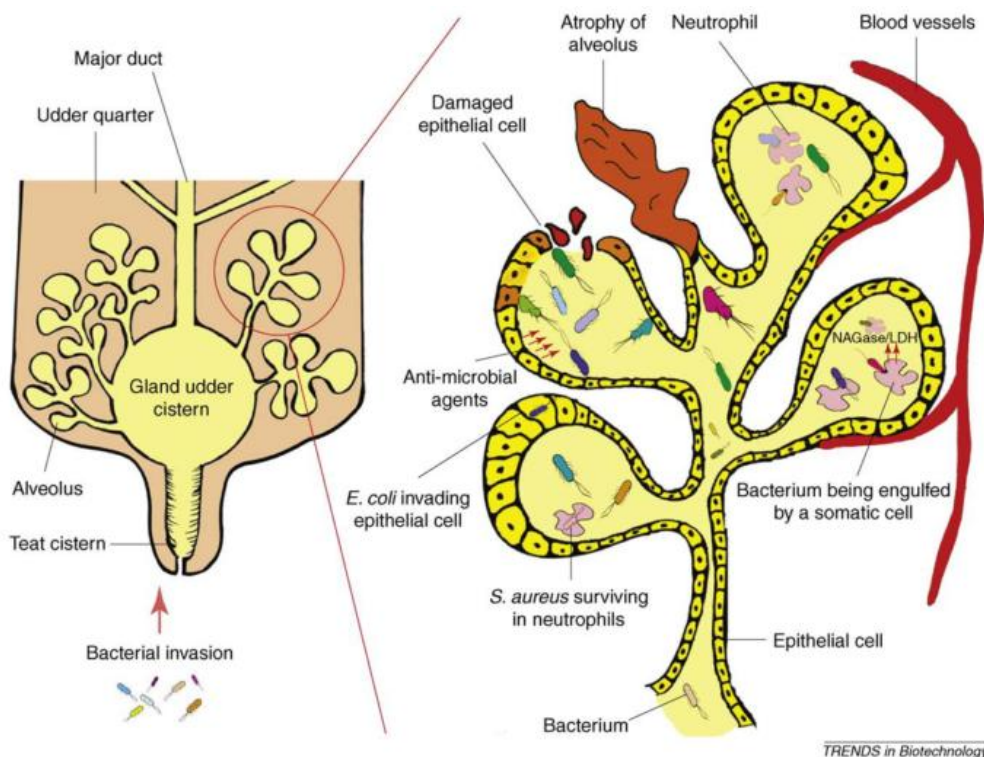
De acordo com a sua forma de manifestação, a mastite pode ser classificada como subclínica, clínica ou crônica. A forma subclínica é difícil de detectar, devido à ausência de qualquer indicação visível, já a forma clínica apresenta sinais evidentes, como o aparecimento de grumos, pus e/ou sangue no leite, e de edema, hipertermia, endurecimento e dor na glândula mamária. A mastite crônica resulta de uma infecção persistente, de longa duração, em que o animal apresenta episódios clínicos intermitentes e repentinos (RUEGG, 2012b).

Quando um micro-organismo consegue penetrar no canal do teto e evadir o mecanismo de defesa humoral e celular do úbere, ele começa a se multiplicar na glândula mamária liberando toxinas. Este mecanismo induz os leucócitos e as células epiteliais a produzirem citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) IL-8 e IL-1, o que atrai as células efetoras imunes circulantes, principalmente os neutrófilos polimorfonucleares (PMN), para o local da infecção (ALLUWAIMI, 2003; WELLNITZ, BRUCKMAIER, 2012). Os agentes oxidantes e

proteases, liberados pelos neutrófilos para destruir os micro-organismos, acabam destruindo também algumas células epiteliais, resultando na liberação de enzimas, tais como N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) e lactato desidrogenase (LDH), e na diminuição da produção de leite.

Uma vez que a tarefa dos PMN é cumprida, a maioria deles sofre apoptose e o restante é fagocitado por macrófagos. As células epiteliais da glândula mamária e os neutrófilos são secretados para o leite, elevando a contagem de células somáticas (CCS) (VIGUIER et al., 2009).

Se a infecção persistir, os alvéolos mamários ficam danificados e começam a perder a sua integridade anatômica (Figura 1) (VIGUIER et al., 2009). Quando ocorrem danos extensivos na barreira entre a corrente sanguínea e o leite, podem aparecer sintomas como inchaço e vermelhidão da glândula mamária. Aparecem também alterações no leite, como a presença de sangue, o aumento da condutividade elétrica, o aumento do pH e do teor de água e a presença de coágulos e flocos visíveis, que marcam o estágio inicial da mastite clínica (ZHAO e LACASSE, 2008).



**Figura 1** - Representação esquemática da patogênese da mastite bovina. Micro-organismos penetram no canal do teto e se multiplicam no úbere onde são atacados por neutrófilos. Células epiteliais que revestem os alvéolos são danificadas, com posterior liberação de enzimas N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) e lactato desidrogenase (LDH). As células epiteliais também secretam compostos antimicrobianos. O dano tecidual mais acentuado é observado quando as células efetoras imunes começam a combater os agentes patogênicos invasores. Fonte: VIGUIER et al., 2009.

A mastite é a doença que mais afeta os rebanhos leiteiros no mundo e que impacta negativamente na economia, principalmente devido a perdas relacionadas à redução na produção de leite, queda na qualidade, diminuição do rendimento de produtos lácteos, custos adicionais com tratamento curativo e mão de obra, descarte prematuro de animais e descarte de leite durante e após determinado período de utilização do antimicrobiano (VIGUIER et al., 2009).

Segundo Hogeveen, Huijps e Lam (2011), os gastos com a mastite clínica e subclínica na Holanda podem ser de € 17 a € 198, por vaca ao ano, sendo que no mundo os gastos com a mastite clínica em média podem variar de € 61 a € 97, por vaca ao ano. No Brasil, estima-se que o impacto econômico anual da mastite possa variar de US\$ 592,84 a US\$ 953,73 por vaca em lactação, para CCS de 250.000 e 1.000.000/mL, respectivamente (LOPES et al., 2011).

Por estas razões é importante que sejam adotadas medidas para o controle da mastite bovina acompanhadas do diagnóstico preciso dos patógenos envolvidos, da avaliação das opções de tratamento adequadas e da implementação de práticas preventivas (RUEGG, 2012a).

## 1.2. ETIOLOGIA DA MASTITE BOVINA

Uma grande variedade de micro-organismos pode causar a mastite, incluindo bactérias, algas, fungos e leveduras. Porém a maioria das infecções é causada por bactérias, principalmente dos gêneros *Streptococcus* (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*) e *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e outras espécies coagulase-negativas), e do grupo dos coliformes (*Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.). Em determinadas regiões outros micro-organismos também podem ser responsáveis por causar infecções, como por exemplo, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (HOGEVEEN et al., 2011).

De acordo com suas características, os patógenos causadores da mastite podem ser classificados em agentes ambientais e agentes contagiosos. Os agentes ambientais, como por exemplo, *Escherichia coli* e outras bactérias do grupo dos coliformes, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus equinus* e outros *Streptococcus*, que encontram-se no ambiente da fazenda, principalmente

onde há acúmulo de dejetos, urina, barro e nas camas orgânicas. Já os agentes contagiosos, como *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* coagulase-negativos, habitam preferencialmente o interior da glândula mamária e são geralmente transmitidos de um animal para outro durante a ordenha (SANTOS e FONSECA, 2007; BRITO, 2009).

Os patógenos contagiosos podem ser divididos em dois grupos, primários e secundários. Os patógenos primários incluem *S. agalactiae* e outras espécies de *Streptococcus*, *S. aureus* e *Mycoplasma* spp. As infecções causadas por estes micro-organismos resultam em grandes variações na composição do leite e na Contagem de Células Somáticas (CCS). Os patógenos secundários incluem *C. bovis* e *Staphylococcus* coagulase-negativos, e são responsáveis por causar um processo inflamatório moderado, com CCS excedendo de duas a três vezes em relação às glândulas mamárias não infectadas (HARMON, 1994; SOUZA et al., 2009).

### 1.3. O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

O gênero *Staphylococcus* representa um grupo de bactérias classificadas como cocos Gram positivos, que se apresentam em agrupamentos semelhantes a cachos de uva, podendo ser encontrados também como células únicas, pares ou cadeias curtas. As bactérias desse grupo apresentam características comuns, como a forma esférica, a ausência de endósporo e a produção da enzima catalase. Os estafilococos são imóveis, anaeróbios facultativos, capazes de crescer em alta concentração de sal e em temperaturas que variam de 18°C a 40°C e a maioria mede de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro (MURRAY, 2003).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem 90% da sua parede celular constituída por peptidoglicano, uma característica comum das bactérias Gram positivas. O peptidoglicano é um polissacarídeo composto de ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglicosamina, além de alguns aminoácidos, como L-alanina, D-alanina, ácido D-glutâmico e L-lisina ou ácido diaminopimélico (DAP). Esses componentes são ligados, originando uma estrutura repetitiva em camadas, o tetrapeptidoglicano. As enzimas que catalisam estas ligações são alvos da penicilina



e de outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e por isso, chamadas de proteínas que se ligam à penicilina (PBP - *penicillin binding protein*) (MADIGAN et al., 2010).

Algumas espécies de estafilococos possuem uma cápsula de polissacarídeo, que envolve a camada mais externa da parede celular, dificultando a fagocitose por leucócitos polimorfonucleares (MADIGAN et al., 2010). Além disso, a maioria dos estafilococos produz quantidades variáveis de um filme solúvel na água, frouxamente ligado à parede celular, denominado camada limosa, que consiste em monossacarídeos, proteína e pequenos peptídeos (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). Esta substância extracelular liga a bactéria aos tecidos e corpos estranhos, como cateteres e válvulas prostéticas, e exerce um papel importante na formação de biofilmes (espessa camada de células) (MURRAY et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2006).

O gênero consiste atualmente de 47 espécies e 24 subespécies, muitas das quais são encontradas em nichos específicos no homem, como por exemplo, *S. aureus* que coloniza as narinas anteriores, *S. capitis* que são encontrados onde estão as glândulas sebáceas, e *S. haemolyticus* e *S. hominis* que são encontrados em áreas onde estão presentes glândulas apócrinas (EUZÉBY, 2012; MURRAY, 2009).

As colônias de *S. aureus* são amarelo-douradas, como resultado da produção de pigmentos carotenóides durante o seu crescimento. É, também, a única espécie produtora de coagulase que infecta o homem. Nos animais, outras espécies de importância clínica podem produzir esta enzima. As demais espécies de estafilococos que não produzem coagulase são referidas coletivamente como estafilococos coagulase-negativos (BAIRD-PARKER, 1965; MURRAY, 2003).

Os estafilococos são importantes patógenos para os seres humanos e para os animais. Entre as doenças estafilocócicas dos animais, a mastite está entre as de maior importância (QUINN et al., 2011). No homem, causam doenças sistêmicas, infecções de pele, de tecidos moles, de ossos, do trato urinário, além de infecções oportunistas. Entre as espécies mais comumente associadas às doenças humanas estão *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus*.

As espécies do grupo dos estafilococos coagulase-negativos (STACN) eram raramente consideradas como patogênicas, porém com o desenvolvimento de melhores métodos para a sua identificação e caracterização, têm sido associadas a diversos processos infecciosos (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009; PYÖRÄLÄ;

TAPONEN, 2009). Além disto, há um aumento da resistência a antimicrobianos entre os STACN, que se deve em parte à utilização cada vez maior de antimicrobianos de amplo espectro, que selecionam estirpes multirresistentes (HEIKENS et al., 2005; CASEY et al., 2007).

### 1.3.1. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*

O isolamento de patógenos na mastite bovina tem variado ao longo dos anos, e pode variar também entre diferentes países, regiões e rebanhos leiteiros, principalmente devido a diferenças de gestão e manejo adotados. Entretanto, o patógeno de maior importância e o mais comumente encontrado na maioria dos países é *S. aureus* (HOGVEEN et al., 2011; KEEFE, 2012).

Um estudo realizado por Brito et al. (1999) com 1.609 vacas em lactação, originárias de 48 rebanhos localizados na Zona da Mata e Campo das Vertentes do estado de Minas Gerais, mostrou que *S. aureus* foi o patógeno mais frequentemente isolado, estando presente em 98% dos rebanhos estudados. Este padrão de infecção foi semelhante ao encontrado em outro estudo realizado no Brasil, no período de 1986 a 1988, onde foram isolados 802 micro-organismos provenientes de 702 amostras de leite bovino, sendo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* os mais frequentemente encontrados (35,53% e 23,19%, respectivamente) (LANGONI et al., 1991).

Estudos realizados com amostras da Noruega, Estados Unidos, Chile e Reino Unido mostraram que apesar da heterogeneidade genética entre as populações de *S. aureus* isoladas de rebanhos leiteiros, um pequeno número de genótipos estreitamente relacionados foi responsável por uma grande proporção de casos de mastite, sugerindo que um único grupo clonal alcançou uma distribuição generalizada e foi responsável pela maioria das infecções (MORK et al., 2005; SMITH et al., 2005). Entretanto, no Brasil, Ferreira e colaboradores (2006) mostraram que em determinados rebanhos e em determinados períodos, pode existir considerável heterogeneidade genética em populações de *S. aureus*, dificultando assim o controle e o tratamento da mastite.

*S. aureus* produzem vários fatores de virulência que contribuem para aumentar a sua capacidade de infecção. Estes fatores estão associados à superfície celular ou são secretados no meio extracelular. Entre eles estão os fatores antifagocitários, os de adesão à célula do epitélio mamário, de sobrevivência dentro de macrófagos e de células epiteliais da glândula mamária e de produção de exotoxinas (DEGO, VAN DIJK e NEDERBRAGT, 2002). Os fatores de virulência podem variar entre as diferentes estirpes, fazendo com que uma estirpe seja mais contagiosa e/ou mais resistente ao tratamento do que outra (HAVERI et al., 2007). Zschöck et al. (2005) relataram que estirpes de *S. aureus* que possuíam genes que codificam para enterotoxinas, como *sed*, *sej*, em combinação com o gene *blaZ* de resistência à penicilina, foram mais relacionadas com casos de mastite crônica.

A característica da infecção por *S. aureus* na mastite bovina é a formação de abscessos em tecidos profundos da glândula mamária, que funcionam como um reservatório das bactérias. O tipo de lesão desenvolvida e a localização interferem com a chegada dos antimicrobianos utilizados para tratamento, levando a uma infecção de longa duração, com tendência à cronificação e baixa taxa de cura (SANTOS e FONSECA, 2007).

Sabe-se que a infecção da glândula mamária por *S. aureus* está relacionada à adesão e invasão de células do epitélio mamário e de outras células endoteliais, além de fibroblastos. Porém a patogênese da mastite bovina causada por *S. aureus* e o envolvimento de fatores de virulência na mastite bovina ainda não foram completamente esclarecidos. A compreensão destes mecanismos pode contribuir para o estabelecimento de novas estratégias de controle (IKAWATY et al., 2010).

Durante a mastite, o principal mecanismo de defesa do hospedeiro é a fagocitose por neutrófilos polimorfonucleares após a opsonização por anticorpos, com ou sem ativação do sistema de complemento. Entretanto, os mecanismos de defesas do hospedeiro podem não impedir a infecção intramamária, possivelmente pela produção dos fatores de virulência (BURVENICH et al., 1994).

A maioria das estirpes de *S. aureus* apresenta uma proteína específica, denominada proteína A estafilocócica (*Staphylococcus protein A - Sp A*), que possui a capacidade de se ligar à porção Fc de algumas subclasses de imunoglobulinas G (IgG), tornando mais difícil a sua destruição por células fagocitárias do sistema imune (SILVA et al., 2007).

A cápsula polissacarídica tem a função principal de proteger a bactéria contra a fagocitose. De acordo com a variabilidade antigênica dos polissacarídios capsulares (*capsular polysaccharides* - CP), é possível classificá-los em sorotipos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Onze sorotipos já foram descritos, entre os mais comumente encontrados estão o CP5 e CP8. Kampen, Tollersrud e Lund (2005) mostraram *in vitro*, que estirpes de *S. aureus* que expressavam os tipos 5 e 8 de polissacarídeos capsulares apresentaram resistência à fagocitose por neutrófilos bovinos. Além da cápsula, a maioria dos *S. aureus* produz a camada limosa que liga a célula bacteriana à superfície de materiais (MURRAY et al., 2009).

Os ácidos teicóicos e as proteínas MSCRAMM (*microbial surface components recognising adhesive matrix molecules*) são importantes para a adesão destas bactérias ao epitélio da glândula mamária. As proteínas MSCRAMM estão associadas à parede celular e funcionam como adesinas, promovendo a colonização pelos *S. aureus* através da ligação com a fibronectina, o colágeno e o fibrinogênio do tecido do hospedeiro. As estirpes de *S. aureus* são capazes de expressar cerca de 20 tipos diferentes de proteínas MSCRAMM, que ficam ancoradas ao peptidoglicano (FEBLER et al., 2010; WALSH et al., 2008).

A capacidade de formar biofilme é reconhecida como um importante fator de virulência em bactérias do gênero *Staphylococcus*. O processo de formação do biofilme pode ser dividido em duas etapas, a primeira está relacionada com a aderência à superfície mediada por um antígeno de superfície, e a segunda, com a multiplicação em camadas das células bacterianas, a qual está associada com a expressão de uma molécula polissacarídica denominada PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*), codificada pelo operon *ica* (VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

A proteína coagulase, codificada pelo gene *coa*, demonstrou ser um fator de virulência na infecção intramamária por participar da conversão do fibrinogênio em fibrina insolúvel, fazendo com que os estafilococos se agrupem e uma camada de fibrina se forme ao redor, protegendo o micro-organismo da fagocitose e da ação de antimicrobianos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, COELHO et al., 2009).

Entre as toxinas produzidas por *S. aureus* estão as toxinas citolíticas (alfa, beta, delta, gama), leucocidina Pantón-Valentine - PVL, duas toxinas esfoliativas (A e B), oito enterotoxinas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico, TSST-1. A alfa toxina se liga à membrana plasmática de células epiteliais induzindo a formação de

poros e posterior morte celular. A leucocidina é capaz de danificar a membrana dos neutrófilos polimorfonucleares e dos macrófagos bovinos. As enterotoxinas, conhecidas como superantígenos, são capazes de desencadear uma liberação maciça de citocinas tanto pelos macrófagos quanto pelas células T, sendo, normalmente, a enterotoxina estafilocócica C (EEC) a principal toxina produzida, concomitantemente com a TSST-1 em casos clínicos mais severos de mastite por *S. aureus* (BEZEK e HULL, 1995; MURRAY et al., 2009; IKAWATY et al., 2010).

A toxina beta, ou esfingomielinase C, é produzida por 75 a 100% das estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Esta toxina é responsável pela hidrólise da esfingomielina presente na membrana plasmática, resultando no aumento da permeabilidade e na perda progressiva da carga negativa da superfície celular através do efluxo de  $K^+$  e entrada de  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e  $Ca^{2+}$ . A hidrólise da esfingomielina torna a célula mais susceptível à ação da alfa toxina. Estes fatores podem influenciar na adesão e invasão das células (DEGO, DIJK e NEDERBRAGT, 2002).

No estudo realizado por Coelho et al. (2009) com amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina do estado do Rio de Janeiro, todas as estirpes hemolíticas apresentaram a toxina beta. A amplificação do gene *coa* apresentou quatro tipos polimórficos diferentes com fragmentos de aproximadamente 400 pb, 600 pb, 700 pb e 900 pb. O gene *spaA*, que codifica a região de ligação da proteína A à IgG, apresentou bandas de 700 bp e 900 bp. Estudos como este são importantes para caracterização dos fatores de virulência envolvidos na patogênese da mastite bovina.

### 1.3.2. Mastite bovina por *Staphylococcus* coagulase-negativos

Atualmente *Staphylococcus* coagulase-negativos (STACN) são um dos principais grupos de micro-organismos isolados nas amostras de leite bovino, responsáveis por causar infecções intramamárias subclínicas (MAKOVEC e RUEGG, 2003; SAMPIMON et al., 2009). O conhecimento sobre a importância desses micro-organismos resulta na necessidade de diagnósticos diferenciais e métodos de controle diferentes, dependendo da espécie. A diferenciação de espécies através de testes bioquímicos é demorada e muitas vezes difícil de

interpretar. Testes moleculares foram descritos para identificar as espécies de STACN, porém eles ainda são dispendiosos para aplicação no diagnóstico de rotina (BES et al., 2000; SANTOS et al. 2008).

Os STACN podem ser oportunistas provenientes do meio ambiente, porém estirpes de *S. chromogenes* e *S. epidermidis* podem permanecer no úbere, fazendo com que o hospedeiro se torne um reservatório de micro-organismos para outros animais do rebanho (MORK et al., 2012).

Um estudo realizado no Brasil com 237 vacas mestiças para pesquisa da prevalência e da etiologia da mastite bovina na bacia leiteira do município de Rondon do Pará mostrou que este grupo foi o mais frequentemente isolado tanto em animais com mastite clínica, quanto em animais com mastite subclínica (OLIVEIRA et al., 2011). Outro estudo realizado em vacas com mastite subclínica, em 15 propriedades rurais localizadas na Região Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco, relatou que dos 291 isolados, 170 (58,4%) foram classificados como *Staphylococcus* coagulase-negativos (MEDEIROS et al. 2009).

No estudo realizado por Gillespie et al. (2009) nos Estados Unidos, foram identificadas as espécies de 383 STACN isolados de amostras de leite. Foram encontradas as espécies *S. chromogenes* (48%), *S. hyicus*, (26%), *S. epidermidis* (10%), *S. simulans* (7%), *S. warneri* (2%), *S. hominis* (2%), *S. saprophyticus* (1%), *S. xylosus* (1%), *S. haemolyticus* (< 1%), *S. sciuri* (< 1%), e *S. intermedius* (< 1%).

Atualmente considera-se que os STACN podem causar infecções persistentes, resultando em aumento da CCS e diminuição da produção do leite. *S. simulans* e *S. chromogenes* são provavelmente as espécies predominantes na mastite bovina. O conhecimento sobre as espécies de STACN envolvidas na mastite é ainda muito limitado, porém de grande importância para diagnósticos mais confiáveis e para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção da mastite por estes micro-organismos (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

#### 1.4. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *STAPHYLOCOCCUS* DA MASTITE

A introdução da penicilina na prática clínica, em 1940, melhorou o prognóstico dos pacientes que desenvolviam infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus*. Nesta década a grande maioria de *S. aureus* era sensível a este antimicrobiano. No entanto, cerca de dois anos depois, foram relatadas estirpes de *S. aureus* resistentes, e, em 2009, menos de 10% das estirpes eram susceptíveis à penicilina (BOYLE-VAVRA; DAUM, 1997; MURRAY et al., 2009).

A ligação das subunidades de *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico, para formar o peptidoglicano da parede celular é catalisada por enzimas específicas, tais como transpeptidases, transglicosilases e carboxipeptidase, que pertencem à família das proteases serinas, também conhecidas como proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Quando as bactérias em crescimento são expostas às penicilinas, este antibiótico se liga às PBPs específicas na parede celular bacteriana, inibindo a montagem das cadeias de peptidoglicano. Este processo ativa autolisinas que degradam a parede celular, resultando na morte da bactéria (MURRAY et al., 2009). Em geral, *S. aureus* tem cinco PBPs com tamanhos moleculares de 87 kDa (PBP 1), 80 kDa (PBP 2), 75 kDa (PBP 3), 70 kDa (PBP3'), e 41 kDa (PBP 4). Destas, as PBPs 1, 2, e 3 são essenciais e possuem afinidades elevadas pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (GEORGOPAPADAKOU, 1993).

O primeiro mecanismo relatado de resistência à penicilina foi a produção da enzima penicilinase, uma  $\beta$ -lactamase específica, que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico deste antimicrobiano. O gene *bla<sub>Z</sub>*, que codifica para esta enzima, é carregado em plasmídeos transmissíveis, o que facilita a disseminação da resistência entre os estafilococos (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001).

Em 1959, através de modificações na cadeia do ácido 6-aminopenicilâmico, precursor da penicilina, foram desenvolvidas as penicilinas semi-sintéticas, resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases (MURRAY et al., 2009). A oxacilina e a meticilina foram os primeiros antimicrobianos dessa classe a serem introduzidos para o uso clínico, porém, em 1961, foram relatadas estirpes de *S. aureus* resistentes, denominadas MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina). Estas estirpes eram resistentes a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (FRANÇOIS et al., 2004).

Estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) se disseminaram rapidamente em pacientes hospitalizados, alterando a terapia disponível para a prevenção e o tratamento das infecções. No início, as infecções por MRSA eram restritas ao ambiente hospitalar (HCA-MRSA: *health-care associated methicillin resistant S. aureus*). Entretanto, na década de 1990, foram relatadas infecções por estes micro-organismos adquiridas na comunidade (CA-MRSA: *community-associated methicillin resistant S. aureus*). As estirpes CA-MRSA não eram relacionadas geneticamente com as estirpes isoladas em hospitais, e eram também geneticamente diferentes em cada país (RICE, 2006).

Desde 2005 a estirpe MRSA ST398 foi reconhecida como colonizadora de suínos e de profissionais de fazenda que entravam em contato com esses animais. Esta estirpe também foi encontrada em outras espécies de animais como vacas, cavalos e aves, sendo designada *livestock-associated* (LA)-MRSA. Foi relatado que MRSA ST398 pode causar infecções em seres humanos, que entram em contato com os animais portadores dessa bactéria, e em indivíduos hospitalizados, apesar de até o momento a ocorrência ser rara (PANTOSTI, 2012).

Diversos relatos mostram que a maioria dos patógenos da mastite bovina é susceptível aos antibióticos utilizados para tratamento. Alguns estudos indicaram maior resistência dos *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos à penicilina e à ampicilina (BENGTSSON et al., 2009; BOTREL et al., 2010; KALMUS et al., 2011; PERSSON et al., 2011). O aparecimento de MRSA em gado leiteiro pode ser associado, por exemplo, ao contato com suínos ou seres humanos portadores de MRSA, ou de outra espécie bacteriana portadora da resistência a meticilina (oxacilina). Os STACN têm o potencial de transmitirem os determinantes de resistência antimicrobiana a *S. aureus*. Segundo Oliver e Murinda (2012), MRSA parece ser um patógeno emergente na mastite bovina, apesar da prevalência destes micro-organismos, em alguns estudos, ser aparentemente baixa, podendo variar de 1,1% a 17,3%.

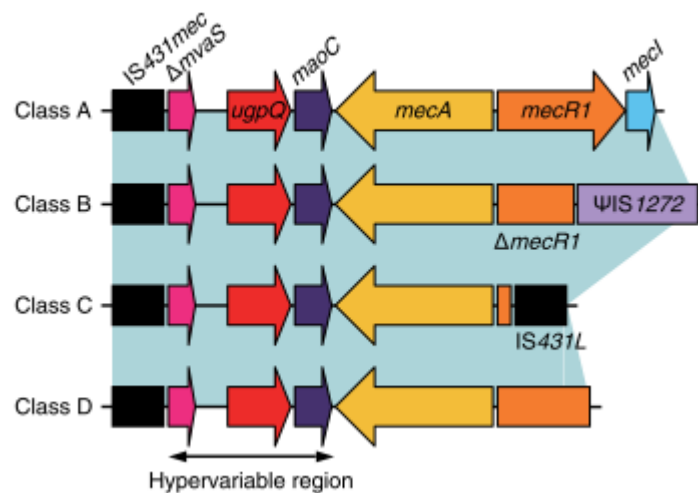


#### 1.4.1. Resistência à oxacilina em *Staphylococcus* de mastite bovina

A resistência à metilina (oxacilina) em *Staphylococcus* spp. é causada principalmente pela produção da proteína ligadora de penicilina (*penicillin-binding protein*) PBP-2a ou PBP2' de baixa afinidade para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. PBP-2a é capaz de catalisar as reações de transpeptidação da parede celular bacteriana mesmo na presença desta classe de antimicrobianos. A proteína PBP-2a é codificada pelo gene *mecA*, e confere resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (GEORGOPAPADAKOU, 1993; FRANÇOIS et al., 2004).

O gene *mecA* está localizado em uma ilha genômica de resistência, denominada cassete cromossômico do estafilococo *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec* - SCC*mec*). O SCC*mec* é um elemento genético móvel, que inclui o gene *mecA*, seus reguladores, *mecI* e *mecR1*, e o complexo *ccr*, que codifica as recombinases responsáveis pela mobilidade do cassete. As partes restantes do SCC*mec* são chamadas regiões J (regiões J1, J2, e J3), as quais constituem componentes não essenciais do cassete, embora em alguns casos estas regiões possam transportar genes de resistência a outros antimicrobianos (ITO et al., 2003; GARCIA-ÁLVAREZ, 2011; ITO et al., 2004; LI et al., 2011).

A organização estrutural do SCC*mec* pode ser resumida como J1-*ccr*-J2-*mec*-J3. Variações nas regiões J dentro da mesma combinação *mec-ccr* são utilizadas para definir os subtipos do SCC*mec*. Onze tipos de SCC*mec* (tipos I-XI) foram definidos pela utilização da combinação da classe do complexo *mec* e *ccr* (MILHEIRIÇO et al., 2007). A tipagem do SCC*mec* através da técnica de PCR é considerada referência para a definição de clones de estafilococos resistentes à oxacilina (VINDEL et al., 2009). Na Figura 2 são apresentados exemplos de quatro classes do complexo *mec*.



**Figura 2** - Representação básica da estrutura do complexo *mec*. A classe de um complexo de genes *mec* é composta de *mecR1* e *mecl*, que codifica o sinal do indutor e do repressor para o gene *mecA*, respectivamente. As classes B e C possuem integração de um elemento de inserção (IS), IS1272 e IS431L no gene *mecR1*, respectivamente, o que resulta na eliminação parcial do gene *mecR1* e eliminação completa do gene *mecl*. A classe D não tem nenhum elemento de inserção, mas uma parte do *mecR1* e o gene *mecl* são excluídos. Todos os complexos *mec* contêm o elemento de inserção IS431*mec*. Fonte: TSUBAKISHITA et al. (2010).

Algumas espécies de estafilococos possuem genes homólogos ao *mecA*. Porém as estirpes portadoras desse gene homólogo são geralmente sensíveis à oxacilina. Como exemplos, *S. sciuri* possui o gene denominado *mecA-like* com 80% de similaridade com o gene *mecA* de *S. aureus*, enquanto o gene *mecA* de *S. vitulinus* isolado de cavalos apresenta 91% de similaridade com *mecA* de *S. aureus* (SCHNELLMANN et al., 2006). Tsubakishita et al. (2010) sugeriram que o gene *mecA* pode ter se originado de *S. fleurettii*, pertencente ao grupo de *S. sciuri*. Esta espécie contém o loco cromossômico correspondente ao circundante do gene *mecA*, com uma sequência idêntica à do SCC*mec*. Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que os estafilococos de animais podem ser um provável reservatório do gene *mecA* (PANTOSTI, 2012).

Recentemente Garcia-Álvarez e colaboradores (2011) descreveram um gene homólogo ao *mecA*, denominado *mecA<sub>LG251</sub>*, em *S. aureus* isolado de leite a granel na Inglaterra. Esta estirpe era fenotipicamente resistente à oxacilina, mas não apresentava o gene *mecA*.

Outro gene cromossômico, *femA* (*factor essential for methicillin resistance*), está envolvido na resistência à oxacilina em *S. aureus*. Este gene codifica uma proteína de 48-kDa, que não afeta a expressão de PBP-2a, mas afeta o teor de glicina do peptidoglicano, o volume da parede celular e, conseqüentemente, a

susceptibilidade a  $\beta$ -lactâmicos. Os STACN possuem um padrão semelhante de resistência à oxacilina em relação à produção de PBP-2a, porém não possuem o gene *femA* (GEORGOPAPADAKOU, 1993).

Além do gene *mecA*, outros mecanismos, como a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases, a produção de uma nova meticilinase, alteração de subtipos de PBP e condições de crescimento, podem estar envolvidos na expressão da resistência à meticilina (TURUTOGLU et al., 2009).

#### 1.4.2. Detecção da resistência à oxacilina

A detecção da resistência à oxacilina é realizada através de métodos fenotípicos e moleculares. Entre os métodos fenotípicos estão os testes de difusão em ágar empregando discos de oxacilina e/ou cefoxetina (disco difusão); o método de ágar diluição, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina; e o teste de triagem em ágar suplementado com 4% de NaCl e 6  $\mu$ g de oxacilina por mililitro (KAISER et al., 2010).

Os métodos moleculares, como de aglutinação em látex, para detecção da proteína PBP 2a, e da reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do gene *mecA* têm sido considerados mais precisos para prever a resistência à oxacilina (CLSI, 2008).

Na rotina dos laboratórios, os testes de difusão em ágar com discos de oxacilina e de cefoxetina são os mais comumente utilizados. Entre as penicilinas resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases, a oxacilina é a mais estável e por isso é recomendada para ser utilizada em testes *in vitro* (CLSI, 2008). Para *S. aureus* o resultado do teste de disco difusão empregando cefoxetina é comparável ao resultado obtido com disco de oxacilina, sendo este último de mais fácil leitura. Para os STACN, o teste de disco difusão com cefoxetina mostrou sensibilidade semelhante à oxacilina, porém foi mais específico (ANAND et al., 2009; BSAC, 2013).

Os testes para determinação da CIM de oxacilina incluem métodos de diluição em ágar e em caldo (macrodiluição e microdiluição) e de gradiente de difusão em ágar (E-TEST®). Estes métodos possibilitam uma avaliação quantitativa da

resistência à oxacilina, porém podem não apresentar maior especificidade quanto à detecção de estirpes portadoras do gene *mecA*. No entanto, devido à existência de outros mecanismos de resistência à oxacilina, a determinação da CIM pode ser utilizada em conjunto com outros métodos em amostras cujo padrão de susceptibilidade seja de difícil diagnóstico (MIMICA e MENDES, 2007).

Existem também métodos automatizados, como o Vitek e o MicroScan, e alguns que utilizam meios cromogênicos, como MRSASelect (Bio-Rad), MRSA ID (BioMerieux), ORSAB (Oxoid), CHROMagar MRSA (MIMICA e MENDES, 2007).

Algumas bactérias em uma população de estafilococos resistentes à oxacilina podem não expressar sua resistência em testes de susceptibilidade tradicionais. Esse fenômeno é conhecido como resistência heterogênea, ou seja, células que expressam um nível de resistência elevado representam uma pequena fração da população bacteriana, como por exemplo, 1 em 100.000 células. A resistência heterogênea, dificulta o diagnóstico e por esta razão, o "padrão ouro" para identificar uma estirpe resistente é a detecção do gene *mecA* ou da proteína que ele codifica (PBP 2a) (GEORGOPAPADAKOU, 1993; CLSI, 2008).

Alguns estudos mostraram que certas bactérias são consideradas susceptíveis à oxacilina por métodos fenotípicos e são portadoras do gene *mecA* (FERREIRA et al., 2003; MURAKAMI et al., 1991; MIMICA; MENDES, 2007; TURUTOGLU et al., 2009). Esses resultados podem ser associados com a resistência heterogênea das estirpes à oxacilina ou com a ausência de expressão do gene *mecA* (FERREIRA et al., 2003).

Algumas estirpes podem apresentar resistência fenotípica à oxacilina e não serem portadoras do gene *mecA*. Tais resultados podem ser explicados pela hiperprodução de  $\beta$ -lactamases. Foi relatado também, que o gene *mecA* pode ser perdido devido ao método de armazenamento a -20 °C, -80 °C e liofilização (FERREIRA et al., 2003; MURAKAMI et al., 1991; TURUTOGLU et al., 2009).

## 1.5. DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA

Nas últimas décadas, a resistência à oxacilina em bactérias do gênero *Staphylococcus* tem sido motivo de preocupação pela possibilidade de redução da

efetividade nos tratamentos clínicos e preventivos no homem e nos animais, sendo, portanto, considerada um problema de saúde pública (OLIVER et al., 2011; SOARES et al., 2007; WOOLDRIDGE, 2012).

Os testes fenotípicos para detecção de estirpes de estafilococos resistentes à oxacilina e a análise da presença do gene *mecA* servem como indicativo e auxiliam na escolha da melhor terapia antimicrobiana (FERREIRA et al., 2003).

A disseminação da resistência à oxacilina não é necessariamente resultado apenas da seleção de bactérias resistentes pelo uso contínuo do antimicrobiano. Pode ser causada também pela aquisição de elementos portadores de genes de resistência (AARTS et al., 2001).

As técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a eletroforese em campo pulsado (PFGE), têm sido utilizadas para a investigação de surtos, vigilância epidemiológica de estirpes resistentes a antimicrobianos, identificação de padrões de infecções e para rastrear a fonte de infecção. Estas técnicas são importantes tanto para caracterizar os genes de resistência a antimicrobianos quanto para analisar o genoma da bactéria, permitindo assim uma discriminação entre propagação horizontal dos genes de resistência e a disseminação clonal de uma determinada estirpe.

Segundo Oliver e Murinda (2012) pode ocorrer a transferência genética horizontal entre patógenos humanos e de animais, sendo portanto, necessário estabelecer sistemas de monitoramento e de avaliação da disseminação. O isolamento de MRSA em gado leiteiro, por exemplo, pode estar associado também, ao contato com outros animais que abrigam bactérias *mecA* positivas, como suínos e humanos, ou com o contato com outras espécies bacterianas, como os estafilococos coagulase-negativos, que podem transferir determinantes de resistência para outras espécies de estafilococos.

O surgimento e a disseminação da resistência à oxacilina devem ser compreendidos, para que medidas apropriadas de prevenção e de controle sejam tomadas (WOOLDRIDGE, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as características fenotípicas e moleculares da resistência à oxacilina (metecilina) em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica bovina, nos estados de Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos utilizados na prática veterinária pelo método de E-TEST® para amostras de *Staphylococcus*.
- Verificar a susceptibilidade de *Staphylococcus* à oxacilina pelo método de diluição em ágar e difusão em ágar.
- Avaliar a distribuição do gene *mecA* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e confirmar a identidade do produto obtido pelo sequenciamento.
- Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras *mecA* positivas por meio do método de difusão em ágar.
- Avaliar a presença dos genes *blaZ* e *mecC* nas amostras de *Staphylococcus* com o fenótipo de resistência à oxacilina, confirmar a identidade dos produtos obtidos por sequenciamento e identificar as espécies por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S.
- Caracterizar as estirpes da mesma espécie portadoras do gene *mecA* através da análise de macrorrestrição do DNA cromossômico seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE).
- Realizar a tipagem molecular do cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*) das amostras de *Staphylococcus* portadores do gene *mecA*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS

Foram estudadas 170 bactérias do gênero *Staphylococcus*, isoladas de mastite subclínica bovina, sendo 79 classificadas como *S. aureus* e 91 como *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos. As bactérias foram provenientes de seis estados brasileiros, sendo quatro de Minas Gerais, 27 do Paraná, três de Pernambuco, onze do Rio Grande do Sul, 56 de Santa Catarina e 69 de São Paulo. A coleta das amostras de leite, o isolamento bacteriano e a identificação foram feitas de acordo com as recomendações do *National Mastitis Council* (NMC, 2004). A classificação das bactérias no gênero *Staphylococcus* foi feita considerando as características morfológicas das colônias em ágar-sangue, a coloração de Gram, a produção de catalase, a resistência à furazolidona (100µg) e a produção de ácido a partir de glicerol (NMC 2004). A identificação de *S. aureus* foi feita considerando a produção de coagulase e de acetoina (Voges-Proskauer, VP). As demais espécies foram classificadas como *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (NMC, 2004).

Todas as bactérias utilizadas no estudo encontram-se na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária, da Embrapa Gado de Leite, armazenadas a -20 °C e a -80 °C, em meio contendo leite em pó desnatado e 10% de glicerol.

#### 3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE E-TEST®

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos penicilina, oxacilina, cefalotina, gentamicina, clindamicina, eritromicina, enrofloxacina, sulfonamida, sulfametoxazol + trimetoprima e tetraciclina, foi determinada pelo

método E-TEST®, para as 170 amostras de *Staphylococcus*, de acordo com as recomendações do fabricante.

As tiras de E-TEST® foram retiradas do freezer 30 minutos antes de serem utilizadas para atingirem a temperatura ambiente. O inóculo bacteriano para cada amostra testada foi preparado em solução salina estéril (NaCl p/v 0,85%) a partir de uma cultura com 18 - 24 horas de crescimento em ágar BHI e ajustado para a turbidez equivalente à solução padrão da escala 0,5 de MacFarland. Foi utilizada a bactéria *S. aureus* (ATCC 29213), da *American Type Culture Collection* (ATCC), como controle de qualidade do teste.

As suspensões bacterianas foram semeadas na superfície do ágar Mueller-Hinton em três sentidos, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). As tiras impregnadas com os antimicrobianos foram colocadas na superfície do ágar, dentro de 15 minutos após as amostras serem semeadas. As leituras foram feitas após 18 - 24 horas de incubação em estufa a  $35 \pm 2$  °C, considerando-se o valor da CIM o local da intersecção do halo de inibição (elipse) para cada antimicrobiano estudado.

A susceptibilidade das amostras testadas foi determinada de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI e pela BSAC (*British Society Antimicrobial Chemotherapy*) (CLSI, 2008; BSAC, 2013).

### 3.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR COM DISCOS DE OXACILINA E DE CEFOXETINA

O teste de susceptibilidade à oxacilina foi realizado utilizando o método de difusão em ágar com disco de oxacilina e cefoxetina (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para todas as 170 amostras de *Staphylococcus*. A bactéria *S. aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle de qualidade do teste.

O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril (NaCl p/v 0,85%) a partir de uma cultura com 18 - 24 horas de crescimento em ágar BHI e ajustado para que a turbidez fosse equivalente à solução padrão da escala 0,5 de MacFarland. Dentro de 15 minutos do preparo do inóculo, foi submergido um "swab" de algodão atóxico e estéril na suspensão bacteriana e posteriormente este "swab"



umedecido foi passado por igual em placas de ágar Mueller Hinton, em três direções. Após 15 minutos, os discos de antibióticos foram aplicados e gentilmente pressionados com uma pinça, previamente flambada, para assegurar o contato completo do disco com a superfície do ágar. As placas foram incubadas por 18 - 24 horas a  $35 \pm 2$  °C.

A interpretação dos resultados foi feita de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2008). Para o método de difusão em ágar com disco de cefoxetina foram consideradas resistentes as amostras de *S. aureus* que apresentaram zona de inibição  $\leq 21$  mm e de *Staphylococcus* coagulase-negativos (STACN) que apresentaram zona de inibição  $\leq 24$  mm. Para o método de difusão em ágar com disco de oxacilina foram consideradas como resistentes as amostras de *S. aureus* com zona de inibição  $\leq 13$  mm e as amostras de STACN com zona de inibição  $\leq 17$  mm (CLSI, 2008).

#### 3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR

A determinação da CIM de oxacilina para as 170 amostras de *Staphylococcus* foi realizada pela diluição da oxacilina em ágar Mueller-Hinton, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Foram avaliadas as concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 µg/mL do antimicrobiano.

Foram utilizadas placas descartáveis estéreis de 150 mm de diâmetro, previamente marcadas na parte externa do fundo com até 65 quadrados, sendo possível a avaliação de até 65 amostras por placa. O ágar foi preparado em volumes de 50 mL e esterilizado em frascos individuais. Após o meio de cultura atingir a temperatura de aproximadamente 56°C, foram adicionadas as quantidades necessárias da solução de oxacilina para se obter as diferentes concentrações do antimicrobiano. Foi preparada uma placa para cada concentração e uma placa sem o antimicrobiano para controle.

O inóculo bacteriano de cada amostra foi preparado em solução salina estéril (NaCl p/v 0,85%) a partir de uma cultura com 18 - 24 horas de crescimento em ágar

BHI e ajustado para que a turbidez fosse equivalente à solução padrão da escala 0,5 de MacFarland. As amostras foram inoculadas nas placas com o auxílio de alças descartáveis calibradas de 1 µL, dentro de 15 minutos após o preparo do inóculo. Foi utilizada a bactéria *S. aureus* (ATCC 29213) como controle de qualidade do teste. As leituras foram feitas após 18 - 24 horas de incubação em estufa 35 ± 2 °C. A susceptibilidade das amostras testadas foi determinada de acordo com as recomendações do CLSI (2008) considerando CIM de oxacilina ≥ 0,5 µg/mL para *Staphylococcus* spp. e ≥ 4,0 µg/mL para *S. aureus*.

### 3.5. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

O perfil da susceptibilidade antimicrobiana das amostras *mecA* positivas foi determinado pelo método de difusão em ágar para: ampicilina 10 µg, penicilina 10 unidades, oxacilina 1 µg, cefalotina 30 µg, ceftiofur 30 µg, gentamicina 10 µg, clindamicina 2 µg, eritromicina 15 µg, enrofloxacin 5 µg, sulfonamida 300 µg, sulfametoxazol + trimetoprima 25 µg e tetraciclina 30 µg (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) de acordo com as recomendações do CLSI (2008). A bactéria *S. aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle de qualidade do teste.

O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril (NaCl p/v 0,85%) a partir de uma cultura com 18 - 24 horas de crescimento em ágar BHI e ajustado para turbidez equivalente à solução padrão da escala 0,5 de MacFarland. Dentro de 15 minutos do preparo do inóculo, foi submergido um "swab" de algodão atóxico e estéril na suspensão bacteriana e em seguida, este "swab" umedecido foi passado por igual em placas de ágar Mueller Hinton, em três direções. Após 15 minutos os discos de antibióticos foram aplicados com o auxílio de um aplicador e gentilmente pressionados com uma pinça previamente flambada para assegurar o contato completo do disco com a superfície do ágar. As placas foram incubadas por 18 - 24 horas a 35 ± 2 °C para posterior leitura e interpretação dos resultados de acordo com CLSI (2008).

### 3.6. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *mecA* E rRNA 16S

A extração de DNA total foi realizada de acordo com Rosec e Gigaud (2002), com modificações. As bactérias foram cultivadas em 5 mL de caldo BHI e incubadas a 35 °C por 24 horas. O volume de 1,0 mL da cultura foi centrifugado (12.000 x g, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µL de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 5mM, pH 8,0) seguindo-se de agitação para lavagem do sedimento. A suspensão obtida foi centrifugada novamente (12.000 x g, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi suspenso em 200 µL de TE e, à suspensão, foram adicionados 10 µL de lisostafina (1mg/mL) (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) e 8µL de lisozima (50 mg/mL) (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos). Esta suspensão foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 30 minutos.

Após a incubação foram adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos), seguindo-se de agitação da suspensão e incubação a 60 °C por 20 minutos para lise dos protoplastos e destruição de eventuais termonucleases. Após este período, a mistura foi aquecida a 100 °C por 10 minutos, para inativação da proteinase K.

A suspensão obtida foi centrifugada (12.000 x g, 2 minutos) e o sobrenadante transferido para um novo microtubo, para posterior estocagem a - 20 °C. Foi utilizado o espectrofotômetro (GeneQuantpro, Amersham Biosciences, Amersham, Inglaterra) para verificação da quantidade de DNA obtido.

Para pesquisa do gene *mecA* nas 170 amostras de *Staphylococcus* spp., foram feitas duas reações de PCR multiplex. Em uma das reações foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 5' - AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C - 3' e 5' - AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C - 3' (MURAKAMI et al., 1991) e 5'-GTT ATT AGG GAA GAA CAT ATG TG-3', 5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3' (JAFFE et al., 2000), que amplificam um produto de 533 pb do gene *mecA* e 750 pb do rRNA 16S, respectivamente. Na outra reação foram utilizados os iniciadores: 5'-ACT GCT ATC CAC CCT CAA AC3', 5'-CTG GTG AAG TTG TAA TCT GG-3' (MEHROTRA, WANG E JOHNSON, 2000) e 5'-GTT ATT AGG GAA GAA CAT ATG TG-3', 5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3' (JAFFE et al., 2000), que amplificam um produto de 163 pb do gene *mecA* e 750 pb do rRNA 16S, respectivamente.

Os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Murakami et al. (1991) e, por Mehrota, Wang e Johnson (2000) amplificam regiões diferentes do gene *mecA*, sendo utilizados com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção deste gene. Os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um fragmento do rRNA 16S foram utilizados como controle interno das reações de PCR multiplex, visto que as regiões de pareamento destes iniciadores são encontradas nas bactérias do gênero *Staphylococcus*.

Cada reação de PCR foi preparada com o volume final de 50 µL, contendo 45 µL de PCR MasterMix (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil); 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles/µL) e 1 µL de DNA molde (300 ng). As reações foram incubadas a 95 °C por 5 minutos, para desnaturação inicial e submetidas a 35 ciclos de amplificação (95 °C por 30 segundos, para desnaturação; 55 °C por 30 segundos, para pareamento dos iniciadores e 74 °C por 2 minutos, para extensão), seguido de uma etapa final de extensão a 74 °C por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). A estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle negativo para o gene *mecA* e como controle positivo para o rRNA 16S. Como controle positivo para o gene *mecA* foi utilizada uma estirpe de *S. epidermidis* resistente à oxacilina cedida pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF). Uma reação preparada sem a adição de DNA foi utilizada como controle negativo da reação de PCR.

As bactérias positivas para o gene *mecA* foram submetidas à reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores descritos por Murakami et al. (1991), para sequenciamento do produto obtido, e confirmação da sua identidade. Cada reação de PCR foi preparada com o volume final de 50 µL, contendo 41 µL de PCR MasterMix (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil); 4 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (2 pmol/µL) e 1 µL de DNA molde (100 ng). As condições de amplificação e os controles empregados foram os mesmos descritos acima.

### 3.7. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS RESISTENTES À OXACILINA

A identificação das espécies de *Staphylococcus* com fenótipo de resistência à oxacilina foi feita através do sequenciamento do gene rRNA 16S. Para isso, foram feitas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-3' (LANGE et al., 2011), que amplificam um produto de 536 pb do rRNA 16S. Cada reação de PCR foi preparada com o volume final de 50 µL, contendo 47 µL de PCR MasterMix (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil); 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/µL) e 1 µL de DNA molde (100 ng). As reações foram incubadas a 95 °C por 5 minutos, para desnaturação inicial e submetidas a 35 ciclos de amplificação (95 °C por 30 segundos, para desnaturação; 55 °C por 30 segundos, para pareamento dos iniciadores e 74 °C por 30 segundos, para extensão), seguido de uma etapa final de extensão a 74 °C por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). A estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo e uma reação preparada sem a adição de DNA como controle negativo.

### 3.8. AMPLIFICAÇÃO DO GENE *blaZ*

A pesquisa do gene *blaZ* foi feita através da reação de PCR multiplex nas amostras de estafilococos que apresentaram o fenótipo de resistência à oxacilina. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 5'-ATA TGT ATG GCA ATC GTT TCA AT-3'; 5'-GTA AAT GCA CTT GCT TCA GGA C-3' (GAO et al., 2011) e 5'-GTT ATT AGG GAA GAA CAT ATG TG-3', 5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3' (JAFFE et al., 2000), que amplificam um produto de 517 pb do gene *blaZ* e 750 pb do rRNA 16S, respectivamente.

As amostras positivas para o gene *blaZ* foram submetidas à reação de PCR com os iniciadores descritos por Gao et al. (2011). Cada reação de PCR foi preparada com o volume final de 50 µL, contendo 45 µL de PCR MasterMix (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil); 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/µL) e 1 µL

de DNA molde (100 ng). As reações foram incubadas a 95 °C por 5 minutos, para desnaturação inicial e submetidas a 35 ciclos de amplificação (95 °C por 30 segundos, para desnaturação; 55 °C por 30 segundos, para pareamento dos iniciadores e 74 °C por 2 minutos, para extensão), seguido de uma etapa final de extensão a 74 °C por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). A estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle negativo para o gene *blaZ* e como controle positivo para o rRNA 16S. Além disto, como controle negativo foi utilizada uma reação preparada sem a adição DNA.

### 3.9. AMPLIFICAÇÃO DO GENE *mecA* HOMÓLOGO

Todas as amostras com fenótipo de resistência à oxacilina foram submetidas à reação de PCR para a pesquisa do gene *mecA* homólogo (*mecC*). Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 5' TCA CCA GGT TCA AC[Y] CAA AA 3'; 5' CCT GAA TC[W] GCT AAT AAT ATT TC 3' (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011) e 5'-GTT ATT AGG GAA GAA CAT ATG TG-3', 5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3' (JAFFE et al., 2000) que amplificam um fragmento de 356 pb do gene *mecC* e 750 pb do rRNA 16S, respectivamente.

As amostras que apresentaram produto de amplificação foram submetidas à reação de PCR com os iniciadores descritos por García-Álvarez et al. (2011). Cada reação de PCR foi preparada com o volume final de 50 µL, contendo 47 µL de PCR MasterMix (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil); 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/µL) e 1 µL de DNA molde (100 ng). As reações foram incubadas a 94 °C por 1 minuto, para desnaturação inicial e submetidas a 30 ciclos de amplificação (94 °C por 1 minuto, para desnaturação; 55 °C por 1 minuto, para pareamento dos iniciadores e 72 °C por 2 minutos, para extensão), seguido de uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). A estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle negativo para o gene *mecC* e como controle positivo para o rRNA 16S. Foi utilizada uma reação preparada sem a adição de DNA como controle negativo.

### 3.10. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os fragmentos de DNA amplificados pelas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose preparado a 1,5%, p/v, com tampão TBE 1X (Tris Borato - EDTA). Foram adicionados 4 µL do tampão de amostra com azul de bromofenol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) a 10 µL de cada produto de amplificação. As amostras e o padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil) foram aplicados separadamente em cada poço do gel e submetidos à eletroforese em cuba horizontal a 100 V em tampão TBE 1X por duas horas, ou até que o corante atingisse 3/4 do comprimento do gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) durante 20 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta e o registro das imagens foi feito em sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene, La Jolla, EUA).

### 3.11. SEQUENCIAMENTO DOS GENES *mecA*, *blaZ* e rRNA 16S

Para confirmação da detecção dos genes *mecA* e *blaZ* foi realizado o sequenciamento dos produtos de amplificação da PCR. O sequenciamento do gene rRNA 16S foi feito para identificar as espécies de *Staphylococcus* fenotipicamente resistentes à oxacilina .

A purificação de 100 µL do produto de PCR de cada gene foi realizada com o kit Easy Gen (Easy Path, São Paulo, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado pelo método dideoxi descrito por Sanger e Nicklen (1977). Uma alíquota de 200 ng do DNA purificado foi usada como molde para as reações de sequenciamento, nas quais foram utilizados o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Leipzig, Germany) e 0,5 µM dos mesmos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de amplificação dos genes *mecA*, *blaZ* e rRNA 16S. Os iniciadores *forward* e *reverse* foram utilizados em reações separadas de modo a se

obter duas sequências para cada amostra analisada. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, carregadas no equipamento MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare, Leipzig, Germany) e submetidas a 6 kV por 160 minutos.

As sequências *forward* e *reverse* foram editadas e reunidas utilizando-se o software DNA Baser Sequence Assembler. As sequências "consenso" resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.com](http://www.ncbi.nlm.nih.com)) e analisadas pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

### 3.12. TIPAGEM DO SCC*mec* por PCR MULTIPLEX

As amostras de *Staphylococcus mecA* positivas foram submetidas à tipagem do cassete cromossômico do estafilococo *mec* (SCC*mec*) utilizando a técnica de PCR multiplex, descrita por Milheiriço et al. (2007). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação, o tamanho dos fragmentos que cada par de iniciadores amplifica, o tipo do cassete e a região correspondente estão listados na Tabela 1.

Cada reação de PCR foi preparada com o volume final de 50 µL, contendo 5 pmoles dos iniciadores: *mecA* P4 e *mecA* P7; 10 pmoles dos iniciadores Kdp F1 e Kdp R1; 20 pmoles de CIF F2, CIF R2, RIF 5 F10, RIF 5 R13, SCC*mec* III J1 F, SCC*mec* III J1 R, SCC*mec* V J1 F e SCC*mec* V J1 R ; 40 pmoles dos iniciadores *mecl* P2, *mecl* P3, *dcs* F2, *dcs* R1, *ccr* B2 F2, *ccr* B2 R2, *ccr* C F2 e *ccrC* R2, 200 µM de dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 5 µL de tampão 10X da enzima Taq (Cenbiot, Porto Alegre, Brasil) e 1 µL de DNA molde (100 ng).

As reações foram incubadas a 94 °C por 4 minutos, para desnaturação inicial e submetidas a 30 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, para desnaturação; 53 °C por 30 segundos, para pareamento dos iniciadores e 72 °C por 1 minuto, para extensão), seguido de uma etapa final de extensão a 72 °C por 4 minutos. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA).



**Tabela 1** - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados, tamanho dos fragmentos esperados e especificidade das reações de PCR multiplex para tipagem do cassete *SCCmec*

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Fragmento (pb)	Tipo de <i>SCCmec</i> /região
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I, região J1
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
ccrC F2	GTA CTCTGTTACAATGTTTGG	449	V, complexo <i>ccr</i>
ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC		
RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III, região J3
RIF5 R13	ATGGAGATGAATTACAAGGG		
SCCmec V J1 F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	377	V, região J1
SCCmec V J1 R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG		
dcs F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV e VI, região J3
dcs R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
ccrB2 F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	311	II e IV, complexo <i>ccr</i>
ccrB2 R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC		
kdp F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	II, região J1
kdp R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
SCCmec III J1 F	CATTTGTGAAACACAGTACG	243	III, região J1
SCCmec III J1 R	GTTATTGAGACTCCTAAAGC		
mecl P2	ATCAAGACTTGCATTACAGGC	209	II e III, complexo <i>mec</i>
mecl P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC		
mecA P4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	162	Controle interno da reação
mecA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

### 3.13. ANÁLISE DO DNA CROMOSSÔMICO POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

A tipagem por PFGE foi realizada para as amostras *mecA* positivas de acordo com McDougal et al. (2003), com modificações. As culturas bacterianas em caldo BHI foram incubadas a 35 °C ± 2 °C por 18 - 24 horas. Após este período, as concentrações celulares foram ajustadas em espectrofotômetro para se obter uma DO<sub>610</sub> entre 0,8 e 1,2 nm. A suspensão bacteriana foi centrifugada e lavada com TE (Tris HCl 10mM, EDTA 5mM, pH 8,0).

A cada tubo de cultura em TE foram adicionados 10 µL de lisostafina (1 mg/mL), seguindo-se de incubação a 37 °C por 15 minutos. Para a preparação dos *plugs* foram adicionados 300 µL de agarose com baixo ponto de fusão (*low melting point*) (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos). Após a solidificação dos *plugs*, os mesmos foram dispensados em um microtubo contendo 3 mL de tampão de lise de células (TLC) (Tris HCl 6 mM, NaCl 1M, EDTA 100 mM, Brij-L23 0,5%, desoxicolato de sódio 0,2%, lauroil sarcosinato de sódio 0,5%, pH 8,0). Os tubos foram incubados a 37 °C por 4 - 24 horas. O TLC foi então descartado dos tubos e 3 mL de TE foram adicionados para remover o restante do tampão. Em seguida o TE foi descartado e os *plugs* foram lavados mais quatro vezes à temperatura ambiente por 20 minutos. A digestão enzimática do DNA bacteriano foi feita com a enzima de restrição *SmaI*. A metade de cada *plug* foi transferida para um microtubo contendo 15 µL do tampão de restrição 10X Buffer T (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 120 µL da enzima *SmaI*, 15 µL de BSA e 20U da enzima *SmaI* (10 U/ µL -Invitrogen, Carlsbad, EUA). As amostras foram incubadas por 4 - 24 horas a 37°C. Os *plugs* foram submetidos à eletroforese em campo pulsado no aparelho CHEF-DRII (Bio-Rad, Hercules, EUA) por 23 horas, a 14°C, 6 v/cm, com pulso inicial de 5s e final de 40s, em gel de agarose a 1,5%. Após a eletroforese o gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) por 20 minutos e descorado em água destilada durante 60 - 90 minutos. A imagem foi capturada sob luz UV em sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene, La Jolla, EUA). Como marcador de peso molecular foi utilizada a bactéria *Salmonella choleraesuis subsp. Branderup* (H9812) clivada com a enzima *XbaI* (HUNTER et al., 2005).

### 3.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças observadas no percentual de susceptibilidade aos antimicrobianos entre as amostras de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus* coagulase-negativos foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado ao nível de significância  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ .

A sensibilidade e a especificidade dos testes fenotípicos para detecção da resistência à oxacilina, foram calculadas considerando os resultados da PCR para o

gene *mecA* como verdadeiro-positivos (padrão-ouro). As fórmulas utilizadas estão descritas abaixo (NOORDHUIZEN et al., 2001):

$$\text{Sensibilidade} = a / (a + c)$$

$$\text{Especificidade} = d / (d + b)$$

onde *a* é o número de amostras verdadeiro-positivas, *b* é o número de amostras falso-positivas, *c* é o número de amostras falso-negativas e *d* é o número de amostras verdadeiro-negativas. O quadro abaixo mostra as possibilidades de interpretação dos testes.

		Padrão ouro (PCR para o gene <i>mecA</i> )	
		Amostra oxacilina resistente	Amostra oxacilina sensível
Resultado dos testes fenotípicos	Positivo	<i>a</i> Verdadeiro-positiva	<i>b</i> Falso-positivo
	Negativo	<i>c</i> Falso-negativa	<i>d</i> Verdadeiro-negativa

Os perfis eletroforéticos obtidos do PFGE foram analisados utilizando-se software NTSYS (Versão 2.21, Setauket, NY). Os dendrogramas foram construídos baseando-se nos coeficientes de similaridade calculados usando a fórmula de Dice, ( $S=2a/2a+b+c$ ), onde "a" é igual ao número de bandas compartilhadas entre as amostras 1 e 2; "b" é igual ao número de bandas exclusivas da amostra 1 e "c" é igual ao número de bandas exclusivas da amostra 2. Os valores obtidos foram utilizados para compor uma matriz de similaridade e os dados agrupados através do método da média aritmética não ponderada, UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE DEZ ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE E-TEST®

Os resultados da concentração inibitória mínima determinada pelo E-TEST® estão apresentados no apêndice B. Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se a análise da concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos para as amostras de *Staphylococcus aureus* e para as amostras de STACN, respectivamente. Sendo apresentados os valores da CIM<sub>50</sub> (µg/mL) e CIM<sub>90</sub> (µg/mL) (concentração inibitória mínima do antimicrobiano capaz de inibir 50% e 90% da população bacteriana estudada, respectivamente), as variações observadas e a porcentagem de amostras susceptíveis a cada antimicrobiano.

Mais de 86% dos *S. aureus* e dos STACN foram susceptíveis a cefalotina, gentamicina, clindamicina, eritromicina, enrofloxacina, sulfonamida, sulfametoxazol + trimetoprima e tetraciclina. Uma menor porcentagem das amostras foi susceptível à penicilina. Não foram encontradas amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina, somente de STACN (29,67%). A susceptibilidade de *S. aureus* à tetraciclina foi de 91,14%, enquanto das amostras de STACN foi de 76, 92%.

**Tabela 2** - Análise da concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos para 79 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite subclínica bovina em diferentes estados brasileiros.

Antimicrobiano	CIM <sub>50</sub> (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	Varição (µg/mL)	Suceptibilidade (%)
<b>Penicilina</b>	0,047	0,75	0,006 - 10	69,62%
<b>Oxacilina</b>	0,19	0,38	0,047 - 0,75	100%
<b>Cefalotina</b>	0,094	0,19	0,032 - 0,38	100%
<b>Gentamicina</b>	0,38	0,5	0,023 - 1	100%
<b>Clindamicina</b>	0,064	0,125	0,016 - 0,19	100%
<b>Eritromicina</b>	0,125	0,19	0,047 - 12	98,73%
<b>Enrofloxacina</b>	0,19	0,25	0,047 - 0,38	100%
<b>Sulfonamida</b>	12	35,2	2 - 1024	98,73%
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprima</b>	0,032	0,064	0,012 - 1,5	100%
<b>Tetraciclina</b>	0,19	0,75	0,032 - 48	91,14%

**Tabela 3** - Análise da concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos para 91 amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isoladas de mastite subclínica bovina em diferentes estados brasileiros

Antimicrobiano	CIM <sub>50</sub> (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	Variação (µg/mL)	Susceptibilidade (%)
<b>Penicilina</b>	0,064	0,38	0,006 - 32	65,93%
<b>Oxacilina</b>	0,25	1	0,025 - 2	70,33%
<b>Cefalotina</b>	0,064	0,25	0,023 - 12	89,01%
<b>Gentamicina</b>	0,094	0,75	0,016 - 8	93,40%
<b>Clindamicina</b>	0,047	0,25	0,016 - 256	93,40%
<b>Eritromicina</b>	0,094	12	0,023 - 256	86,81%
<b>Enrofloxacina</b>	0,125	0,38	0,047 - 32	96,70%
<b>Sulfonamida</b>	12	128	1 - 1024	95,60%
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprima</b>	0,047	0,19	0,006 - 3	97,80%
<b>Tetraciclina</b>	0,19	32	0,032 - 128	76,92%

#### 4.2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO

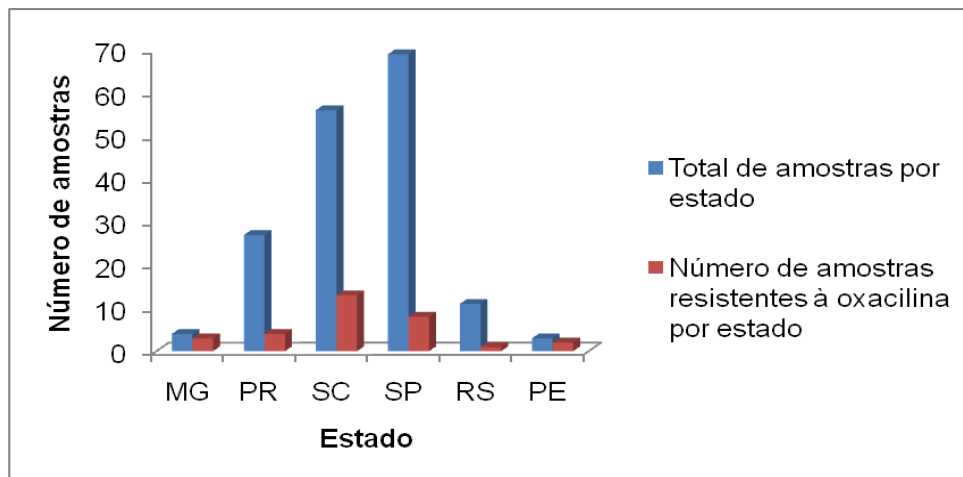
Os resultados da CIM de oxacilina e da susceptibilidade à oxacilina e à cefoxetina pelo método de difusão em ágar estão apresentados no apêndice A. As estirpes de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 25923 utilizadas como controle de qualidade dos respectivos experimentos apresentaram inibição de crescimento dentro das faixas estabelecidas pelo CLSI (2008).

Das 170 amostras de *Staphylococcus* estudadas, 31 foram consideradas resistentes à oxacilina em pelo menos um dos testes fenotípicos realizados. Na Figura 3 estão representados, por estado, o total de amostras estudadas e o número de amostras resistentes à oxacilina, sendo três de Minas Gerais (MG), quatro do Paraná (PR), 13 de Santa Catarina (SC), oito de São Paulo (SP), uma do Rio Grande do Sul (RS) e duas de Pernambuco (PE).

Na Tabela 4 é apresentado o número de amostras resistentes em cada teste fenotípico. A partir do teste de diluição em ágar de oxacilina, 26 amostras foram consideradas resistentes à oxacilina. A partir do teste de difusão em ágar com disco

de oxacilina, 29 amostras foram consideradas resistentes e a partir do teste de difusão em ágar com disco de cefoxetina, 10 amostras foram consideradas resistentes.

Todas as 31 bactérias com fenótipo de resistência à oxacilina foram classificadas, por meio de testes bioquímicos, como *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos.



**Figura 3** - Total de amostras de *Staphylococcus* estudadas (n=170) e o número de amostras resistentes à oxacilina em pelo menos um dos seguintes métodos: diluição em ágar com oxacilina, difusão em ágar com discos de oxacilina e cefoxetina nos estados de Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS) e Pernambuco (PE).

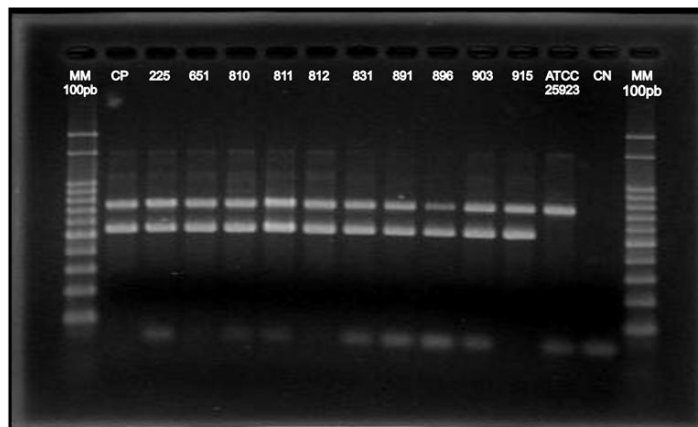
**Tabela 4** - Número de amostras resistentes à oxacilina pelo método de ágar diluição, ágar difusão com disco de oxacilina e cefoxetina sobre o total de amostras analisadas em cada estado

Estado	Testes		
	CIM de oxacilina	Difusão em ágar com disco de oxacilina	Difusão em ágar com disco de cefoxetina
MG	3/4	3/4	2/4
PR	4/27	4/27	4/27
SC	10/56	11/56	4/56
SP	8/69	8/69	0/69
RS	0/11	1/11	0/11
PE	1/3	2/3	0/3
<b>Total</b>	26/170	29/170	10/170

#### 4.3. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *mecA* e rRNA 16S

Das 170 amostras analisadas, dez foram positivas para o gene *mecA*, apresentando um produto de amplificação com tamanho correspondente ao esperado, tanto na reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Murakami (1991), quanto na reação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Mehrotra, Wang e Johnson (2000).

Das dez amostras *mecA* positivas duas foram do estado de Minas Gerais (MG), quatro do Paraná (PR) e quatro de Santa Catarina (SC). Na Figura 4 encontra-se o resultado da eletroforese dos produtos de amplificação dos genes *mecA* (533pb) e rRNA 16S (750pb) para as dez amostras (225, 651, 810, 811, 812, 831, 891, 896, 903, 915), o controle positivo (*S. epidermidis* resistente à meticilina - MRSE), *S. aureus* ATCC 25923 e o controle negativo da reação.



**Figura 4** - Foto do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos por PCR multiplex para os genes *mecA* e rRNA 16S. *mecA* (533pb) e rRNA 16S (750pb). MM: Marcador de peso molecular 100pb (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500 e 2.000 pb). CP: *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina - MRSE, ATCC 25923: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e CN: controle negativo da reação. Amostras: 225, 651, 810, 811, 812, 831, 891, 896, 903, 915.

#### 4.4. SEQUENCIAMENTO DO GENE *mecA* E DO GENE rRNA 16S

O resultado do sequenciamento confirmou a identidade do produto de PCR de 533 pb das 10 amostras que amplificaram com os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Murakami (1991) para o gene *mecA*. As seqüências obtidas foram

relacionadas ao gene de acordo com o menor *e-value* e a maior similaridade. Todas as seqüências apresentaram de 99% a 100% de similaridade e *e-value* igual a zero. Na Tabela 5 são mostrados os resultados do sequenciamento.

**Tabela 5** - Resultado do sequenciamento de um segmento de 533 pb do gene *mecA*

Amostra	Estado	Tamanho da seqüência consenso	Similaridade	<i>e-value</i>	Gene identificado
225	MG	510	100%	0.0	<i>mecA</i>
651	MG	499	100%	0.0	<i>mecA</i>
810	PR	505	100%	0.0	<i>mecA</i>
811	PR	497	99%	0.0	<i>mecA</i>
812	PR	452	100%	0.0	<i>mecA</i>
831	PR	517	100%	0.0	<i>mecA</i>
891	SC	465	100%	0.0	<i>mecA</i>
896	SC	529	100%	0.0	<i>mecA</i>
903	SC	527	100%	0.0	<i>mecA</i>
915	SC	528	100%	0.0	<i>mecA</i>

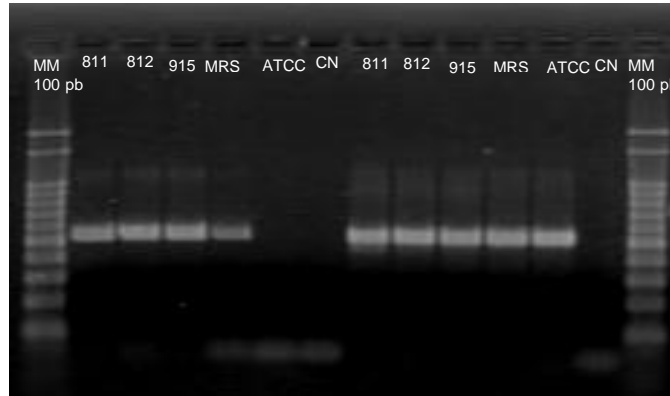
O sequenciamento dos produtos de PCR resultantes da amplificação do rRNA 16S das dez amostras *mecA* positivas permitiu identificá-las como *S. epidermidis*. Entre as 21 amostras *mecA* negativas e com fenótipo de resistência à oxacilina, cinco foram identificadas como *S. chromogenes*, uma como *S. epidermidis*, uma como *S. lentus*, cinco como *S. saprophyticus*, duas como *S. sciuri*, uma como *S. simulans* e duas como *S. xylosus*. Para quatro amostras (507, 901, 916, 948) as seqüências obtidas tiveram de 99% a 100% de similaridade com seqüências de mais de uma espécie de estafilococos (507: *S. haemolyticus*, *S. auricularis*, *S. warneri*; 901: *S. succinus*, *S. saprophyticus*; 916: *S. succinus*, *S. saprophyticus*; 948: *S. saprophyticus*, *S. xylosus*), sendo necessário, portanto, outros métodos para identificá-las. Na Tabela 6 são mostrados os resultados do sequenciamento do gene rRNA 16S das 31 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina. A identificação da espécie de cada amostra foi realizada considerando-se o menor *e-value* e a maior similaridade. Todas apresentaram similaridade maior ou igual a 99% e apenas duas apresentaram *e-value* diferente de zero.



**Tabela 6** - Resultado do sequenciamento de um segmento de 536 pb do rRNA 16S das 31 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina

Amostra	Estado	Tamanho da sequência consenso	Similaridade	e-value	Identificação
225	MG	467	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> ,
507	MG	470	100%	0.0	<i>S. auricularis</i> , <i>S. warneri</i>
651	MG	504	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
810	PR	490	99%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
811	PR	518	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
812	PR	511	99%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
831	PR	444	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
835	SC	442	100%	0.0	<i>S. sciuri</i>
840	SC	443	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
841	SC	460	100%	0.0	<i>S. lentus</i>
844	SC	445	100%	0.0	<i>S. chromogenes</i>
891	SC	478	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
892	SC	455	100%	0.0	<i>S. chromogenes</i>
896	SC	491	99%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
898	SC	491	100%	0.0	<i>S. chromogenes</i>
901	SC	502	100%	0.0	<i>S. succinus</i> , <i>S. saprophyticus</i>
903	SC	526	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
915	SC	499	100%	0.0	<i>S. epidermidis</i>
916	SC	512	100%	0.0	<i>S. succinus</i> , <i>S. saprophyticus</i>
775	SP	487	100%	0.0	<i>S. saprophyticus</i>
776	SP	475	100%	0.0	<i>S. saprophyticus</i>
777	SP	487	100%	0.0	<i>S. saprophyticus</i>
782	SP	439	100%	0.0	<i>S. saprophyticus</i>
864	SP	440	100%	0.0	<i>S. saprophyticus</i>
885	SP	465	100%	0.0	<i>S. xylosus</i>
925	SP	422	100%	0.0	<i>S. chromogenes</i>
932	SP	327	100%	1,00E-169	<i>S. sciuri</i>
939	RS	453	99%	0.0	<i>S. chromogenes</i>
947	PE	416	100%	0.0	<i>S. xylosus</i>
948	PE	286	100%	6,00E-147	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>

Na Figura 5 encontra-se o resultado da eletroforese dos produtos de amplificação dos genes *mecA* (533 pb) e rRNA 16S (536 pb) das amostras 811, 812 e 915, para exemplificar a reação simplex que foi realizada para a reação de seqüenciamento.



**Figura 5** - Gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos por PCR para os genes *mecA* e rRNA 16S. *mecA* (533 pb) e rRNA 16S (536 pb). MM: Marcador de peso molecular 100 pb (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500 e 2.000 pb); 2º ao 7º poços: produtos de amplificação e controle negativo da reação para o gene *mecA*. 8º ao 13º poços: produtos de amplificação e controle negativo da reação para o rRNA 16S.

#### 4.5. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *blaZ* e *mecC* (*mecA* homólogo)

Das 31 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina, 16 foram positivas para o gene *blaZ*, sendo que nove dessas foram positivas para o gene *mecA*. Nenhuma das amostras analisadas amplificou para o gene *mecC* e duas (835 e 932) amplificaram para o gene *mecA*-like de *S. sciuri*.

O resultado do sequenciamento confirmou a identidade do produto de PCR obtido nas 16 amostras que amplificaram com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *blaZ*. As seqüências obtidas foram relacionadas ao gene de acordo com o menor *e-value* e a maior similaridade.

Todas as seqüências apresentaram de 99% a 100% de similaridade. Nas Tabelas 7 e 8 são mostrados os resultados do sequenciamento.

**Tabela 7** - Resultado do sequenciamento de um segmento de 517 pb do gene *blaZ* de 16 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina

Amostra	Estado	Tamanho da sequência consenso	Similaridade	e-value	Gene identificado
225	MG	275	100%	7,00E-141	<i>blaZ</i>
507	MG	432	100%	0.0	<i>blaZ</i>
810	PR	441	100%	0.0	<i>blaZ</i>
811	PR	198	99%	1,00E-96	<i>blaZ</i>
812	PR	400	99%	0.0	<i>blaZ</i>
831	PR	390	100%	0.0	<i>blaZ</i>
840	SC	332	100%	3,00E-168	<i>blaZ</i>
844	SC	362	99%	0.0	<i>blaZ</i>
891	SC	301	100%	3,00E-155	<i>blaZ</i>
892	SC	202	100%	2,00E-100	<i>blaZ</i>
896	SC	368	100%	0.0	<i>blaZ</i>
898	SC	375	100%	0.0	<i>blaZ</i>
903	SC	226	100%	9,00E-114	<i>blaZ</i>
915	SC	406	100%	0.0	<i>blaZ</i>
925	SP	125	100%	7,00E-58	<i>blaZ</i>
939	RS	146	100%	2,00E-69	<i>blaZ</i>

**Tabela 8** - Resultado do sequenciamento de um segmento do gene *mecA-like* de *S. sciuri*

Amostra	Estado	Tamanho da sequência consenso	Similaridade	e-value	Gene identificado
835	MG	573	99%	3,00E-160	<i>mecA-like</i>
932	MG	547	99%	2,00E-152	<i>mecA-like</i>

#### 4.6. RELAÇÃO ENTRE OS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES DE CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA

Na Tabela 9 é apresentado o número de amostras resistentes à oxacilina em cada teste fenotípico realizado (diluição em ágar de oxacilina, difusão em ágar com disco de oxacilina e cefoxetina, E-TEST® para oxacilina), bem como o número de amostras positivas para o gene *mecA*.

**Tabela 9** - Número de amostras resistentes à oxacilina em cada teste fenotípico realizado e número de amostras positivas para o gene *mecA*

Total de amostras com fenótipo de resistência	CIM OX <sup>1</sup>	Disco OX <sup>2</sup>	Disco CEFOX <sup>3</sup>	E-TEST® <sup>4</sup>	<i>mecA</i>
31	26	29	10	27	10

<sup>1</sup>**CIM OX**: Teste de diluição em ágar com oxacilina. <sup>2</sup>**Disco OX**: difusão em ágar com disco de oxacilina. <sup>3</sup>**Disco CEFOX**: difusão em ágar com disco de cefoxetina, <sup>4</sup>**E-TEST®**: E-TEST® com oxacilina. **mecA**: número de amostras positivas para o gene *mecA*. Foram consideradas como resistentes as amostras com: <sup>1</sup> crescimento em concentrações  $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ ; <sup>2</sup> zona de inibição  $\leq 17$  mm; <sup>3</sup> zona de inibição  $\leq 24$  mm.

Como não foram encontradas amostras de *S. aureus* com fenótipo de resistência à oxacilina e nem amostras de *S. aureus mecA* positivas, a sensibilidade e a especificidade de cada teste fenotípico quanto à presença do gene *mecA* foi calculada apenas para os STACN (n=91). Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Sensibilidade e especificidade dos testes fenotípicos para caracterização da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (n=91)

Testes	Sensibilidade	Especificidade
<b>CIM OX</b>	100%	80,24%
<b>Disco OX</b>	100%	76,54%
<b>Disco CEFOX</b>	100%	100%
<b>E-TEST®</b>	90%	78,75%

#### 4.7. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS mecA* POSITIVOS A DOZE ANTIMICROBIANOS

Como o método E-TEST® ainda não foi padronizado para bactérias isoladas de animais, apenas para bactérias isoladas do homem (SCHWARZ et al., 2010), o perfil de susceptibilidade das dez amostras *mecA* positivas foi determinado por meio do método de ágar difusão. O resultado obtido encontra-se na Tabela 11 e o número de amostras susceptíveis e resistentes a cada antimicrobiano são apresentados na Tabela 12. A estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 utilizada como controle dos testes

apresentou zonas de inibição de crescimento para os antimicrobianos testados dentro das faixas estabelecidas pelo CLSI (2008). Das dez amostras *mecA* positivas, cinco (810, 811, 812, 831 e 903) apresentaram multirresistência, considerando-se a multirresistência como a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2010).

**Tabela 11** - Resultado do antibiograma das amostras de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à oxacilina e portadoras do gene *mecA* (n=10)

Antimicrobianos	Amostras									
	225	651	810	811	812	831	891	896	903	915
Ampicilina	R <sup>1</sup>	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Penicilina	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Oxacilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina	S <sup>2</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftiofur	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S
Gentamicina	I <sup>3</sup>	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Clindamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
Enrofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfonamida	S	S	R	R	R	R	I	S	S	I
Sulfametoxazol+Trimetoprima	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Tetraciclina	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R

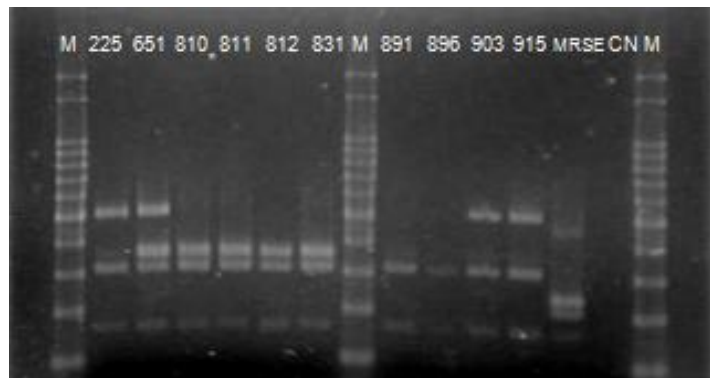
<sup>1</sup>R: Resistente; <sup>2</sup>S: Sensível; <sup>3</sup>I: Intermediário.

**Tabela 12** - Número de amostras de *Staphylococcus epidermidis mecA* positivos (n=10) susceptíveis, resistentes e com perfil intermediário a dez antimicrobianos

Antimicrobianos	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	1 (10%)	—	9 (90%)
Penicilina	1 (10%)	—	9 (90%)
Oxacilina	—	—	10 (100%)
Cefalotina	10 (100%)	—	—
Ceftiofur	8 (80%)	2 (20%)	—
Gentamicina	8 (80%)	2 (20%)	—
Clindamicina	10 (100%)	—	—
Eritromicina	6 (60%)	4 (40%)	—
Enrofloxacina	10 (100%)	—	—
Sulfonamida	4 (40%)	2 (20%)	4 (40%)
Sulfametoxazol+Trimetoprima	9 (90%)	—	1 (10%)
Tetraciclina	1 (10%)	—	9 (90%)

#### 4.8. TIPAGEM DO SCC $mec$ por PCR MULTIPLEX

Das dez amostras *mecA* positivas, três apresentaram SCC $mec$  do tipo I (225, 903 e 915), sendo uma do estado de Minas Gerais e duas de Santa Catarina, respectivamente. Quatro do tipo IV (810, 811, 812, 831) do estado do Paraná e duas do tipo V (891 e 896) do estado de Santa Catarina. Uma amostra de Minas Gerais apresentou um perfil não tipável (651). Na Figura 6 estão apresentados os perfis encontrados após a eletroforese em gel de agarose.



**Figura 6** - Foto do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos por PCR multiplex para tipagem do cassete SCC $mec$ . Tipo I: 225, 903 e 915; tipo IV: 810, 811, 812, 831; tipo V: 891 e 896; não tipável: 651. M: Marcador de peso molecular 100 pb (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500 e 2.000 pb). CN: controle negativo da reação. MRSE: *S. epidermidis* resistente à metilicina (controle positivo).

#### 4.9. ANÁLISE DO DNA CROMOSSÔMICO POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

O perfil de bandas obtido pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) das amostras de *S. epidermidis* portadoras do gene *mecA* está representado na Figura 7. A matriz de similaridade e o dendrograma construído com o auxílio do software NTSYS encontram-se na Figura 8.

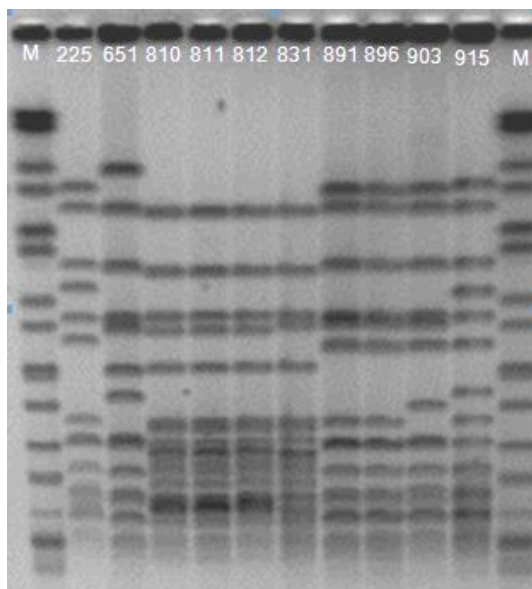
De acordo com a classificação proposta por Tenover et al. (1995), foram encontrados sete pulsotipos diferentes: A, A1, B, B1, B2, B3 e C. As amostras provenientes do estado do Paraná, 810, 811 e 812, foram classificadas como

pulsotipo A, sendo este, o pulsotipo que prevaleceu entre as amostras analisadas. A amostra 831 foi considerada estreitamente relacionada ao pulsotipo predominante, sendo classificada como A1. A diferença no padrão de bandas obtidas, neste caso, foi compatível com um único evento genético de inserção ou deleção de DNA, resultando em alterações de duas a três bandas.

As amostras 891 e 896 do estado de Santa Catarina foram consideradas indistinguíveis entre si e não relacionadas ao pulsotipo A, sendo então classificadas como pulsotipo B. Neste caso, o padrão de bandas obtido difere do pulsotipo predominante devido a três ou mais eventos genéticos independentes, resultando em sete ou mais bandas diferentes. A amostra 903 de Santa Catarina foi classificada como pulsotipo B1, considerada estreitamente relacionada ao padrão B.

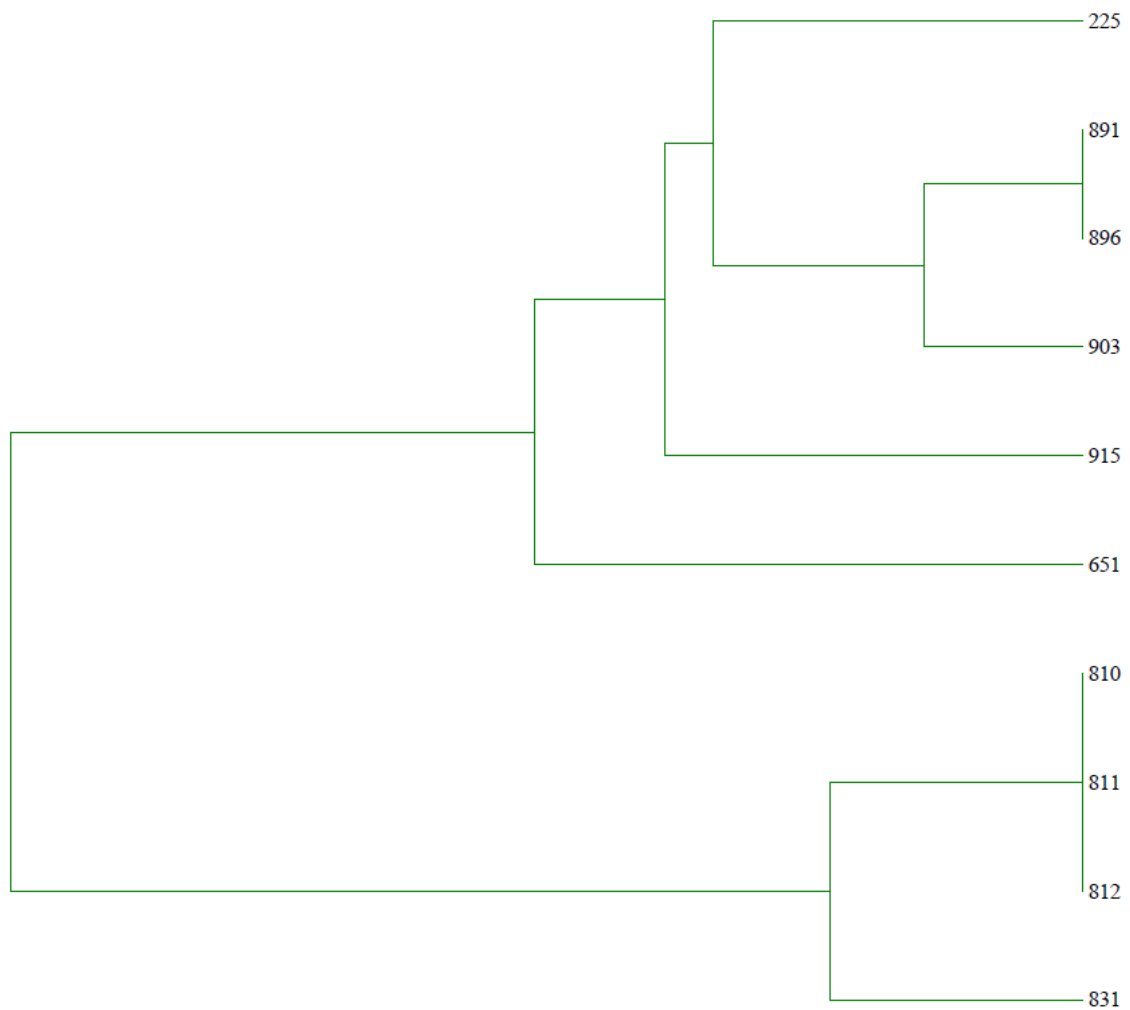
As amostras 915 do estado de Santa Catarina e 225 do estado de Minas Gerais mostraram padrões de restrição possivelmente relacionados ao pulsotipo B, sendo classificadas como pulsotipo B2 e B3, respectivamente. Os padrões observados foram compatíveis com dois eventos genéticos independentes, levando a diferenças de quatro a seis bandas.

A amostra 651, do estado de Minas Gerais, foi considerada não relacionada aos pulsotipos A e B, sendo então classificada como pulsotipo C.



**Figura 7** - Foto do gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) representando o perfil de bandas obtidas pela clivagem do DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus epidermidis* portadoras do gene *mecA* com a enzima *SmaI*. M: marcador molecular: bandas obtidas pela clivagem com *XbaI* do DNA cromossômico de *Salmonella choleraesuis* subsp. *Branderup* (H9812) (tamanho aproximado das bandas em kilobases: 20,5; 28,8; 33,3; 54,7; 78,2; 104,5; 138,9; 216,9; 244,4; 310,1; 336,5; 398,4; 452,7; 668,9; 1.135) (HUNTER et al., 2005).

Amostra	225	651	810	811	812	831	891	896	903	915
225	1,000									
651	0,667	1,000								
810	0,429	0,429	1,000							
811	0,429	0,429	1,000	1,000						
812	0,429	0,429	1,000	1,000	1,000					
831	0,462	0,538	0,867	0,867	0,867	1,000				
891	0,833	0,750	0,429	0,429	0,429	0,538	1,000			
896	0,833	0,750	0,429	0,429	0,429	0,538	1,000	1,000		
903	0,750	0,750	0,357	0,357	0,357	0,462	0,917	0,917	1,000	
915	0,800	0,640	0,414	0,414	0,414	0,444	0,800	0,800	0,720	1,000



**Figura 8** - Matriz de similaridade e dendrograma construído por meio do software NTSYS (Versão 2.21, Setauket, NY) relativo às estirpes de *Staphylococcus epidermidis* portadoras do gene *mecA*.



#### 4.10. RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA AS DEZ AMOSTRAS DE *S. epidermidis* PORTADORAS DO GENE *mecA*

Na tabela 13 encontra-se os resultados dos testes fenotípicos e moleculares para as estirpes de *S. epidermidis* portadoras do gene *mecA*. São apresentados o número da amostra, o estado de origem, a presença ou ausência do gene *mecA* e *blaZ*, o perfil de resistência a antimicrobianos (antibiotipo), o pulsotipo encontrado por meio da análise dos perfis eletroforéticos obtidos pela técnica de PFGE e o tipo do cassete estafilocócico *mec* (SCC*mec*).

**Tabela 13** - Resumos dos resultados encontrados para as dez amostras de *S. epidermidis mecA* positivas

Amostra	Estado de origem	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	Antibiotipo	Pulsotipo (PFGE)	SCC <i>mec</i>
225	MG	+	+	AMP, P, OX, TE	B3	Tipo I
651	MG	+	-	AMP, P, OX	C	Não tipável
810	PR	+	+	AMP, P, OX, E, S3, TE	A	Tipo IV
811	PR	+	+	AMP, P, OX, E, S3, TE	A	Tipo IV
812	PR	+	+	AMP, P, OX, E, S3, TE	A	Tipo IV
831	PR	+	+	AMP, P, OX, E, S3, TE	A1	Tipo IV
891	SC	+	+	AMP, P, OX, TE	B	Tipo V
896	SC	+	+	AMP, P, OX, TE	B	Tipo V
903	SC	+	+	AMP, P, OX, SXT, TE	B1	Tipo I
915	SC	+	+	AMP, P, OX, TE	B2	Tipo I

AMP: ampicilina; P: penicilina; OX: oxacilina; E: eritromicina; S3: sulfonamida; SXT: sulfametoxazol + trimetoprima; TE: tetraciclina.

## 5. DISCUSSÃO

A partir da interpretação das concentrações inibitórias mínimas obtidas no E-TEST® foi possível determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Staphylococcus* estudadas. Foi determinada também a MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, isto é, a concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

A maioria dos *S. aureus* e dos STACN estudados foram susceptíveis aos antimicrobianos testados, sendo observado um percentual mais elevado de resistência para penicilina. Resultados semelhantes foram encontrados em outros países, como Suécia (BENGTSSON et al., 2009; PERSSON et al., 2011), Estônia (KALMUS et al., 2011), França (BOTREL et al., 2010) e Iran (SAHEBEKHTIARI et al., 2011).

Observou-se que 100% dos *S. aureus* (n=79) foram susceptíveis à oxacilina, cefalotina, gentamicina, clindamicina, enrofloxacina e sulfametoxazol + trimetoprima, 98,73% à eritromicina e sulfonamida, 91,14% à tetraciclina e 69,62% à penicilina. As amostras de *S. aureus* analisadas apresentaram padrão de susceptibilidade semelhante aos relatados por Brito e colaboradores (2001) que determinaram a CIM por meio do método de diluição em ágar para 112 amostras de *S. aureus* isoladas de rebanhos leiteiros da Zona da Mata do estado de Minas Gerais.

Os percentuais de susceptibilidade das 91 amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foram 65,93% para penicilina, 70,33% para oxacilina e 89,01% para cefalotina, 93,4% para gentamicina e clindamicina, 86,81% para eritromicina 96,70% para enrofloxacina, 95,60% para sulfonamida, 97, 80% para sulfametoxazol + trimetoprima e 76,92% para tetraciclina.

A susceptibilidade das amostras *S. aureus* e de STACN foi semelhante para penicilina, enrofloxacina, sulfonamida e sulfametoxazol + trimetoprima. Entretanto, para oxacilina, cefalotina e eritromicina a susceptibilidade dos STACN foi menor ao nível de significância  $p \leq 0,01$  e para clindamicina, gentamicina e tetraciclina a susceptibilidade dos STACN foi menor ao nível de significância  $p \leq 0,05$ .

Foram encontrados poucos estudos realizados no Brasil sobre a concentração inibitória mínima e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de STACN isolados de mastite bovina. Oliveira et al. (2011) relataram o perfil de

susceptibilidade de STACN isolados de mastite bovina no estado do Pará empregando o teste de disco difusão. Apesar da diferença entre metodologias, a susceptibilidade foi semelhante à encontrada para gentamicina (91,3%), cefalotina (87%) e tetraciclina (73,9%).

Nas últimas décadas, a resistência à oxacilina em bactérias do gênero *Staphylococcus* tem sido motivo de preocupação pela possibilidade de redução na efetividade dos tratamentos de prevenção (terapia da vaca seca) e de casos clínicos da mastite.

As estirpes portadoras do gene *mecA* podem expressar a resistência à oxacilina de forma homogênea ou heterogênea. A resistência homogênea é facilmente detectada pelos testes fenotípicos padronizados, enquanto que a resistência heterogênea pode ser mais difícil de ser detectada, uma vez que apenas uma fração da população expressa o fenótipo de resistência, como por exemplo, uma em 100.000 células (CLSI, 2008). Por isto, a detecção do gene *mecA* através da técnica de PCR ou a detecção da proteína PBP-2a são reconhecidos como métodos mais precisos, sendo considerados o "padrão ouro" para identificação de uma estirpe resistente.

Nos últimos anos, institutos internacionais responsáveis pela padronização dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC), têm procurado melhorar a precisão dos testes fenotípicos para detecção de estirpes de estafilococos portadoras do gene *mecA*.

Na tentativa de aumentar a sensibilidade de detecção deste gene foram empregados neste estudo, dois oligonucleotídeos iniciadores que amplificam regiões diferentes do gene. Os iniciadores descritos por Murakami et al. (1991), que amplificam uma região de 533 pb entre as bases 1276 e 1809, e os descritos por Mehrotra, Wang e Johnson (2000) que amplificam um região de 163 pb entre as bases 1042 e 1205, de acordo com a sequência KC243783.1 depositada no GenBank.

Das 170 amostras de *Staphylococcus* analisadas neste trabalho, 31 amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foram resistentes à oxacilina em pelo menos um dos testes fenotípicos empregados. Entre estas, apenas dez amplificaram o gene *mecA* e vinte e uma não apresentaram produto de amplificação.

Todos os testes fenotípicos realizados tiveram 100% de sensibilidade, exceto o E-TEST®, com 90%. O método de difusão em ágar com disco de cefoxetina foi o mais específico (100%), seguido do método de diluição em ágar de oxacilina (80,24%), difusão em ágar com E-TEST® com oxacilina (78,75%) e disco de oxacilina (76,54%). Apesar do método E-TEST® ainda não ter sido padronizado para bactérias isoladas de animais, apenas para bactérias isoladas do homem (SCHWARZ et al., 2010), a sensibilidade e especificidade deste método foi semelhante aos testes fenotípicos de difusão e diluição em ágar com oxacilina, recomendados pelo CLSI (2008).

Para interpretação dos valores da concentração inibitória mínima de oxacilina, quanto à resistência e sensibilidade a este antimicrobiano, e para o cálculo da especificidade do método E-TEST®, as 16 amostras de STACN que apresentaram inibição de crescimento na concentração de 0,38 µg/mL foram consideradas sensíveis. Apenas a amostra 831 foi considerada resistente para o cálculo da porcentagem de susceptibilidade à oxacilina, por apresentar o gene *mecA*, conforme preconizado pelo CLSI (2008).

Rowe et al. (2002), em um estudo feito com 99 *Staphylococcus* spp. isolados do homem, apresentaram resultados semelhantes quanto à sensibilidade dos testes de difusão e diluição em ágar de oxacilina pelo método E-TEST®. Porém, diferente do resultado encontrado no presente estudo, eles encontraram especificidade de 100% nos três testes. Por outro lado, resultados de Swenson; Tenover e *Cefoxitin Disk Study Group* (2005), com 53 amostras de STACN, foram semelhantes aos encontrados nesse estudo quanto à especificidade dos métodos de diluição em ágar de oxacilina (82%), difusão em ágar com disco de oxacilina (79%) e difusão em ágar com disco de cefoxetina (96%).

Especificidade semelhante à encontrada nesse trabalho para o teste de disco difusão com cefoxetina foi relatada por Zhang et al. (2011). Outros estudos também relataram maior especificidade do teste de difusão em ágar com cefoxetina em relação aos testes fenotípicos de difusão e a diluição em ágar com oxacilina, como o realizado por Stepanovic et al. (2006) com 92 amostras de *S. sciuri*, nove de *S. lentus*, e oito de *S. vitulinus*. Eles encontraram 93,5% de sensibilidade e 100% de especificidade para o teste de difusão em ágar com disco cefoxetina. Considerando a maior especificidade do disco de cefoxetina, este teste tem sido recomendado

como alternativa à técnica de PCR para testar *S. aureus* e STACN quanto à resistência à oxacilina (ANAND et al., 2009; BSAC, 2013; CLSI, 2008).

No presente trabalho, foi encontrado o mesmo resultado na PCR para detecção do gene *mecA* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Murakami et al. (1991) e utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Mehrotra, Wang e Johnson (2000). Possivelmente, esse resultado se deve ao fato deste gene não apresentar muitas variações na sequência de DNA, tanto em estirpes isoladas de animais, quanto em estirpes isoladas do homem (TURUTOGLU et al., 2009). Porém, no estudo feito por Siripornmongcolchai et al. (2002), foram encontradas diferenças entre a sensibilidade e a especificidade da reação de PCR para detecção do gene *mecA* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Murakami e colaboradores (1991) e os descritos por DelVechio e colaboradores (1995).

A pesquisa do gene *blaZ*, que codifica para  $\beta$ -lactamase, foi realizada nas 31 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina e destas, nove *S. epidermidis mecA* positivos e sete STACN *mecA* negativos amplificaram para este gene. Um dos mecanismos possíveis para explicar a resistência à oxacilina na ausência do gene *mecA* pode ser a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases (LI et al., 2007). Outros mecanismos podem estar envolvidos na expressão da resistência à oxacilina nas amostras 835, 841, 901, 914, 916, 775, 776, 777, 782, 864, 885, 932, 947 e 948, *mecA* e *blaZ* negativas. Entre eles, citam-se a produção de uma nova meticilinase, alterações de subtipos de PBP, condições de crescimento das amostras e níveis elevados de resistência a cádmio (CHOI et al., 2003; MASSIDDA et al., 2006; TURUTOGLU et al., 2009; PARK et al., 2013). Além disto, poderia haver uma nova variável do gene *mecA* que não foi detectada por meio da PCR convencional.

O gene *mecC*, descrito recentemente por Garcia-Álvarez et al. (2011), até então, não era detectado pelos testes confirmatórios convencionais, como a técnica de PCR para detecção do gene *mecA*, e a aglutinação em látex para detecção da proteína PBP2a, criando, assim, um potencial para um diagnóstico errado e conseqüentemente uma terapia inapropriada (GUARDABASSI et al., 2013). Este gene foi encontrado em estirpes de *S. aureus*, isoladas de leite bovino, fenotipicamente resistente à oxacilina, mas que não apresentavam o gene *mecA* (GARCIA-ÁLVAREZ et al., 2011). Por este motivo, a pesquisa do gene *mecC* foi

realizada nas 21 amostras com fenótipo de resistência à oxacilina, *mecA* negativas, porém o mesmo não foi detectado.

Duas amostras fenotipicamente resistentes à oxacilina e identificadas como *S. sciuri* apresentaram um produto de amplificação na PCR com oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa do gene *mecC*. Estes produtos foram sequenciados e apresentaram 99% de similaridade com um gene homólogo ao *mecA* de estafilococos resistente à oxacilina, encontrado em todas as estirpes de *S. sciuri*. Este gene, também chamado de *mecA*-like possui 88% de similaridade na sequência geral de aminoácidos e 80% de similaridade com a sequência de DNA do gene *mecA* (COUTO et al., 2000; WU et al., 1998). A maioria das estirpes portadoras do gene *mecA*-like é susceptível aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, porém a presença deste gene juntamente com o gene *mecA* pode levar à resistência à oxacilina. Adicionalmente, uma elevada taxa de transcrição do gene *mecA*-like causada por uma alteração de um nucleotídeo ou a inserção do elemento IS256, podem levar à resistência à oxacilina (meticilina) (RAHMAN et al., 2005; Zhou et al., 2008).

Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular estão sendo empregadas para identificação de estirpes de estafilococos resistentes à oxacilina, entre elas, a macrorrestrrição do DNA cromossômico com a enzima *SmaI* seguida da eletroforese em campo pulsado (PFGE). Este método é considerado o "padrão ouro" e o mais comumente utilizado na avaliação das relações epidemiológicas para a maioria das bactérias clinicamente relevantes. Apesar de nem todas as alterações genéticas serem detectadas, a soma dos tamanhos dos fragmentos visíveis obtidos pela técnica de PFGE representa mais de 90% do genoma total bacteriano. Deste modo PFGE proporciona uma visualização global e o monitoramento do cromossomo bacteriano. Por exemplo, a perda do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*), que codifica para a resistência à meticilina, em estirpes MRSA pode ser reconhecida pelas alterações nos padrões de PFGE (GOERING, 2010; VINDEL et al., 2009).

Os métodos de tipagem devem possuir poder discriminatório relevante, boa reprodutibilidade, aplicabilidade aos organismos de interesse, facilidade de uso, e devem produzir dados que possam ser comparados entre os laboratórios de pesquisa. Com a padronização da metodologia utilizada para realização do PFGE, esta técnica vem sendo a mais comumente utilizada para estudos epidemiológicos e

investigações de surtos por bactérias do gênero *Staphylococcus* (COOKSON et al., 2007).

Neste trabalho, o método de PFGE foi utilizado na avaliação da relação existente entre as dez amostras de *S. epidermidis mecA* positivas (MRSE), originadas de diferentes municípios dos estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina.

Foram encontrados três pulsotipos (A, B e C) e quatro subtipos (A1, B1, B2 e B3), sendo o pulsotipo A e o subtipo A1 encontrado nas amostras do Paraná, o pulsotipo B e os subtipos B1 e B2 nas amostras de Santa Catarina e o subtipo B3 e o pulsotipo C nas amostras de Minas Gerais. As amostras 810 (PR), 811 (PR) e 812 (PR) classificadas como pulsotipo A, apresentaram similaridade de 100% entre si e, de 86,7% com amostra 831 (PR) do pulsotipo A1. As amostras 891 (SC) e 896 (SC) classificadas como pulsotipo B, apresentaram 100% de similaridade entre si e de 91,7%, 80%, 83,3% com as amostras 903 (SC), 915 (SC), 225 (MG) do pulsotipo B1, B2 e B3, respectivamente. A existência de pulsotipos comuns entre os MRSE sugere a disseminação geográfica dessas estirpes entre propriedades rurais do mesmo estado e entre estados diferentes (MIRAGAIA et al., 2002).

A tipagem do cassete *mec* (*SCCmec*) através da técnica de PCR é considerada referência para a definição de clones de estafilococos resistentes à oxacilina (VINDEL, 2009). Combinada com o PFGE forneceu informações sobre o perfil epidemiológico das estirpes de *S. epidermidis*. A tipagem possibilita também melhor compreensão das relações evolutivas entre os clones de estafilococos *mecA* positivos (MIRAGAIA et al., 2008; OLIVEIRA; TOMASZ; LENCASTRE, 2001).

Os três tipos de *SCCmec* (I, IV e V) encontrados já foram descritos em *Staphylococcus* spp. isolados de animais (MIRAGAIA et al., 2008; ZHANG; AGIDI; LEJEUNE, 2009). O *SCCmec* tipo IV foi encontrado em quatro *S. epidermidis* isolados em diferentes municípios do estado do Paraná. Apesar do pequeno número de amostras analisadas, é possível inferir que esta espécie pode ser um potencial reservatório de *SCCmec* tipo IV entre os estafilococos. Além disto, o tamanho relativamente menor deste cassete (20 a 24 kb) em relação aos outros tipos de *SCCmec* facilitaria a sua transferência entre as bactérias deste gênero (MIRAGAIA et al., 2008; OLIVEIRA; LENCASTRE, 2002).

Das dez amostras de MRSE, cinco foram consideradas multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos

(SCHWARZ et al., 2010):  $\beta$ -lactâmicos, eritromicina, sulfonamida e tetraciclina e  $\beta$ -lactâmicos, sulfametoxazol + trimetoprima e tetraciclina. Quatro dessas amostras oriundas do Paraná apresentaram perfis de bandas, pela técnica de PFGE, indistinguíveis entre si ou estreitamente relacionados e SCC*mec* do tipo IV. Uma das amostras, oriunda de Santa Catarina, apresentou padrão de bandas não relacionado aos perfis encontrados nas amostras do Paraná e cassete do tipo I.

As estirpes portadoras do cassete tipo IV apresentaram resistência aos antimicrobianos ampicilina, penicilina, oxacilina, eritromicina, sulfonamida e tetraciclina, o tipo V à ampicilina, penicilina, oxacilina e tetraciclina e o tipo I à ampicilina, penicilina, oxacilina, tetraciclina e em uma das amostras à sulfametoxazol + trimetoprima (Tabela 13). O conhecimento do fenótipo de resistência antimicrobiana das estirpes de MRSE circulantes em uma região é importante para que sejam adotadas medidas terapêuticas apropriadas. Este conhecimento é importante também para caracterização dos clones disseminados em determinado local ou região.

Nos estudos realizados por Juhász-Kaszanyitzky et al. (2007) e Suk-Kyung et al. (2013) foram isolados *S. aureus* resistentes à oxacilina com perfis genotípicos idênticos em amostras de leite bovino, de trabalhadores da fazenda e do meio ambiente da fazenda, sugerindo a transmissão dessas bactérias entre os animais, os seres humanos e o meio.

Além disto, a presença de estirpes de *Staphylococcus epidermidis mecA* positivas em amostras de leite bovino é um motivo de preocupação, pelo fato de ser um reservatório da resistência à oxacilina e pela possibilidade de aquisição de determinantes de resistência a outros antimicrobianos, apresentando um risco para a saúde pública (PANTOSTI, 2012).

A detecção de estirpes portadoras do novo gene *mecC*, que foram inicialmente isoladas apenas em amostras de leite bovino e que posteriormente foram encontradas em isolados clínicos de seres humanos, reforça a importância da vigilância contínua, para detectar outras estirpes em animais com características peculiares e avaliar o seu impacto sobre a saúde humana e animal.

Uma constante vigilância epidemiológica molecular é essencial para a implementação de novas iniciativas de prevenção, tratamento e controle de infecções no homem e em animais por bactérias do gênero *Staphylococcus* resistentes à oxacilina (HOLMES; ZADOKS, 2011; MENEGOTTO et al., 2012).



## 6. CONCLUSÃO

- As estirpes de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isoladas de rebanhos leiteiros dos estados de Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo apresentaram níveis altos de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados na prática veterinária, com exceção à penicilina.
- Os estafilococos coagulase-negativos foram mais resistentes à oxacilina, cefalotina, gentamicina, clindamicina, eritromicina e tetraciclina do que *S. aureus*.
- O teste de difusão em ágar com disco de cefoxetina pode ser uma alternativa à técnica de PCR para detecção do gene *mecA*.
- As estirpes de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à oxacilina (MRSE) isoladas de mastite subclínica bovina apresentaram três tipos de SCC*mec*, os tipos I, IV e V e perfis genotípicos comuns entre propriedades rurais do mesmo estado e entre estados diferentes. Os MRSE podem ser um reservatório da resistência à oxacilina para outras espécies de estafilococos, tanto do homem quanto de animais.
- Estudos que gerem informações sobre o perfil fenotípico e molecular da resistência aos antimicrobianos em espécies de estafilococos devem ser realizados para o controle da disseminação da resistência e para que medidas terapêuticas sejam escolhidas adequadamente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, H. J. M.; BOUMEDINE, K. S.; NESME, X; CLOECKAERT, A. Molecular tools for the characterization of antibiotic-resistant bacteria. **Veterinary Research**, v. 32, p. 363 - 380, 2001.
- ALLUWAIMI, A. M.; LEUTENEGGER, C. M.; FARVER, T. B.; ROSSITTO, P. V.; SMITH, W. L.; CULLOR, J. S. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. **Journal of Veterinary Medicine. Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, n. 3, p. 105 -111, 2003.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. "Basic local alignment search tool". **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n.3, p. 403 - 410, 1990.
- ANAND, K. B.; AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; KAPILA, K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27 - 29, 2009.
- BAIRD-PARKER, A. C. Classification of Staphylococci and Micrococci from world-wide sources. **Journal of General Microbiology**, v. 38, p. 363 - 387, 1965.
- BENGTSSON, B.; UNNERSTAD H. E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; ÖST, M. N.; WALLER, K. P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v.136, n. 1 - 2, p.142 -149, 2009.
- BES, M.; GUÉRIN-FAUBLÉE, V.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J; FRENEY, J. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 287- 294, 2000.
- BEZEK, D. M.; HULL, B. L. Peracute gangrenous mastitis and cheilitis associated with enterotoxin-secreting *Staphylococcus aureus* in a goat. **Canadian Veterinary Journal**, v. 36, n. 2, p.106 - 107, 1995.
- BOTREL, M. A.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J. Y.; CALAVAS, D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 479 - 487, 2010.
- BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in staphylococci and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 813 - 849, 1997.
- BRITO, M. A. V. P. Diagnóstico Microbiológico da Mastite Bovina. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 1., 2009, Belo Horizonte. Anais. Belo

Horizonte: Ciência Animal Brasileira, 2009. Suplemento 1, p. 1 -12.

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

BSAC. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 12 May 2013. British society antimicrobial chemotherapy, 2013. Disponível em: < [http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013\\_final.pdf](http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf) >. Acesso em: 20 jan. 2014.

BURVENICH, C.; PAAPE, M. J.; HILL, A. W.; GUIDRY, A. J.; MILLER, R. H.; HEYNEMAN, R.; KREMER, W. D. J.; BRAND, A. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 1, p. 45 - 50, 1994.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 29, n. 3, 2007.

CHOI, S. M.; KIM, S. H.; KIM, H. J.; LEE, D. G.; CHOI, J. H.; YOO, J. H.; KANG, J. H.; SHIN, W. S.; KANG, M. W. Multiplex PCR for detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. **Journal of Korean Medical Science**, v. 18, p. 631 - 636, 2003.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COELHO, S. M. O; REINOSO, E; PEREIRA, I. A; SOARES, L. C.; DEMO, M.; BOGNI, C.; SOUZA, M. M. S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 369 - 374, 2009.

COOKSON, B. D.; ROBINSON, D. A.; MONK, A. B.; MURCHAN, S.; DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M. J.; SCHEEL, C.; FUSSING, V.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; CUNY, C.; WITTE, W.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VINDEL, A.; GARAZAR, J.; HAEGGMAN, S.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; RANSJO, U.; MULLER-PREMUR, M.; HRYNIEWICZ, W.; ROSSNEY, A.; O'CONNELL, B.; SHORT, B. D.; THOMAS, J.; O'HANLON, S.; ENRIGHT, M. C. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: The HARMONY collection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p.1830 - 1837, 2007.

COUTO, I.; SANCHES, I. S.; SÁ-LEÃO, R.; LENCASTRE, H. Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1136 - 1143, 2000.

DEGO, O. K.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, n. 4, p. 181 - 198, 2002.

DELVECCHIO, V. G.; PETROZIELLO, J. M.; GRESS, M. J.; MCCLESKEY, F. K.; MELCHER, G. P.; CROUCH, H. K.; LUPSKI, J. R. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2141 - 2144, 1995.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*, 2012. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 29 abr. 2013.

FEBLER, A. T.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, p. 1576 - 1582, 2010.

FERREIRA, L. M.; FILHO, A. N.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, 2006.

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

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 837 - 871, 2001.

FRANCOIS, P.; RENZI, G.; PITTET, D.; LEW, D.; HARBARTH, S.; VAUDAUX, P.; SCHRENZEL, J. A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3309 - 3312, 2004.

GAO, J.; FERRERI, M.; LIU, X. Q.; CHEN, L. B.; SU, J. L.; HAN, B. Development of multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and selected antibiotic resistance genes in bovine mastitic milk samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 5, p. 894 - 901, 2011.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595 - 603, 2011.

GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S. P. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 65 - 72, 2009.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 866 - 875, 2010.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 10, p. 2945 - 2053, 1993.

GUARDABASSI, L.; LARSEN, J.; WEESE, J. S.; BUTAYE, P.; BATTISTI, A.; KLUYTMANS, J.; LLOYD, D. H.; SKOV, R. L. Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.1, p. 55 - 62, 2013.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103 - 2113, 1994.

HAVERI, M.; ROSLÖF, A.; RANTALA, L.; PYÖRÄLÄ, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 993 - 1000, 2007.

HEIKENS, E.; FLEER, A.; PAAUW, A.; FLORIJN, A.; FLUIT, A. C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2286 - 2290, 2005.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: New developments, New Zealand. **Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16 - 23, 2011.

HOGVEEN, H.; PYÖRÄLÄ, S.; WALLER, K. P.; HOGAN, J. S.; LAM, T. J. G. M.; OLIVER, S. P.; SCHUKKEN, Y. H.; BARKEMA, H. W.; HILLERTON, J. E. Current status and future challenges in mastitis research . **NMC Annual Meeting Proceedings**, p. 36 - 48, 2011.

HOLMES, M. A.; ZADOKS, R. N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal Mammary Gland Biology Neoplasia**, v. 16, p. 373 - 382, 2011.

HUNTER, S. B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M. A.; DUYNE, M. S.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D.; BARRETT, T.; RIBOT, E. Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1045 - 1050, 2005.

IKAWATY, R.; BROUWER, E. C.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus*

*aureus* isolates in the Netherlands. **International Journal of Dairy Science**, v. 5, p. 60 - 70, 2010.

ITO, T.; MA, X. X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.7, p. 2637 - 2651, 2004.

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

JAFFE, R. I.; LANE, J. D.; ALBURY, S. V.; NIEMEYER, D. M. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci with the PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3407 - 3412, 2000.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E.; JÁNOSI, S.; SOMOGYI, P.; DÁN, A.; BLOOIS, L. V. D. G.; DUIJKEREN, E. V.; WAGENAAR, J. A. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, 2007.

KAISER, T. D. L.; PACHECO, F. C.; LIMA, A. A.; PEREIRA, E. M.; SANTOS, K. R. N.; NUNES, A. P. F. Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação da suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp., isoladas de um hospital de Vitória, Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n. 3, p. 298 - 303, 2010.

KALMUS, P.; AASMÄE, B.; KÄRSSIN, A.; ORRO, T.; KASK, K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 4, 2011.

KAMPEN, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1578 - 583, 2005.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 204 - 216, 2012.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, 2011.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F.; LISTONI, F. J. P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, p. 507- 515, 1991.

LI, S.; SKOV, R. L.; HAN, X.; LARSEN, A. R.; LARSEN, J.; SORUM, M.; WULF, M. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in

clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, 2011.

LI, X.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 197 - 214, 2007.

LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; ABREU, L. R. D.; NETO, A. F. Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)**, v. 78, n. 4, p. 493 - 499, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12<sup>a</sup> ed., Artmed, 2010.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3466 - 3472, 2003.

MASSIDDA, O.; MINGOIA, M.; FADDA, D.; WHALEN, M. B.; MONTANARI M. P.; VARALDO, P. E. Analysis of the  $\beta$ -lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on *bla* complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. **Plasmid**, v. 55, p. 114 - 127, 2006.

MCDUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.11, p. 5113 - 5120, 2003.

MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JR., J. W.; TELES, J. A. A. Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 569 - 574, 2009.

MEHROTRA, M., WANG, G., JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032 - 1035, 2000.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v. 171, n.3, p. 398 - 407, 2006.

MENEGOTTO, F.; GONZÁLEZ-CABRERO, S.; LORENZO, B.; CUBERO, A.; CUERVO, W.; GUTIÉRREZ, M. P.; SIMARRO, M.; ORDUNA, A.; BRATOS, M. I. A. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital over a 4-year period: clonal replacement, decreased antimicrobial resistance, and identification of community-acquired and livestock associated clones. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, p. 332 - 337, 2012.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3374 - 3377, 2007.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 399 - 406, 2007.

MIRAGAIA, M.; CARRIÇO, J. A.; THOMAS, J. C.; COUTO, I.; ENRIGHT, M. C.; LENCASTRE, H. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n.1, p. 118 - 129, 2008.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PEREIRA, S. F. F.; KRISTINSSON, K. G.; WESTH, H.; JARLØV, J. O.; CARRIÇO, J.; ALMEIDA, J.; SANCHES, I. S.; DE LENCASTRE, H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 430 - 438, 2002.

MORK, T.; JORGENSEN, H. J.; SUNDE, M.; KVITILE, B.; SVILAND, S.; WAAGE, S.; TOLLERSRUD, T. Persistence of Staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. **Veterinary Microbiology**, v.159, p. 171 - 180, 2012.

MORK, T.; TOLLERSRUD, T.; JORGENSEN, H. J.; KVITILE, B.; WAAGE, S. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Norway. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 65 -73, 2005.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 10, 1991.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. v. 1, 8th ed., ASM Press, 2003.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6ª ed., Elsevier, 2009.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4. ed. Verona: NMC, 2004. 47 p.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; THRUSFIELD, M. V.; GRAAT, E. A. M. **Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology**. 2th ed., Wageningen Pers, 2001.

NTSYS (Versão 2.21, Exeter Software, Setauket, NY) **Greenacre, M. J.** 1984. Theory and applications of correspondence analysis. Academic Press, London, United Kingdom.



OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina em rebanhos leiteiros na região de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104 - 110, 2011.

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n.7, p. 2155 - 2161, 2002.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 4, 2001.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L. M.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1-2, p. 133 - 140, 2006.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 165 - 185, 2012.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. M.; JAYARAO, B. M. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: A comprehensive review. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 3, p. 337 - 355, 2011.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. 3, Article127, p. 1 - 12, 2012.

PARK, J.; FRIENDSHIP, R. M.; WEESE, J. S.; POLJAK, Z.; DEWEY, C. E. Park An investigation of resistance to  $\beta$ -lactam antimicrobials among staphylococci isolated from pigs with exudative epidermitis. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 211, p. 1 - 8, 2013.

PERSSON, Y.; NYMAN, A. K.; GRONLUND-ANDERSSON, U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 36, 2011.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative *staphylococci* in human disease. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1 - 2, p. 45 - 54, 2009.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative *staphylococci*-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, v. 1 - 2, p. 3 - 8, 2009.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; HARTIGAN, P.; FANNING, S.; FITZPATRICK, E. S. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, 2011.

RAHMAN, M. T., KOBAYASHI, N.; ALAM, M. M.; MASAHO, I. Genetic analysis of *meca* homologues in *Staphylococcus sciuri* strains derived from mastitis in dairy cattle. **Microbial Drug Resistance**, v.11, n. 3, p. 205 - 214, 2005.

RICE, L. B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, 2006.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 61 - 70, 2002.

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

RUEGG, P. L. Mastitis in dairy cows. **The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice** (Preface), v. 28, n.2, p. xi-xii, 2012a.

RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 149 - 163, 2012b.

SAHEBEKHTIARI, N.; NOCHI, Z.; ESLAMPOUR, M. A.; DABIRI, H.; BOLFION, M.; TAHERIKALANI, M.; KHORAMIAN, B.; ZALI, M. R.; EMANEINI, M. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 58, n. 2, p. 113 - 121, 2011.

SAMPIMON, O. C.; BARKEMA, H. W.; BERENDS, I. M. G. A.; SOL, J.; LAM, T. J. G. M. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 37 - 44, 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 74, p. 5463 - 5467, 1977.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.

SANTOS, O. C. S.; BARROS, E. M.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, M. C. F.; SANTOS, K. R. N.; DE MARVAL, M. G. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the *groEL* gene. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 134 -140, 2008.

SCHNELLMANN, C.; GERBER, V.; ROSSANO, A.; JAQUIER, V.; PANCHAUD Y.; DOHERR, M. G.; THOMANN, A.; STRAUB, R.; PERRETEN, V. Presence of new *mecA* and *mph(c)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4444 - 4454, 2006.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601 - 604, 2010.

SILVA, E. C. B. F.; MACIEL, M. A. V.; MELO, F. L.; ANTAS, M. G. C.; NETO, A. M. B.; RABELO, M. A. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 52, n. 2, p.168 - 172, 2007.

SIRIPORNMONGCOLCHAI, T.; CHOMVARIN, C.; CHAICUMPAR, K.; LIMPAIBOON T.; WONGKHUM, C. Evaluation of different primers for detecting *mecA* gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 33, n. 4, p. 758 - 763, 2002.

SMITH, E. M.; GREEN, L. E.; MEDLEY, G. F.; BIRD, H. E.; FOX, L. K.; SCHUKKEN, Y. H.; KRUIZE, J. V.; BRADLEY, A. J.; ZADOKS, R.; DOWSON, C. G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4737 - 4743, 2005.

SOARES, L. D. C.; PEREIRA, I. A.; MOREIRA, M.; SOUZA, S. D. 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**, p. 195 - 200, 2007.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p.1015 - 1020, 2009.

STEPANOVIC, S.; HAUSCHILD, T.; DAKIĆ, I.; AL-DOORI, Z.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M.; RANIN, L.; MORRISON, D. Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 934 - 937, 2006.

SUK-KYUNG, L.; HYANG-MI, N.; GUM-CHAN, J.; HEE-SOO, L.; SUK-CHAN, J.; TAE-SUN, K. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment, and workers in dairy cattle farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 8, 2013.

SWENSON, J. M.; BRASSO, W. B.; FERRARO, M. J.; HARDY, D. J.; KNAPP, C. C.; LONSWAY, D., MCALLISTER, S.; RELLER, L. B.; SADER, H. S.; SHORTRIDGE, D.; SKOV, R.; WEINSTEIN, M. P.; ZIMMER, B. L.; PATEL, J. B. Correlation of cefoxitin

MICs with the presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1902 - 1905, 2009.

SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C. AND THE CEFOXITIN DISK STUDY GROUP. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3818 - 3823, 2005.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n. 9, p. 2233 - 2239, 1995.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 175 - 178.

TSUBAKISHITA, S.; KUWAHARA-ARAI, K.; SASAKI, T.; HIRAMATSU, K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4352 - 4359, 2010.

TURUTOGLU, H.; HASOKSUZ, M.; OZTURK, D.; YILDIRIM, M.; SAGNAK, S. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 8, p. 945 - 56, 2009.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 1 - 2, p.179 - 185, 2003.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486 - 493, 2009.

VINDEL, A.; CUEVAS, O.; CERCENADO, E.; MARCOS, C.; BAUTISTA, V.; CASTELLARES, C.; TRINCADO, P.; BOQUETE, T.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M.; MARÍN, M.; BOUZA, E. AND THE SPANISH GROUP FOR THE STUDY OF *Staphylococcus*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1620 - 1627, 2009.

WALSH, E. J.; MIAJLOVIC, H.; GORKUN, O. V.; FOSTER, T. J. Identification of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the  $\alpha$ C-domain of human fibrinogen. **Microbiology**, v. 154, p. 550 - 558, 2008.

WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R. M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 148 - 152, 2012.

WOOLDRIDGE, M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals and transmission of

antibiotic. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 31, n.1, p. 231 - 247, 2012.

WU, S.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Genetic organization of the *mecA* region in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus sciuri*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n. 2, p. 236 - 242, 1998.

ZHANG, Y.; AGIDI, S; LEJEUNE, J. T. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1375 - 1383, 2009.

ZHANG, Y.; WANG, X.; LEJEUNE, J. T.; ZERVOS, M.; BHARGAVA, K. Comparison of phenotypic methods in predicting methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) from animals. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 23 - 25, 2011.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 57 - 65, 2008.

ZHOU, Y.; ANTIGNAC, A.; WU, S. W.; TOMASZ, A. Penicillin-Binding Proteins and Cell Wall Composition in  $\beta$ -Lactam-Sensitive and -Resistant Strains of *Staphylococcus sciuri*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 2, p. 508 - 514, 2008.

ZSCHÖCK, M.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; HAMANN, H.P.; LÄMMLER, C. H. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.108, n. 3 - 4, p. 243 - 249, 2005.

**APÊNDICE A - RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DE 170 AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE LEITE BOVINO (STACN: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos).**

(Continua)

Amostra	Estado de origem	CIM µg/mL	Oxacilina		Cefoxetina		Identificação
			mm	Resultado	mm	Resultado	
225	MG	0,5	0	R	19	R	STACN
262	MG	0,25	28	S	34	S	<i>S. aureus</i>
507	MG	0,5	13	S	29	S	STACN
651	MG	0,5	14	S	21	R	STACN
806	PR	0,125	23	S	32	S	STACN
807	PR	0,125	24	S	32	S	STACN
808	PR	0,25	22	S	33	S	STACN
809	PR	0,25	20	S	30	S	STACN
810	PR	0,5	14	R	25	S	STACN
811	PR	0,5	17	R	25	S	STACN
812	PR	0,5	15	R	24	R	STACN
813	PR	0,25	24	S	28	S	<i>S. aureus</i>
814	PR	0,25	25	S	29	S	<i>S. aureus</i>
815	PR	0,25	23	S	29	S	<i>S. aureus</i>
816	PR	0,125	29	S	34	S	STACN
817	PR	0,125	23	S	30	S	<i>S. aureus</i>
818	PR	0,125	28	S	32	S	STACN
819	PR	0,25	21	S	28	S	<i>S. aureus</i>
820	PR	0,25	25	S	29	S	<i>S. aureus</i>
821	PR	0,125	30	S	36	S	STACN
822	PR	0,25	21	S	30	S	STACN
823	PR	0,125	30	S	32	S	STACN
824	PR	0,125	26	S	29	S	<i>S. aureus</i>
825	PR	0,25	19	S	32	S	STACN
826	PR	0,25	24	S	32	S	<i>S. aureus</i>
827	PR	0,25	25	S	32	S	<i>S. aureus</i>
828	PR	0,125	25	S	33	S	STACN
829	PR	0,25	24	S	32	S	<i>S. aureus</i>
830	PR	0,25	24	S	30	S	STACN
831	PR	0,5	15	R	24	R	STACN
832	PR	0,25	22	S	30	S	STACN
755	SC	0,25	24	S	31	S	<i>S. aureus</i>
756	SC	0,25	23	S	30	S	<i>S. aureus</i>
757	SC	0,25	18	S	30	S	<i>S. aureus</i>

**APÊNDICE A - RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DE 170 AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA (STACN: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos).**

(Continua)

Amostra	Estado de origem	CIM µg/mL	Oxacilina		Cefoxetina		Identificação
			mm	Resultado	mm	Resultado	
758	SC	0,25	23	S	30	S	<i>S. aureus</i>
759	SC	0,25	20	S	30	S	<i>S. aureus</i>
760	SC	0,25	20	S	30	S	<i>S. aureus</i>
761	SC	0,5	18	S	30	S	<i>S. aureus</i>
762	SC	0,5	20	S	30	S	<i>S. aureus</i>
763	SC	0,25	25	S	30	S	<i>S. aureus</i>
764	SC	0,25	24	S	30	S	<i>S. aureus</i>
803	SC	0,5	17	S	28	S	<i>S. aureus</i>
804	SC	0,25	23	S	29	S	<i>S. aureus</i>
805	SC	0,125	22	S	28	S	<i>S. aureus</i>
833	SC	0,25	27	S	37	S	STACN
834	SC	0,25	21	S	31	S	STACN
835	SC	1	13	R	25	S	STACN
836	SC	0,25	25	S	39	S	STACN
837	SC	0,25	24	S	35	S	STACN
838	SC	0,125	24	S	30	S	STACN
839	SC	0,25	23	S	38	S	STACN
840	SC	0,5	28	S	36	S	STACN
841	SC	0,125	16	R	33	S	STACN
842	SC	0,25	28	S	32	S	STACN
843	SC	0,125	20	S	30	S	<i>S. aureus</i>
844	SC	0,5	25	S	39	S	STACN
845	SC	0,125	18	S	30	S	<i>S. aureus</i>
846	SC	0,25	30	S	38	S	STACN
847	SC	0,25	25	S	37	S	STACN
848	SC	0,25	20	S	32	S	STACN
849	SC	0,25	21	S	34	S	STACN
850	SC	0,125	22	S	32	S	STACN
851	SC	0,125	23	S	38	S	STACN
852	SC	0,125	27	S	39	S	STACN
891	SC	0,5	0	R	19	R	STACN
892	SC	0,25	17	R	36	S	STACN
893	SC	0,25	19	S	36	S	STACN
894	SC	0,5	19	S	29	S	<i>S. aureus</i>

**APÊNDICE A - RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DE 170 AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA (STACN: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos).**

(Continua)

Amostra	Estado de origem	CIM µg/mL	Oxacilina		Cefoxetina		Identificação
			mm	Resultado	mm	Resultado	
896	SC	0,5	0	R	19	R	STACN
897	SC	0,125	20	S	37	S	STACN
898	SC	0,25	17	R	37	S	STACN
899	SC	0,5	17	S	30	S	<i>S. aureus</i>
900	SC	0,125	24	S	39	S	STACN
901	SC	0,5	13	R	29	S	STACN
902	SC	0,125	22	S	35	S	STACN
903	SC	0,5	10	R	19	R	STACN
904	SC	0,125	21	S	34	S	STACN
905	SC	0,125	24	S	33	S	STACN
906	SC	0,125	28	S	39	S	STACN
907	SC	0,125	26	S	29	S	<i>S. aureus</i>
908	SC	0,125	23	S	38	S	STACN
909	SC	0,125	28	S	37	S	STACN
911	SC	0,125	25	S	29	S	<i>S. aureus</i>
914	SC	0,5	0	R	29	S	STACN
915	SC	0,5	0	R	0	R	STACN
916	SC	0,5	14	R	32	S	STACN
917	SC	0,125	30	S	35	S	STACN
765	SP	0,125	25	S	33	S	<i>S. aureus</i>
766	SP	0,125	26	S	35	S	<i>S. aureus</i>
767	SP	0,125	26	S	34	S	<i>S. aureus</i>
768	SP	0,125	29	S	35	S	<i>S. aureus</i>
769	SP	0,125	28	S	35	S	<i>S. aureus</i>
770	SP	0,125	27	S	34	S	<i>S. aureus</i>
771	SP	0,125	26	S	33	S	<i>S. aureus</i>
773	SP	0,125	28	S	32	S	STACN
775	SP	0,5	13	R	32	S	STACN
776	SP	0,5	15	R	35	S	STACN
777	SP	0,5	15	R	35	S	STACN
779	SP	0,25	26	S	37	S	STACN
780	SP	0,125	27	S	32	S	STACN
782	SP	0,5	14	R	32	S	STACN
783	SP	0,125	28	S	35	S	<i>S. aureus</i>



**APÊNDICE A - RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DE 170 AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA (STACN: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos).**

(Continua)

Amostra	Estado de origem	CIM µg/mL	Oxacilina		Cefoxetina		Identificação
			mm	Resultado	mm	Resultado	
784	SP	0,25	17	S	27	S	<i>S. aureus</i>
785	SP	0,125	22	S	36	S	STACN
786	SP	0,125	23	S	37	S	STACN
787	SP	0,125	26	S	35	S	<i>S. aureus</i>
853	SP	0,125	24	S	31	S	<i>S. aureus</i>
854	SP	0,125	22	S	32	S	<i>S. aureus</i>
855	SP	0,125	23	S	35	S	<i>S. aureus</i>
856	SP	0,125	20	S	27	S	<i>S. aureus</i>
857	SP	0,125	25	S	28	S	<i>S. aureus</i>
858	SP	0,0625	15	S	28	S	<i>S. aureus</i>
859	SP	0,0625	25	S	30	S	<i>S. aureus</i>
860	SP	0,0625	28	S	29	S	STACN
862	SP	0,125	22	S	35	S	STACN
864	SP	0,5	12	R	26	S	STACN
865	SP	0,125	27	S	31	S	<i>S. aureus</i>
866	SP	0,125	26	S	32	S	<i>S. aureus</i>
867	SP	0,0625	27	S	32	S	<i>S. aureus</i>
868	SP	0,0625	29	S	35	S	<i>S. aureus</i>
869	SP	0,125	25	S	32	S	<i>S. aureus</i>
870	SP	0,125	27	S	30	S	<i>S. aureus</i>
871	SP	0,25	24	S	30	S	<i>S. aureus</i>
872	SP	0,25	25	S	34	S	<i>S. aureus</i>
873	SP	0,125	28	S	35	S	<i>S. aureus</i>
874	SP	0,125	22	S	33	S	<i>S. aureus</i>
877	SP	0,25	25	S	30	S	<i>S. aureus</i>
878	SP	0,125	27	S	29	S	<i>S. aureus</i>
879	SP	0,125	29	S	33	S	<i>S. aureus</i>
880	SP	0,25	25	S	30	S	<i>S. aureus</i>
881	SP	0,25	27	S	30	S	<i>S. aureus</i>
882	SP	0,25	24	S	30	S	<i>S. aureus</i>
883	SP	0,25	22	S	30	S	STACN
884	SP	0,25	21	S	30	S	STACN
885	SP	0,5	17	R	30	S	STACN
886	SP	0,125	22	S	31	S	STACN

**APÊNDICE A - RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OXACILINA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR E DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À OXACILINA E À CEFOXETINA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR DE 170 AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA (STACN: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos).**

(Conclusão)

Amostra	Estado de origem	CIM µg/mL	Oxacilina		Cefoxetina		Identificação
			mm	Resultado	mm	Resultado	
887	SP	0,125	21	S	30	S	STACN
888	SP	0,125	22	S	30	S	STACN
889	SP	0,125	20	S	31	S	STACN
918	SP	0,125	25	S	35	S	<i>S. aureus</i>
919	SP	0,125	29	S	35	S	<i>S. aureus</i>
920	SP	0,125	27	S	35	S	<i>S. aureus</i>
921	SP	0,125	27	S	32	S	<i>S. aureus</i>
922	SP	0,125	28	S	33	S	<i>S. aureus</i>
923	SP	0,25	29	S	33	S	<i>S. aureus</i>
924	SP	0,25	29	S	31	S	<i>S. aureus</i>
925	SP	0,5	17	R	32	S	STACN
926	SP	0,125	22	S	32	S	STACN
927	SP	0,125	23	S	37	S	STACN
928	SP	0,25	27	S	33	S	<i>S. aureus</i>
929	SP	0,25	25	S	39	S	STACN
931	SP	0,25	18	S	33	S	STACN
932	SP	0,5	16	R	27	S	STACN
933	SP	0,125	24	S	36	S	STACN
934	SP	0,125	21	S	32	S	STACN
935	SP	0,125	19	S	33	S	STACN
936	RS	0,25	28	S	33	S	<i>S. aureus</i>
937	RS	0,125	21	S	31	S	STACN
938	RS	0,25	24	S	32	S	<i>S. aureus</i>
939	RS	0,125	14	R	31	S	STACN
940	RS	0,5	22	S	30	S	<i>S. aureus</i>
941	RS	0,25	21	S	26	S	<i>S. aureus</i>
942	RS	0,5	22	S	27	S	<i>S. aureus</i>
943	RS	0,25	22	S	29	S	STACN
944	RS	0,25	24	S	27	S	<i>S. aureus</i>
945	RS	0,25	18	S	28	S	<i>S. aureus</i>
946	RS	0,25	24	S	30	S	<i>S. aureus</i>
947	PE	0,5	15	R	27	S	STACN
948	PE	0,25	14	R	26	S	STACN
949	PE	0,125	23	S	35	S	STACN

**APÊNDICE B - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

(Continua)

Amostras	PG		OX		CE		GM		CM		EM		EF		SX		TS		TC	
225	4	R	0,75	R	12	R	6	I	0,032	S	0,047	S	0,094	S	64	S	0,064	S	24	R
262	0,19	R	0,094	S	0,064	S	0,38	S	0,016	S	0,064	S	0,094	S	6	S	0,23	S	0,125	S
507	0,5	R	0,38	S	0,25	S	0,016	S	0,032	S	0,047	S	0,094	S	12	S	0,027	S	0,19	S
651	0,064	R	0,75	R	0,19	R	0,125	S	0,032	S	0,064	S	0,094	S	96	S	0,047	S	1,5	S
806	0,094	S	0,094	S	0,047	S	0,094	S	0,016	S	0,047	S	0,094	S	1,5	S	0,008	S	0,064	S
807	0,016	S	0,094	S	0,047	S	0,125	S	0,016	S	0,064	S	0,094	S	1,5	S	0,016	S	0,125	S
808	0,016	S	0,19	S	0,047	S	0,094	S	0,032	S	0,094	S	0,047	S	4	S	0,047	S	0,125	S
809	0,19	R	0,125	S	0,094	S	0,016	S	0,016	S	48	R	0,064	S	24	S	0,094	S	0,094	S
810	0,38	R	0,75	R	0,19	R	0,094	S	0,023	S	16	R	0,094	S	384	R	0,047	S	128	R
811	0,5	R	0,5	R	0,125	R	0,094	S	0,032	S	12	R	0,125	S	192	S	0,047	S	96	R
812	0,5	R	0,5	R	0,19	R	0,094	S	0,032	S	12	R	0,125	S	128	S	0,047	S	96	R
813	0,012	S	0,064	S	0,064	S	0,5	S	0,047	S	0,125	S	0,125	S	6	S	0,023	S	0,094	S
814	0,012	S	0,094	S	0,125	S	0,75	S	0,016	S	0,064	S	0,125	S	4	S	0,032	S	0,38	S
815	0,012	S	0,125	S	0,064	S	0,5	S	0,032	S	0,094	S	0,094	S	6	S	0,032	S	0,094	S
816	0,047	S	0,094	S	0,047	S	0,094	S	0,032	S	0,047	S	0,094	S	4	S	0,012	S	0,094	S
817	0,016	S	0,125	S	0,094	S	0,5	S	0,016	S	0,125	S	0,094	S	8	S	0,032	S	0,19	S
818	0,047	S	0,047	S	0,032	S	0,064	S	0,023	S	0,047	S	0,125	S	1,5	S	0,008	S	0,094	S
819	0,25	R	0,125	S	0,125	S	0,19	S	0,016	S	0,047	S	0,19	S	4	S	0,016	S	0,25	S
820	0,012	S	0,094	S	0,094	S	0,75	S	0,023	S	0,125	S	0,125	S	6	S	0,023	S	0,125	S
821	0,006	S	0,032	S	0,032	S	0,125	S	0,032	S	0,094	S	0,094	S	3	S	0,016	S	0,125	S
822	0,25	R	0,19	S	0,064	S	0,023	S	0,023	S	0,094	S	0,064	S	2	S	0,032	S	16	R
823	0,064	S	0,064	S	0,047	S	0,094	S	0,016	S	0,047	S	0,064	S	1,5	S	0,008	S	0,19	S
824	0,008	S	0,125	S	0,064	S	0,38	S	0,016	S	0,094	S	0,19	S	6	S	0,023	S	0,19	S
825	0,023	S	0,125	S	0,064	S	0,094	S	0,016	S	0,047	S	0,094	S	16	S	0,094	S	0,094	S

**APÊNDICE B - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

(Continua)

Amostras	PG		OX		CE		GM		CM		EM		EF		SX		TS		TC	
826	0,047	S	0,19	S	0,064	S	0,094	S	0,016	S	0,094	S	0,125	S	3	S	0,032	S	0,125	S
827	0,023	S	0,094	S	0,064	S	0,094	S	0,016	S	0,094	S	0,094	S	4	S	0,023	S	0,094	S
828	0,094	S	0,19	S	0,064	S	0,19	S	0,023	S	0,125	S	0,125	S	48	S	0,094	S	0,125	S
829	0,016	S	0,125	S	0,064	S	0,094	S	0,016	S	0,047	S	0,125	S	2	S	0,012	S	0,125	S
830	0,016	S	0,094	S	0,094	S	0,5	S	0,047	S	0,094	S	0,125	S	12	S	0,032	S	0,125	S
831	0,38	R	0,38	S	0,19	R	0,094	S	0,032	S	12	R	0,125	S	256	S	0,047	S	64	R
832	0,023	S	0,19	S	0,094	S	0,064	S	0,047	S	0,094	S	0,19	S	2	S	0,047	S	0,38	S
755	0,38	R	0,19	S	0,125	S	0,5	S	0,016	S	0,064	S	0,125	S	8	S	0,032	S	0,094	S
756	0,023	S	0,094	S	0,064	S	0,38	S	0,047	S	0,094	S	0,047	S	3	S	0,012	S	0,094	S
757	0,75	R	0,38	S	0,19	S	0,38	S	0,016	S	0,094	S	0,094	S	4	S	0,023	S	0,125	S
758	0,032	S	0,094	S	0,094	S	0,38	S	0,023	S	0,125	S	0,19	S	6	S	0,023	S	0,125	S
759	0,012	S	0,125	S	0,125	S	0,38	S	0,064	S	0,125	S	0,25	S	12	S	0,023	S	0,125	S
760	0,75	R	0,38	S	0,25	S	0,38	S	0,094	S	0,125	S	0,19	S	12	S	0,032	S	12	R
761	0,75	R	0,25	S	0,19	S	0,19	S	0,023	S	0,094	S	0,38	S	8	S	0,023	S	8	I
762	0,75	R	0,38	S	0,19	S	0,5	S	0,047	S	0,094	S	0,19	S	6	S	0,047	S	0,25	S
763	0,016	S	0,125	S	0,094	S	0,38	S	0,032	S	0,125	S	0,25	S	4	S	0,023	S	0,125	S
764	0,023	S	0,19	S	0,064	S	0,5	S	0,023	S	0,125	S	0,125	S	32	S	0,064	S	0,094	S
803	10	R	0,5	S	0,25	S	0,5	S	0,047	S	0,094	S	0,19	S	6	S	0,032	S	0,25	S
804	0,032	S	0,19	S	0,125	S	0,5	S	0,064	S	0,125	S	0,125	S	24	S	0,047	S	0,19	S
805	0,38	R	0,25	S	0,19	S	0,5	S	0,032	S	0,19	S	0,19	S	6	S	0,023	S	0,25	S
833	0,064	S	0,047	S	0,064	S	0,19	S	0,047	S	0,064	S	0,064	S	12	S	0,012	S	0,125	S
834	0,25	R	0,19	S	0,125	S	0,047	S	0,016	S	0,094	S	0,047	S	1024	R	0,5	S	0,75	S
835	0,064	S	1	R	0,25	S	0,064	S	0,19	S	0,047	S	0,25	S	4	S	0,064	S	0,5	S
836	0,023	S	0,19	S	0,064	S	0,047	S	0,047	S	0,094	S	0,064	S	32	S	0,094	S	0,094	S

**APÊNDICE B - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

(Continua)

Amostras	PG		OX		CE		GM		CM		EM		EF		SX		TS		TC	
837	0,012	S	0,25	S	0,064	S	0,094	S	0,032	S	0,064	S	0,094	S	12	S	0,047	S	0,19	S
838	0,19	R	0,19	S	0,047	S	0,19	S	0,023	S	0,094	S	0,094	S	1,5	S	0,016	S	0,25	S
839	0,064	S	0,064	S	0,032	S	0,047	S	0,047	S	0,064	S	0,064	S	4	S	0,023	S	0,047	S
840	0,032	S	0,094	S	0,064	S	0,094	S	0,023	S	0,064	S	0,38	S	6	S	0,023	S	0,125	S
841	0,032	S	1	R	0,38	S	0,016	S	0,075	S	0,125	S	0,5	S	12	S	0,094	S	0,5	S
842	0,008	S	0,064	S	0,047	S	0,125	S	0,016	S	0,023	S	0,064	S	12	S	0,094	S	0,094	S
843	1,5	R	0,38	S	0,38	S	0,5	S	0,064	S	0,19	S	0,25	S	24	S	0,047	S	12	R
844	0,047	S	0,125	S	0,032	S	0,064	S	0,023	S	0,047	S	0,094	S	12	S	0,047	S	0,064	S
845	1,5	R	0,5	S	0,19	S	0,5	S	0,064	S	0,125	S	0,19	S	4	S	0,023	S	0,38	S
846	0,064	S	0,064	S	0,047	S	0,19	S	0,023	S	0,064	S	0,094	S	1	S	0,006	S	0,094	S
847	0,012	S	0,19	S	0,094	S	0,19	S	0,032	S	0,064	S	0,094	S	6	S	0,047	S	0,25	S
848	0,19	R	0,025	S	0,19	S	0,047	S	0,016	S	0,094	S	0,094	S	1024	R	0,38	S	0,75	S
849	0,25	R	0,38	S	0,064	S	0,064	S	0,094	S	0,094	S	0,125	S	6	S	0,047	S	0,125	S
850	0,25	R	0,25	S	0,125	S	0,19	S	0,032	S	0,064	S	0,094	S	6	S	0,023	S	32	R
851	0,016	S	0,19	S	0,064	S	0,094	S	0,023	S	0,094	S	0,047	S	6	S	0,023	S	0,19	S
852	0,006	S	0,125	S	0,047	S	0,032	S	0,19	S	0,047	S	0,047	S	6	S	0,023	S	0,064	S
891	8	R	1,5	R	0,19	R	8	I	0,047	S	0,094	S	0,125	S	128	S	0,064	S	32	R
892	0,38	R	0,25	S	0,094	S	0,094	S	0,064	S	0,094	S	0,094	S	16	S	0,047	S	0,094	S
893	0,25	R	0,19	S	0,032	S	0,047	S	0,047	S	0,094	S	0,125	S	6	S	0,023	S	0,032	S
894	1	R	0,38	S	0,25	S	0,38	S	0,047	S	0,094	S	0,19	S	8	S	0,023	S	0,19	S
896	32	R	2	R	0,19	R	8	I	0,032	S	0,064	S	0,094	S	192	S	0,064	S	32	R
897	0,125	S	0,38	S	0,064	S	0,094	S	0,047	S	0,064	S	0,094	S	8	S	0,047	S	0,094	S
898	0,25	R	0,5	R	0,094	S	0,047	S	0,032	S	0,064	S	0,064	S	12	S	0,047	S	0,094	S
899	4	R	0,38	S	0,125	S	0,38	S	0,047	S	0,19	S	0,094	S	6	S	0,023	S	0,125	S

**APÊNDICE B - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

(Continua)

Amostras	PG		OX		CE		GM		CM		EM		EF		SX		TS		TC	
900	0,012	S	0,19	S	0,032	S	0,047	S	0,094	S	0,064	S	0,125	S	12	S	0,047	S	0,125	S
901	0,25	R	0,75	R	0,25	S	0,023	S	0,047	S	0,094	S	0,25	S	12	S	0,032	S	0,5	S
902	0,094	S	0,094	S	0,064	S	0,094	S	0,064	S	0,047	S	0,064	S	6	S	0,023	S	0,094	S
903	0,75	R	1	R	0,25	R	6	I	0,023	S	0,047	S	0,125	S	128	S	3	I	48	R
904	0,25	R	0,25	S	0,047	S	0,094	S	0,047	S	0,094	S	0,094	S	8	S	0,047	S	0,125	S
905	0,016	S	0,19	S	0,032	S	0,094	S	0,016	S	0,094	S	0,125	S	6	S	0,023	S	12	R
906	0,094	S	0,064	S	0,032	S	0,094	S	0,047	S	0,094	S	0,25	S	4	S	0,012	S	0,094	S
907	0,032	S	0,094	S	0,094	S	0,38	S	0,016	S	0,125	S	0,125	S	48	S	0,064	S	0,125	S
908	0,064	S	0,19	S	0,047	S	0,094	S	0,094	S	0,064	S	0,125	S	12	S	0,023	S	0,19	S
909	0,064	S	0,064	S	0,023	S	0,047	S	0,047	S	0,064	S	0,094	S	3	S	0,012	S	0,125	S
911	0,023	S	0,19	S	0,064	S	0,25	S	0,064	S	0,094	S	0,19	S	4	S	0,023	S	0,19	S
914	0,016	S	0,19	S	0,047	S	0,094	S	0,125	S	0,094	S	0,125	S	16	S	0,125	S	0,25	S
915	3	R	1,5	R	0,19	R	6	I	0,032	S	0,064	S	0,094	S	192	S	0,064	S	24	R
916	0,25	R	0,5	R	0,38	S	0,032	S	0,064	S	0,125	S	0,5	S	16	S	0,38	S	24	R
917	0,006	S	0,064	S	0,032	S	0,125	S	0,064	S	0,094	S	0,094	S	2	S	0,012	S	32	R
765	0,38	R	0,19	S	0,094	S	1	S	0,047	S	0,19	S	0,19	S	12	S	0,032	S	0,032	S
766	0,38	R	0,125	S	0,094	S	0,5	S	0,032	S	0,094	S	0,125	S	24	S	0,032	S	12	R
767	0,012	S	0,094	S	0,047	S	0,38	S	0,064	S	0,125	S	0,19	S	1024	R	0,047	S	0,125	S
768	0,006	S	0,047	S	0,032	S	0,38	S	0,047	S	0,125	S	0,125	S	8	S	0,023	S	0,125	S
769	0,006	S	0,047	S	0,047	S	0,25	S	0,016	S	0,047	S	0,064	S	32	S	0,023	S	0,064	S
770	0,016	S	0,094	S	0,047	S	0,25	S	0,094	S	0,125	S	0,19	S	24	S	0,016	S	0,125	S
771	0,38	R	0,19	S	0,047	S	0,25	S	0,064	S	0,125	S	0,125	S	12	S	0,047	S	0,047	S
773	0,012	S	0,094	S	0,064	S	0,064	S	0,064	S	0,094	S	0,19	S	16	S	0,064	S	0,25	S
775	0,25	R	1	R	0,38	S	1	S	256	R	256	R	0,5	S	6	S	0,023	S	64	R

**APÊNDICE B - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

(Continua)

Amostras	PG		OX		CE		GM		CM		EM		EF		SX		TS		TC	
776	0,094	S	0,75	R	0,38	S	1	S	256	R	256	R	0,38	S	12	S	0,032	S	24	R
777	0,094	S	0,5	R	0,25	S	0,75	S	256	R	256	R	0,25	S	8	S	0,023	S	24	R
779	0,012	S	0,125	S	0,032	S	0,032	S	0,064	S	0,047	S	0,125	S	3	S	0,032	S	0,047	S
780	0,19	R	0,25	S	0,047	S	0,064	S	0,064	S	0,064	S	0,19	S	4	S	0,032	S	0,25	S
782	0,064	S	1	R	0,19	S	1	S	256	R	256	R	0,125	S	6	S	0,023	S	24	R
783	0,094	S	0,064	S	0,047	S	0,38	S	0,047	S	0,094	S	0,064	S	6	S	0,012	S	0,047	S
784	0,5	R	0,25	S	0,19	S	0,19	S	0,094	S	0,125	S	0,125	S	6	S	0,023	S	0,19	S
785	0,047	S	0,094	S	0,047	S	0,023	S	0,047	S	0,023	S	0,094	S	6	S	0,032	S	0,047	S
786	0,038	S	0,5	R	0,094	S	0,094	S	0,094	S	0,094	S	0,25	S	32	S	0,094	S	0,094	S
787	0,012	S	0,125	S	0,032	S	0,023	S	0,047	S	0,064	S	0,094	S	6	S	0,023	S	0,032	S
853	0,25	R	0,125	S	0,032	S	0,25	S	0,047	S	0,25	S	0,094	S	4	S	0,016	S	0,032	S
854	0,38	R	0,19	S	0,064	S	0,25	S	0,047	S	0,25	S	0,094	S	8	S	0,023	S	0,064	S
855	0,25	R	0,19	S	0,094	S	0,38	S	0,064	S	0,094	S	0,064	S	24	S	0,032	S	0,19	S
856	0,38	R	0,19	S	0,064	S	0,75	S	0,064	S	0,094	S	0,125	S	6	S	0,023	S	24	R
857	0,047	S	0,094	S	0,047	S	0,25	S	0,047	S	0,094	S	0,094	S	12	S	0,023	S	0,094	S
858	0,047	S	0,047	S	0,064	S	0,19	S	0,047	S	0,125	S	0,125	S	24	S	0,032	S	0,094	S
859	0,023	S	0,047	S	0,047	S	0,25	S	0,047	S	0,064	S	0,094	S	24	S	0,023	S	0,125	S
860	0,023	S	0,094	S	0,064	S	0,016	S	0,047	S	0,125	S	0,125	S	1024	R	0,25	S	0,5	S
862	0,023	S	0,38	S	0,094	S	0,047	S	0,064	S	0,125	S	0,19	S	24	S	0,064	S	0,19	S
864	0,25	R	0,75	R	0,38	S	0,75	S	24	R	256	R	0,5	S	64	S	3	I	24	R
865	0,064	S	0,125	S	0,064	S	0,38	S	0,064	S	0,125	S	0,094	S	12	S	0,047	S	0,19	S
866	0,094	S	0,094	S	0,064	S	0,25	S	0,064	S	0,125	S	0,094	S	12	S	0,032	S	0,19	S
867	0,047	S	0,125	S	0,064	S	0,25	S	0,094	S	0,125	S	0,19	S	24	S	0,064	S	0,25	S
868	0,064	S	0,125	S	0,064	S	0,38	S	0,094	S	0,094	S	0,094	S	24	S	0,064	S	0,25	S

**APÊNDICE B - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA** (Continua)

Amostras	PG		OX		CE		GM		CM		EM		EF		SX		TS		TC	
869	0,094	S	0,125	S	0,064	S	0,38	S	0,094	S	0,125	S	0,125	S	16	S	0,047	S	0,19	S
870	0,094	S	0,125	S	0,064	S	0,38	S	0,094	S	0,125	S	0,19	S	48	S	0,094	S	0,19	S
871	0,016	S	0,19	S	0,19	S	0,38	S	0,094	S	0,125	S	0,25	S	192	S	0,064	S	0,25	S
872	0,016	S	0,125	S	0,125	S	0,38	S	0,125	S	0,19	S	0,25	S	32	S	0,064	S	0,38	S
873	0,016	S	0,19	S	0,125	S	0,25	S	0,094	S	0,125	S	0,25	S	24	S	0,047	S	0,25	S
874	0,012	S	0,19	S	0,125	S	0,25	S	0,19	S	0,125	S	0,19	S	32	S	0,064	S	0,38	S
877	0,75	R	0,19	S	0,19	S	0,38	S	0,125	S	0,25	S	0,25	S	24	S	0,064	S	48	R
878	0,125	S	0,19	S	0,094	S	0,38	S	0,094	S	0,19	S	0,19	S	24	S	0,064	S	0,25	S
879	0,094	S	0,19	S	0,094	S	0,38	S	0,064	S	0,19	S	0,125	S	24	S	0,064	S	0,25	S
880	0,125	S	0,19	S	0,094	S	0,5	S	0,064	S	0,19	S	0,125	S	16	S	0,064	S	0,25	S
881	0,016	S	0,19	S	0,094	S	0,25	S	0,125	S	0,125	S	0,25	S	32	S	0,064	S	0,19	S
882	0,032	S	0,25	S	0,094	S	0,38	S	0,064	S	0,094	S	0,25	S	24	S	0,064	S	0,38	S
883	0,023	S	0,38	S	0,38	S	0,23	S	0,064	S	0,094	S	0,125	S	32	S	0,094	S	0,19	S
884	0,19	R	0,38	S	0,064	S	0,064	S	0,38	S	0,094	S	0,19	S	128	S	0,094	S	0,25	S
885	0,094	S	1	R	0,125	S	0,016	S	0,25	S	0,19	S	0,38	S	6	S	0,047	S	32	S
886	0,023	S	0,5	R	0,094	S	0,094	S	0,19	S	0,094	S	0,25	S	8	S	0,064	S	0,19	S
887	0,023	S	0,38	S	0,094	S	0,064	S	0,125	S	0,125	S	0,19	S	128	S	0,125	S	0,38	S
888	0,032	S	0,38	S	0,064	S	0,047	S	0,125	S	0,094	S	0,125	S	12	S	0,064	S	0,19	S
889	0,125	S	0,25	S	0,064	S	0,094	S	0,094	S	0,094	S	0,19	S	16	S	0,064	S	0,19	S
918	0,38	R	0,25	S	0,094	S	0,5	S	0,094	S	0,19	S	0,19	S	12	S	0,047	S	12	R
919	0,064	S	0,19	S	0,064	S	0,5	S	0,064	S	0,125	S	0,125	S	16	S	0,047	S	0,19	S
920	0,094	S	0,125	S	0,094	S	0,5	S	0,064	S	0,125	S	0,125	S	24	S	0,047	S	0,19	S
921	0,023	S	0,19	S	0,125	S	0,5	S	0,094	S	0,19	S	0,19	S	16	S	0,047	S	0,5	S
922	0,032	S	0,19	S	0,094	S	0,38	S	0,094	S	0,19	S	0,25	S	12	S	0,032	S	0,25	S
923	0,016	S	0,19	S	0,19	S	0,38	S	0,125	S	0,19	S	0,19	S	48	S	0,064	S	0,38	S



**APÊNDICE B - RESULTADO DO E-TEST® DE 170 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA** (Conclusão)

Amostras	PG		OX		CE		GM		CM		EM		EF		SX		TS		TC	
924	0,012	S	0,094	S	0,064	S	0,38	S	0,125	S	0,19	S	0,38	S	32	S	0,047	S	0,38	S
925	32	R	0,75	R	0,094	S	0,094	S	0,19	S	0,125	S	0,25	S	16	S	0,064	S	0,38	S
926	0,023	S	0,38	S	0,125	S	0,094	S	0,094	S	0,094	S	0,25	S	12	S	0,125	S	0,75	S
927	0,023	S	0,38	S	0,094	S	8	I	0,125	S	0,094	S	0,19	S	6	S	0,047	S	0,19	S
928	0,016	S	0,19	S	0,047	S	0,25	S	0,094	S	0,19	S	0,25	S	48	S	0,064	S	0,25	S
929	0,016	S	0,38	S	0,047	S	0,047	S	0,094	S	0,064	S	0,125	S	16	S	0,047	S	0,19	S
931	0,094	S	0,75	R	0,094	S	0,016	S	0,25	S	0,125	S	0,38	S	12	S	0,064	S	24	R
932	0,094	S	1,5	R	0,19	S	0,032	S	0,19	S	8	R	0,38	S	3	S	0,064	S	1,5	S
933	0,012	S	0,125	S	0,064	S	0,047	S	0,064	S	0,064	S	0,125	S	64	S	0,064	S	0,125	S
934	0,023	S	0,38	S	0,064	S	0,047	S	0,094	S	0,19	S	0,19	S	24	S	0,047	S	0,125	S
935	0,125	S	0,38	S	0,064	S	0,094	S	0,094	S	0,094	S	0,19	S	128	S	0,125	S	0,19	S
936	0,125	S	0,25	S	0,19	S	1	S	0,094	S	0,19	S	0,19	S	48	S	1,5	S	0,38	S
937	0,19	R	0,19	S	0,094	S	0,125	S	0,125	S	0,19	S	0,125	S	96	S	1,5	S	0,38	S
938	0,023	S	0,19	S	0,064	S	0,125	S	0,064	S	0,125	S	0,25	S	48	S	0,064	S	0,5	S
939	0,19	R	0,38	S	0,094	S	0,094	S	0,38	S	0,125	S	0,19	S	8	S	0,064	S	0,125	S
940	0,047	S	0,5	S	0,125	S	0,125	S	0,125	S	0,19	S	0,25	S	8	S	0,032	S	0,5	S
941	0,047	S	0,25	S	0,125	S	0,125	S	0,19	S	0,125	S	0,25	S	16	S	0,064	S	0,75	S
942	0,047	S	0,38	S	0,19	S	0,19	S	0,125	S	0,19	S	0,125	S	24	S	0,064	S	0,5	S
943	0,047	S	0,38	S	0,125	S	0,125	S	0,125	S	0,125	S	32	R	12	S	0,19	S	0,5	S
944	0,032	S	0,38	S	0,19	S	0,125	S	0,125	S	0,19	S	0,19	S	24	S	0,064	S	0,38	S
945	0,38	R	0,75	S	0,25	S	0,25	S	0,094	S	12	R	0,19	S	4	S	0,032	S	0,75	S
946	0,023	S	0,19	S	0,19	S	0,125	S	0,094	S	0,19	S	0,19	S	32	S	0,064	S	0,5	S
947	0,094	S	0,75	R	0,25	S	0,023	S	256	R	256	R	32	R	8	S	0,5	S	96	R
948	0,125	S	0,75	R	0,25	S	0,016	S	0,125	S	0,125	S	32	R	12	S	0,5	S	1	S
949	0,016	S	0,25	S	0,047	S	0,047	S	0,25	S	0,094	S	0,094	S	4	S	0,016	S	0,19	S

**APÊNDICE C - RESULTADOS DOS TESTES FENÓTIPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 31 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. COAGULASE-NEGATIVOS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA**

(Continua)

Amostra	Estado	CIM µg/mL Oxacilina		E-test Oxacilina		Disco Oxacilina		Disco Cefoxetina		mecA (533pb)	mecA (162 pb)	mecC	blaZ	Identificação
		Leitura	Resultado	Leitura	Resultado	mm	Resultado	mm	Resultado					
225	MG	0,5	R	0,75	R	0	R	19	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
507	MG	0,5	R	0,38	S	13	R	29	S	-	-	-	+	<i>S. haemolyticus</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. warneri</i>
651	MG	0,5	R	0,75	R	14	R	21	R	+	+	-	-	<i>S. epidermidis</i>
810	PR	0,5	R	0,75	R	14	R	24	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
811	PR	0,5	R	0,5	R	17	R	24	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
812	PR	0,5	R	0,5	R	15	R	24	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
831	PR	0,5	R	0,38	S	15	R	24	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
835	SC	1	R	1	R	13	R	25	S	-	-	+	-	<i>S. sciuri</i>
840	SC	0,5	R	0,094	S	28	S	36	S	-	-	-	+	<i>S. epidermidis</i>
841	SC	0,125	S	1	R	16	R	33	S	-	-	-	-	<i>S. lentus</i>
844	SC	0,5	R	0,125	S	25	S	39	S	-	-	-	+	<i>S. chromogenes</i>
891	SC	0,5	R	1,5	R	0	R	19	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
892	SC	0,25	S	0,25	S	17	R	36	S	-	-	-	+	<i>S. chromogenes</i>
896	SC	0,5	R	2	R	0	R	19	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
898	SC	0,25	S	0,5	R	17	R	37	S	-	-	-	+	<i>S. chromogenes</i>
901	SC	0,5	R	0,75	R	13	R	29	S	-	-	-	-	<i>S. succinus</i> , <i>S. saprophyticus</i>
903	SC	0,5	R	1	R	10	R	19	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
914	SC	0,5	R	0,19	S	0	R	0	R	-	-	-	-	<i>S. simulans</i>

**APÊNDICE C - RESULTADOS DOS TESTES FENÓTIPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 31 AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS SPP. COAGULASE-NEGATIVOS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À OXACILINA**

(Conclusão)

Amostra	Estado	CIM µg/mL Oxacilina		E-test Oxacilina		Disco Oxacilina		Disco Cefoxetina		mecA (533pb)	mecA (162 pb)	mecC	blaZ	Identificação
		Leitura	Resultado	Leitura	Resultado	mm	Resultado	mm	Resultado					
915	SC	0,5	R	1,5	R	0	R	0	R	+	+	-	+	<i>S. epidermidis</i>
916	SC	0,5	R	0,5	R	14	R	32	S	-	-	-	-	<i>S. succinus</i> , <i>S. saprophyticus</i>
775	SP	0,5	R	1	R	13	R	32	S	-	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i>
776	SP	0,5	R	0,75	R	15	R	35	S	-	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i>
777	SP	0,5	R	0,5	R	15	R	35	S	-	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i>
782	SP	0,5	R	1	R	14	R	32	S	-	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i>
864	SP	0,5	R	0,5	R	12	R	26	S	-	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i>
885	SP	0,5	R	1	R	17	R	30	S	-	-	-	-	<i>S. xylosus</i>
925	SP	0,5	R	0,75	R	17	R	32	S	-	-	-	+	<i>S. chromogenes</i>
932	SP	0,5	R	1,5	R	16	R	27	S	-	-	+	-	<i>S. sciuri</i>
939	RS	0,125	S	0,38	S	14	R	31	S	-	-	-	+	<i>S. chromogenes</i>
947	PE	0,5	R	0,75	R	15	R	27	S	-	-	-	-	<i>S. xylosus</i>
948	PE	0,25	S	0,75	R	14	R	26	S	-	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>

## APÊNDICE D - LOCAL DE PAREAMENTO DOS PRIMERS UTILIZADOS NA PESQUISA DO GENE *mecA*

*Staphylococcus aureus* strain TN/CN/1/12 *mecA* gene, complete cds (GenBank: KC243783.1)

163 pb (MEHROTRA, WANG E JOHNSON, 2000)

533 pb (MURAKAMI et al., 1991)

356 pb (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011)

```

1 ATGAAAAAGA TAAAAATTGT TCCAATTATT TTAATAGTTG TAGTTGTCGG GTTTGGTATA
61 TATTTTTATG CTTCAAAAAGA TAAAGAAATT AATAATACTA TTGATGCAAT TGAAGATAAA
121 AATTTCAAAC AAGTTTATAA AGATAGCAGT TATATTTCTA AAAGCGATAA TGGTGAAGTA
181 GAAATGACTG AACGTCCGAT AAAAATATAT AATAGTTTAG GCGTTAAAGA TATAAACATT
241 CAGGATCGTA AAATAAAAAA AGTATCTAAA AATAAAAAAC GAGTAGATGC TCAATATAAA
301 ATTAAAACAA ACTACGGTAA CATTGATCGC AACGTTCAAT TTAATTTTGT TAAAGAAGAT
361 GGTATGTGGA AGTTAGATTG GGATCATAGC GTCATTATTC CAGGAATGCA GAAAGACCAA
421 AGCATACATA TTGAAAATTT AAAATCAGAA CGTGGTAAAA TTTTAGACCG AAACAATGTG
481 GAATTGGCCA ATACAGGAAC AGCATATGAG ATAGGCATCG TTCCAAAGAA TGTATCTAAA
541 AAAGATTATA AAGCAATCGC TAAAGAACTA AGTATTTCTG AAGACTATAT CAAACAACAA
601 ATGGATCAAA ATTGGGTACA AGATGATACC TTCGTTCCAC TTAAAACCGT TAAAAAATG
661 GATGAATATT TAAGTGATTT CGCAAAAAAA TTTTCATCTA CAACTAATGA AACAAAAAGT
721 CGTAACTATC CTCTAGAAAA AGCGACTTCA CATCTATTAG GTTATGTTGG TCCCATTAAC
781 TCTGAAGAAT TAAAACAAAA AGAATATAAA GGCTATAAAG ATGATGCAGT TATTGGTAAA
841 AAGGGACTCG AAAAACTTTA CGATAAAAAG CTCCAACATG AAGATGGCTA TCGTGTCAACA
901 ATCGTTGACG ATAATAGCAA TACAATCGCA CATACTTAA TAGAGAAAAA GAAAAAAGAT
961 GGCAAAGATA TTCAACTAAC TATTGATGCT AAAGTTCAAA AGAGTATTTA TAACAACATG
1021 AAAAATGATT ATGGCTCAGG TACTGCTATC CACCCTCAA CAGGTGAATT ATTAGCACTT
1081 GTAAGCACAC CTTCATATGA CGTCTATCCA TTTATGTATG GCATGAGTAA CGAAGAATAT
1141 AATAAATTAA CCGAAGATAA AAAAGAACCT CTGCTCAACA AGTTCCAGAT TACAACCTCA
1201 CCAGGTTCAA CTCAAAAAAT ATTAACAGCA ATGATTGGGT TAAATAACAA AACATTAGAC
1261 GATAAAACAA GTTATAAAAA CGATGGTAAA GGTGGGAAA AAGATAAATC TTGGGGTGGT
1321 TACAACGTTA CAAGATATGA AGTGGTAAAT GGTAATATCG ACTTAAAACA AGCAATAGAA
1381 TCATCAGATA ACATTTTCTT TGCTAGAGTA GCACTCGAAT TAGGCAGTAA GAAATTTGAA
1441 AAAGGCATGA AAAAACTAGG TGTTGGTGAA GATATACCAA GTGATTATCC ATTTTATAAT
1501 GCTCAAATTT CAAACAAAAA TTTAGATAAT GAAATATTAT TAGCTGATTC AGGTTACGGA
1561 CAAGGTGAAA TACTGATTAA CCCAGTACAG ATCCTTTCAA TCTATAGCGC ATTAGAAAAT
1621 AATGGCAATA TTAACGCACC TCACTTATTA AAAGACACGA AAAACAAAGT TTGGAAGAAA
1681 AATATTATTT CCAAAGAAAA TATCAATCTA TTAAGTATG GTATGCAACA AGTCGTAAT
1741 AAAACACATA AAGAAGATAT TTATAGATCT TATGCAAAC TAATTGSCAA ATCCGGTACT
1801 SCAGAACTCA AAATGAAACA AGGAGAAACT GGCAGACAAA TTGGGTGGTT TATATCATAT
1861 GATAAAGATA ATCCAAACAT GATGATGGCT ATTAATGTTA AAGATGTACA AGATAAAGGA
1921 ATGGCTAGCT ACAATGCCAA AATCTCAGGT AAAGTGTATG ATGAGCTATA TGAGAACGGT
1981 AATAAAAAAT ACGATATAGA TGAATAA

```