RESUMO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, geralmente causada por infecção bacteriana, causando as maiores perdas econômicas na bovinocultura leiteira, devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e morte dos animais. Existem muitos micro-organismos responsáveis pela mastite bovina, mas *Staphylococcus* sp permanecem como os mais comumente isolados, em casos de mastites clínicas e subclínicas. São vários os fatores de virulência envolvidos nessa patogênese, principalmente a produção de biofilmes, o que explicaria a cronicicidade da infecção e a produção de toxinas. A presença constante desses micro-organismos pode ocasionar a seleção de cepas resistentes, além de ser um perigo no momento da ordenha, pois o leite contaminado pode causar intoxicações, devido à ingestão de enterotoxinas pré formadas. Assim, o objetivo do trabalho foi identificar os *Staphylococcus* sp isolados a partir de 279 amostras de leite de vacas saudáveis e 293 de vacas com mastite (clínica ou subclínica), quanto à formação de biofilmes, além da resistência a determinadas drogas. Foram isolados 63 (22,6%) cepas de *Staphylococcus* sp, entre as amostras de leite de animais hígidos e 80 (27,3%), entre os doentes. A espécie mais frequentemente isolada entre os animais doentes foi *S. warneri* (27,5%), mas *S. aureus* (17,5%) foi a única espécie onde ocorreu diferença estatisticamente significativa (p-valor 0,001) entre ambos os grupos, comprovando sua maior ocorrência em animais doentes. Em relação à produção de biofilme, foram testadas duas metodologias e a técnica da microplaca (p-valor 0,47) foi melhor que a do vermelho congo (p-valor 0,29). O gene *mec*A foi encontrado em 14 (9,8%) das 143 cepas analisadas,ocorrendo somente em estafilococos coagulase negativa (ECN).

S. aureus ocorreu predominantemente em vacas doentes, enquanto os ECN foram isolados de maneira indistinta, a partir do leite de vacas sadias e doentes. De maneira instigante, vários fatores de virulência investigados foram mais frequentemente encontrados nesse grupo, em relação a *S. aureus,* sugerindo maiores pesquisas que evidenciem o real potencial patogênico desse grupo.

Palavras-chave: antibióticos, biofilme, mastite, *mec*A, *Staphylococcus* sp

Abstract

Mastitis is an inflammation of breast tissue, by bacterial infection. It causes economic losses to dairy cattle, because mastitis results in decrease of production and in low quality of milk, increasing antimicrobial treatment and cows mortality. Several microorganisms are associated to bovine mastitis, but *Staphylococcus* spp. remain as the most commonly isolated bacteria from clinical and subclinical mastitis. Several virulence factors are involved in mastitis pathogenesis; one of the most important of them is the biofilm production that can explain the infection persistency. The persistency of these microorganisms can select antimicrobial resistant strains, besides, can contaminate the milk during collection, resulting in foodborne for the consumers, if pre formed enterotoxins were present. The aim of this study was to identify the species of *Staphylococcus*, to detect the biofilm formation and to characterize the antimicrobial susceptibility patterns in strains isolated from milk of 279 healthy and 293 mastitic cows. Sixty-three strains of *Staphylococcus* spp. were isolated from milk of healthy cow (22.6%), and 80 from mastitic cow milk samples (27.3%). The most common species isolated from sick cows were *S. warneri* (27.5%), but *S. aureus* was the only species that was significantly (P value 0.001) more associated with mastitic cows group. Regarding to biofilm production, two methodologies were carried out. The microtiter plate assay detected more biofilm producer strains (47%) than the congo red agar technique (29%). In relation to *mec*A gene, that confers resistance to all beta-lactam antimicrobial agents, it was detected in 14 (9.8%) out of 143 analyzed strains, all of them occurring in coagulase-negative staphylococci. In summary, we observed that *S. aureus* occurred mainly in mastitic cows, while coagulase-negative staphylococci occurred equally between the healthy and sick cows groups. Surprisingly, virulence factors were more associated to coagulase-negative staphylococci strains, fact that brings up the needing of more studies to elucidate the potential pathogenic role of these bacteria.

Keywords: antibiotic, biofilm, mastitis, *mec*A, *Staphylococcus* sp.

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, geralmente causada por infecção bacteriana, levando a grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e morte dos animais (MELCHIOR et al., 2006). Em relação à saúde pública, essa doença também merece destaque devido ao perigo potencial de transmissão de micro-organismos patogênicos ao homem, através do leite e seus derivados. (BALABAN & RASSOLY, 2000).

A mastite pode ser classificada em clínica ou subclínica. O primeiro tipo se caracteriza pela fácil visualização dos sinais do processo inflamatório, como edema, aumento de temperatura, hiperemia e sensibilidade da glândula mamária, aparecimento de grumos, pus, sangue ou qualquer outra alteração nas características do leite (MARGATHO et al, 1998; FONSECA & SANTOS, 2000). A mastite subclínica caracteriza-se por alterações na composição do leite, como o aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura e apresenta prevalência muito maior que a forma clínica (FONSECA & SANTOS, 2000).

Freitas & Magalhães (1990), no Rio de Janeiro, observaram positividade de 37,7%, nas amostras de leite de vaca com mastite subclínica. Valores semelhantes foram encontrados por Vieira da Motta et al. (2001), com 39,7% positivas entre 362, no interior do estado do Rio de Janeiro. Frequências menores foram observados em São Paulo, por Nader Filho et al. (1988), com

11,9%, e em Minas Gerais, por Ribeiro et al. (1991), com 15,6% das amostras positivas.

Os micro-organismos causadores da mastite podem ser classificados em contagiosos ou ambientais e invadem o úbere através do canal do teto, onde se multiplicam. Pela Figura 1, pode-se observar o desenvolvimento da mastite em um úbere infectado.

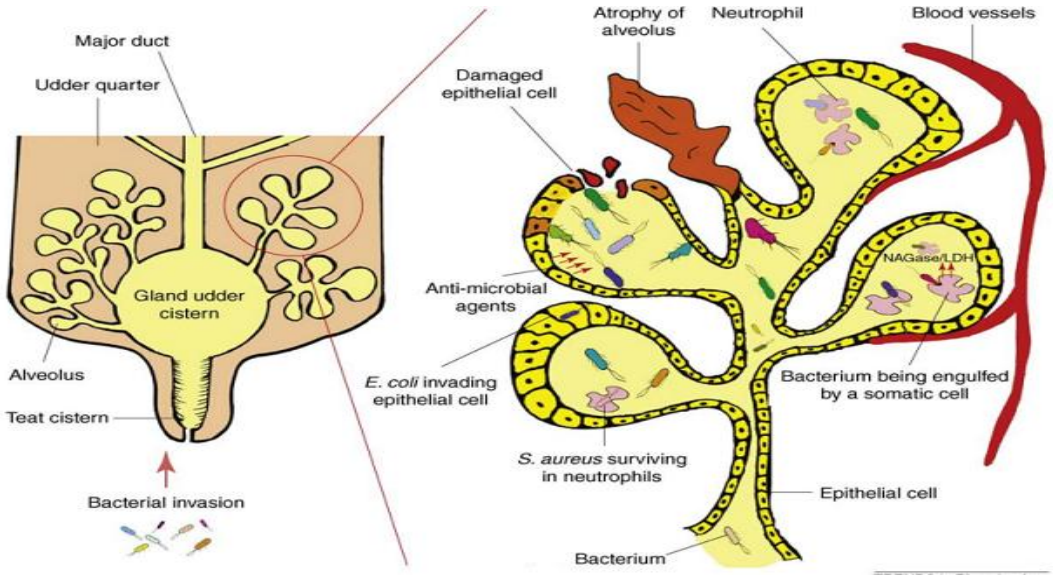


Figura 1 Representação esquemática do desenvolvimento da mastite em um úbere infectado.

Segundo Fostyer & Hook (1998), inicialmente, a bactéria se multiplica no leite, com acesso à parte superior da glândula mamária. Após a adesão às células epiteliais alveolares, ocorre a produção de toxinas. Essa adesão estimula a ativação de macrófagos e a migração de neutrófilos do sangue para o leite (o que explica o aumento da contagem de células somáticas), com inflamação da glândula mamária, diminuição da resposta imune do hospedeiro e danos às células epiteliais. Assim, a bactéria consegue atingir a camada

subepitelial, se ligando ao fibrinogênio e outros receptores protéicos da célula hospedeira, estabelecendo uma infecção crônica.

Existem muitos micro-organismos causadores de mastite bovina, mas *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* estão entre os mais comumente isolados (VASUDEVAN et al., 2003; MELCHIOR et al., 2006, CLUTTERBUCK et al., 2007).

A mastite, clínica ou subclínica, causada por *S. aureus*, um estafilococo coagulase positiva (ECP) é reconhecida como uma das principais doenças que afetam o gado leiteiro, causando perdas financeiras de, aproximadamente, dois bilhões de dólares (VASUDEVAN et al., 2003). O papel dos estafilococos coagulase negativa (ECN) recentemente foi revisto e esses micro-organismos, antes considerados contaminantes, agora são causa frequente de mastite, principalmente subclínica (TAPONEN et al., 2007).

Os ECN são comumente considerados oportunistas, geralmente residem na pele do teto e causam mastite via infecção ascendente através do canal do teto (RADOSTITSET al. 2007). Pyorala et al. (2009) concluíram que esses micro-organismos podem causar infecção persistente, resultando em um aumento da contagem de células somáticas do leite, afetando sua qualidade e diminuindo a produção. Controlar esses micro-organismos é difícil, pois a epidemiologia não é clara e o grupo é composto por mais de 45 espécies diferentes de *Staphylococcus* (DSMZ.DE/DSMZ, 2011).

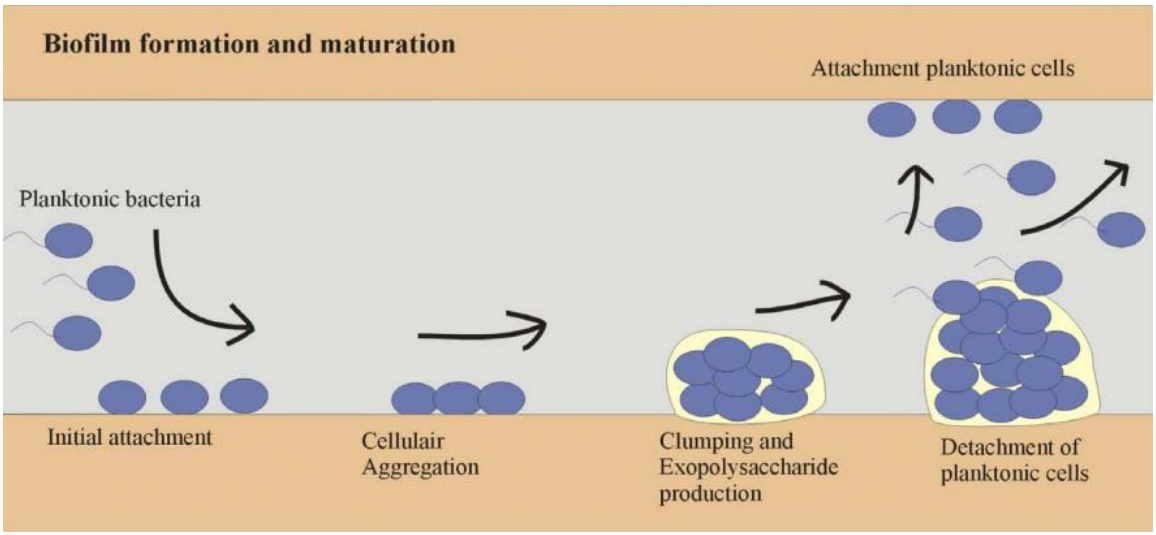
Em relação à mastites causadas pelos estafilococos, no Brasil, Pereira et al. (2007) encontraram, nos rebanhos do sul do estado de Minas Gerais, 35,6% de ECP e 7,4% de ECN entre as 2.368 vacas submetidas ao California Mastitis Test (CMT). Ferreira et al. (2007) identificaram o gênero

Staphylococcus sp em 74,6% dos casos de mastite no município de Teresina, Piauí. Nos Estados Unidos, Hoe & Ruegg (2005) encontraram 19,5% de positividade para ECN e Pol & Ruegg (2007) observaram 15%.

Os ECNs compreendem um grupo heterogêneo dentro do gênero *Staphylococcus*, mas *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. chromogenes* são os mais comuns (LUTHJE & SCHWARZ, 2006; TAPONEN et al., 2006). Sawant et al. (2009), a partir de 168 cepas de ECN identificaram 36% de *S. chromogenes*, 22% de *S. epidermidis* e de *S. hyicus*, 10% *S. simulans*, 4% *S. warneri*, 2% de *S. hominis*, 1% de *S. intermedius, S. haemolyticus, S. sciuri e S. xylosus.*

Vários fatores de virulência, incluindo produção de hemolisina, leucocidina, toxinas esfoliativas, enterotoxinas e capacidade de formar biofilme foram observados em cepas de estafilococos, isolados de bovinos com mastite (HAVERI et al., 2008).

A formação de biofilmes por *Staphylococcus* constitui um importante fator de virulência no quadro de mastite, envolvendo a adesão da bactéria em superfícies sólidas, através de polissacarídeos capsulares, seguida de multiplicação bacteriana, com o desenvolvimento de multicamadas de bactérias envolvidas por uma matriz, composta de uma adesina intercelular polissacarídica (PIA), conforme Figura 2 (LASA & PENADÉS, 2006; CLUTTERBUCK et al., 2007) Essas estruturas dificultam a ação de células fagocitárias da resposta imune e de antimicrobianos, devido à baixa difusão através da matriz (FOX et al., 2005; HARRAGHY et al., 2006; CLUTTERBUCK et al., 2007). Tais características permitem a colonização do epitélio da glândula mamária e o estabelecimento de uma infecção persistente (FOX et al., 2005; MELCHIOR et al., 2006).



MELCHIOR et al., 2006

Figura 2 Formação e maturação do biofilme.

A capacidade dos *Staphylococcus* produzir biofilme pode ser detectada pela triagem das cepas possuidoras dos genes responsáveis pela formação desse composto, seguido de testes *in vitro* (CUCARELLA et al., 2004). Vários genes são responsáveis por essa produção.

A produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA) é mediada pelo *locus ica (*intercellular adhesion*)* (McKENNEY, et al., 1998; CRAMTON et al., 1999), constituídos pelos genes *ica*A, *ica*D, *ica*B e *ica*C e os que parecem ter maior importância na produção de biofilmes são o *ica*A e *ica*D (ARCIOLA et al., 2001). O gene *ica*A é responsável pela produção da enzima N-acetilglicosaminiltransferase, envolvida na síntese de N-acetilglicosamina (ARCIOLA et al., 2001). O gene *ica*D influi na expressão dessa enzima, responsável pela expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (GERKE et al., 1998).

Outros genes importantes, que também regulam a formação de biofilmes são o *bap* (biofilm-associated protein), *agr* (acesory gene regulator) e

sar (staphylococcal acessory regulator) (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; FOX et al., 2005; MELCHIOR et al., 2006).

O gene *bap,* localizado em uma ilha de patogenicidade, sintetiza a proteína de superfície Bap, que apresenta 2.276 aminoácidos e promove a ligação primária a superfícies abióticas e a adesão intercelular, ao contrário da adesina intercelular polissacarídica (PIA), que parece estar envolvida somente na adesão intercelular (UBEDA et al., 2003; CUCARELLA et al., 2004; LASA & PENADÉS, 2006). Segundo Cucarella et al. (2004), cepas de *S. aureus bap* positivas, com inativação ou ausência do operon *ica* continuaram a apresentar síntese de biofilme *in vitro* sem alterações, sugerindo que somente o gene *bap* pode suprir a deficiência da produção de PIA. Tormo et al. (2005) observaram que cepas de *Staphylococcus* que apresentaram o gene *bap* eram fortemente produtoras de biofilme mesmo não apresentando os genes *ica*ABCD.

O *quorum-sensing* é um sistema de comunicação entre células bacterianas, que afeta a expressão de vários fatores de virulência. O único sistema desse tipo em *S. aureus* é codificado pelo *locus agr,* que consiste de 4 genes (*agrA, agrC, agrD, agrB*), sendo este *locus* ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a estacionária. (VOUNG et al., 2000; JEFFERSON, 2004). Quando ativado, esse sistema parece inibir a formação de biofilme, nas células de *S. aureus* (VOUNG et al., 2000; UBEDA et al., 2003).

O sistema *sar* é composto por um único gene (*sar*A), trancrito pelos promotores P1, P2 e P3, resultando nos mRNAs s*arA*, *sarB* e *sarC*. A proteína SarA age inibindo ou aumentando a transcrição de vários genes. Beenken et al. (2003) observaram que cepas de *S. aureus* com mutação no *locus sarA*

apresentaram menor capacidade em formar biofilme, ao contrário do que acontece com o *locus agr*, cuja perda parece aumentar a capacidade de formação de biofilmes (VUONG et al. 2000).

A descrição da produção de biofilmes por cepas de *S. aureus* causadores de mastites clínicas ou subclínicas é bem variável. Em 1993, Baselga et al. encontraram uma baixa porcentagem de cepas produtoras, de 12%. Entretanto trabalhos mais recentes como de Arciola et al (2001) relataram positividade maiores, de 60,8%, semelhantes à encontrada por Vasudevan et al. (2003), de 68,5%. Fox et al. (2005) encontraram 41%, enquanto Oliveira et al (2006) e Vautor et al. (2007) observaram 37,5% e 39%, respectivamente.

Em relação à *S. epidermidis*, Arciola et al. (2001) observaram positividade de 48,5% e Oliveira et al. (2006) observaram, para essa espécie, a mesma porcentagem de cepas produtoras de biofilmes encontradas em *S. aureus*, de 37,5%.

A formação do biofilme pode ser verificada por diferentes métodos. A técnica de microplaca é quantitativa, por leitura em espectrofotômetro (VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Existem alguns métodos qualitativos, como a utilização de ágar vermelho Congo (CHRISTENSEN et al., 1982; BASELGA et al., 1993), para identificar estafilococos produtores e baseia-se no cultivo de estafilococos sobre o ágar sólido, suplementado com o corante vermelho Congo. Outra metodologia qualitativa é a verificação da produção de biolfilme em tubo de borossilicato, corado com azul de tripan (CHRISTENSEN et al., 1982). Ainda, pode-se avaliar a habilidade dos micro-organismos em produzir biofilme sobre superfície abiótica, por meio do microscópio eletrônico de varredura (PIZZOLITTO, 1997).

Melo (2008) observou a produção de biofilme por cepas de *S. aureus* em 85% das amostras pelo método vermelho-congo. No teste em microplaca, 98,9% dos isolados foram produtores de biofilme e 95,7% apresentavam os genes *ica*A e *ica*D. Ciftci et al. (2009) analisaram 59 cepas de *S. aureus* e 22 (37,2%) foram produtoras de biofilme pelo método vermelho-congo. No entanto somente 15 foram positivas para os genes *ica*A e *icaD*.

Outro importante fator de patogenicidade em *S. aureus* é a produção de enterotoxinas, sendo um dos maiores causadores de intoxicação alimentar no mundo, devido à ingestão de toxinas pré formadas no alimento (HATA et al., 2006). A presença de cepas de *S. aureus* possuidoras dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas não implica necessariamente na ocorrência de casos de intoxicações, entretanto, o leite é um excelente substrato para a proliferação desses micro-organismos, devido à abundância de nutrientes. Além disso, a temperatura da glândula mamária é ideal para a produção de enterotoxinas em concentrações suficientes para causar a doença no homem (NADER FILHO et al., 2007).

As enterotoxinas estafilocócicas clássicas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de 26 a 29 KDa, caracterizadas por uma ponte dissulfeto, próximo ao centro da molécula. Os cinco tipos sorológicos clássicos foram designados pelas letras A, B, C, D e E (BERGDOLL & ROBBINS, 1973). Apresentam grandes quantidades de lisina, ácido aspártico, glutâmico, tirosina, dois resíduos de triptofano e cistinas, formando a cisteína, à qual, provavelmente, se atribui o sítio de toxicidade. A composição dos aminoácidos das toxinas A, D, E, B, C_1, C_2 e C_3 é semelhante (BERGDOL, 1989).

As enterotoxinas estafilocócicas são consideradas superantígenos, pois são substâncias capazes de se ligar simultaneamente ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarréia e disfunções hepáticas e renais (FERNANDEZ et al., 2006).

Existe uma grande controvérsia sobre o papel das enterotoxinas na mastite. Segundo Sutra & Poutrel (1994), SEC e SED são as mais importantes nos processos infecciosos intramamários, uma vez que induzem a liberação de fatores inflamatórios. Recentemente, Zecconi et al. (2006) identificaram ao menos um gene das enterotoxinas em todos os bovinos estudados na Itália. Por outro lado, autores como Larsen et al. (2000) argumentaram que os genes dessas enterotoxinas não parecem ter um papel importante no quadro de mastite, uma vez que somente um em 414 animais com mastite apresentou S. *aureus* com o gene *sec*, na Dinamarca.

A enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) é a mais comumente implicada nos casos de intoxicação alimentar. O gene *entA* é composto por 771 pares de base e carreado por um bacteriófago temperado (BORST & BETLEY, 1992). O gene *entB* regula a produção da enterotoxina do tipo B (SEB), que apresenta, aproximadamente, 900 nucleotídeos (JOHNS & KHAN, 1988). Esse gene pode estar integrado ao DNA bacteriano, no caso de amostras clínicas ou carreado por um plasmídio de 750 Kb, em amostras de outras origens (SHAFER & IANDOLO, 1978).

O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC3. Segundo

Marr et al. (1993), a enterotoxina C é heterogênea e apresentas variações antigênicas e em sua seqüência molecular, ocorrendo ainda, as variantes SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada.

A enterotoxina estafilocócica tipo D (SED) é o segundo tipo mais comum, associado a casos de intoxicação alimentar. O gene responsável por essa toxina é o *entD*, estando localizado no plasmídio PIB 485 (BAYLES & IANDOLO, 1989). O gene para a enterotoxina E (SEE) é o *entE* e codifica uma proteína de 29 Kda (VAN de BUSSCHE et al., 1993). Assim como a SEA e SEP, este gene também é carreado por um fago (BAYLES & IANDOLO, 1989)

Em 1992, Betley et al. caracterizaram a toxina G e REN *et* al. (1994), sequenciaram o gene da toxina H. Mempel et al. (2003) observaram que os genes para as toxinas G, I, M, N e O pertencem ao mesmo *cluster* e a detecção de um desses genes, geralmente indica a presença dos outros quatro.

A enterotoxina tipo I (SEI), codificada pelo gene *entI* apresenta a menor homologia entre as enterotoxinas, apresentando 218 nucleotídeos e, junto com a SEG, ambas têm a capacidade de causar resposta emética e proliferação de células T, com produção de Interleucina II e Interferon gama (MUNSON et al., 1998).

Mais recentemente, várias outras toxinas têm sido descritas e seus genes sequenciados, sendo nomeadas como enterotoxinas K, L, M, N, O, P, Q, R e U (JARRAUD et al., 2001; KURODA et al., 2001; ORWIN et al., 2001; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003). Porém, até o momento, a relação entre as novas enterotoxinas e intoxicações de origem alimentar ainda não está completamente esclarecida, pois a maior incidência desses genes foi

observada a partir de isolados clínicos ou cepas de coleções de cultura (OMOE et al., 2002; BECKER et al., 2003).

Essas novas enterotoxinas tem sido designadas como membros da família das enterotoxinas estafilocócicas baseadas na sequencia de similaridade com as enterotoxinas clássicas. O Cômite internacional de Nomenclatura para Superantígenos de *Staphylococcus* (INCSSN) recomendou que somente superantígenos que induzam emese por administração oral em experiências utilizando primatas sejam chamadas de enterotoxinas, enquanto outras toxinas relacionadas, mas que não causam emese nesse modelo experimental sejam designadas como “enterotoxina estafilocócica semelhante a superantígeno” (staphylococcal entrotoxin-like (Sel) superantigens) (LINA et al., 2004). Baseando-se nas recomendações do INCSSN, as toxinas SEJ, SEK, ..., SEU deveriam ser renomeadas como SElJ, SElK, ..., SElU, respectivamente (OMOE et al, 2005). Com exceção de SElH, SEll e SElG, que já apresentaram atividade emética (SU & WONG, 1995; MUNSON et al., 1998), o envolvimento das outras SEl em surtos de origem alimentar ainda não está totalmente exclarecido.

Existem poucos relatos sobre intoxicação estafilocócica envolvendo essas novas enterotoxinas (ROSEC & GIGAUD, 2002), em contraste com a extensa literatura sobre surtos causados pelas cinco enterotoxinas clássicas (AKINEDEN et al., 2001; FUEYO et al., 2001; HOLECKOVA et al, 2002, ROSEC & GIGAUD, 2002; ERCOLINI et al, 2004).

Rosec & Gigaud (2002) testaram 258 cepas de *Staphylococcus aureus* e 74 de ECN, quanto à presença dos genes das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEl. Nenhuma cepa de ECN apresentou genes

para quaisquer toxinas. A presença dos genes das toxinas clássicas ocorreu em 76 (29,5%) das 258 cepas de *S. aureus*, enquanto os das toxinas G, H, I e J foram detectados em 147 isolados (57%).

S. aureus foi detectado em Milão, na Itália, em 96% (93 em 97 cepas) do total de amostras de leite cru e de queijo produzido a partir de leite bovino e de cabra. A partir dos isolados, foi pesquisadas a presença dos genes que codificam para a produção das enterotoxinas SEA, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEL, obtendo-se 66 (71%) amostras positivas para, pelo menos, um desses genes. Os mais comumente encontrados, provenientes de leite bovino foram o sed, com 28 cepas positivas (30,1%), seguido do *sea* com 27 (29%), de *sej* com 24 (25,8%), *sei* com 6 (6,5%) e *sec*, *seh* e *sel*, com 1 (1,1%) cada. Segundo os autores, todas as cepas que apresentaram genes para as enterotoxinas clássicas, foram produtoras, quando testadas com o auxílio de um kit comercial (CREMONESI et al., 2005).

Outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, como *S. hycus, S. intermedius* e vários estafilococos coagulase negativa (ECN) também têm sido envolvidos em casos de intoxicação alimentar (KHAMBATY et al., 1994; UDO et al., 1999). Rall et al (2010) encontraram a presença de genes para as enterotoxinas clássicas em 26,2% das 65 cepas de ECN isoladas de queijo tipo Minas e nenhuma delas foi produtora. Park et al.(2011) observaram genes que codificam para enterotoxinas (clássicas e novas) em 31,2% das amostras de ECN isolados de amostras de leite coletados de quartos infectados. Entretanto, anteriormente, Nemati et al. (2008) investigaram a presença desses genes em ECN isolados de mastite clínica e subclínica e não encontraram nenhum gene.

Carmo et al. (2002) verificaram 2 surtos relacionados a cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos em Manhuaçu e Passa-Quatro, MG, Brasil. No primeiro surto, 50 indivíduos ficaram doentes pelo consumo de queijo Minas e, no segundo 328 indivíduos foram afetados após consumirem leite cru. As enterotoxinas específicas encontradas em cada surto levaram a concluir que a contaminação do primeiro surto estava relacionada com os manipuladores de alimentos e o segundo, com mastite bovina.

O tratamento das mastites clínica, subclínica, recorrente ou crônica é baseado em antibioticoterapia. O tratamento com antimicrobianos é recomendado para a redução da infecção intramamária e, consequentemente, da transmissão da doença pelo rebanho (MENZIES & RAMANOON, 2001). Entretanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento de mastite ou qualquer outra infecção pode levar a um aumento dos níveis de resistência dos micro-organismos, em relação a essas drogas (CONTRERAS et al., 1995).

Para avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos dos espécimes isolados, os métodos habituais são baseados em técnicas de difusão e diluição em ágar. O método de difusão em disco consiste na interpretação da medida do halo de inibição formado ou não pelo antibiótico (NCCLS, 2000).

Vários estudos epidemiológicos mostraram que ocorre uma correlação moderada entre a susceptibilidade de *S. aureus* às drogas *in vitro* e a cura após tratamento com antimicrobiano *in vivo* (SOL et al., 2000), pois em um antibiograma, os medicamentos não sofrem interferência de fatores fisiológicos como a presença de tecido residual e de descamação presente no processo inflamatório, que dificultam a penetração e concentração adequada da droga

em todos os sítios de infecção da glândula mamária, explicando porque algumas bactérias são destruídas *in vitro* e não *in vivo* (PHILPOT, 2002). Assim, algumas vezes, o quadro de mastite é difícil de ser erradicado, independente da susceptibilidade *in vitro* dos antibióticos utilizados (VASUDEVAN et al., 2003, CLUTTERBUCK et al., 2007)

S. aureus meticilina resistente (MRSA) pode expressar alta variabilidade nos níveis de resistência à β– lactamase. A concentração inibitória mínima à oxacilina pode variar de 1 µg ml^{-1} a 1.000 µg ml^{-1}. Cepas de MRSA com níveis de resistência extremamente baixos são preocupantes, pois frequentemente, essa resistência não é detectada fenotipicamente. Enquanto parecem ser fenotipicamente susceptíveis, estas amostras carreiam o gene *MecA* que codifica para resistência à β-lactamase, pela produção de proteínas fixadoras de penicilina 2 (PBP), com baixa afinidade ao antimicrobiano, expressando resistência de modo heterogêneo. Cepas MRSA frequentemente também são mais resistentes a outros β-lactâmicos, inclusive os sintéticos, como carbapenemas e cefalosporinas (ENDER et al., 2008).

Ferreira et al. (2006) isolaram 77 cepas de *S. aureus*, a partir do leite de 40 vacas com mastite subclínica, no estado de São Paulo e 58 (75,3%) foram sensíveis aos antimicrobianos testados (ampicilina, cefalotina, eritromicina, gentamicina, lincomicina, neomicina, norfloxacina, oxacilina, penicilina, sulfazotrim, tetraciclina e vancomicina).

Assim, devido aos diversos fatores de patogenicidade envolvidos no quadro da mastite, é de extrema importância o isolamento dos estafilococos e o estabelecimento de um perfil patogênico mais abrangente possível.

OBJETIVOS

- Caracterização fenotípica quanto à produção de biofilme, das cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de leite de vacas com mastite ou saudáveis.

- Comparação entre os métodos de visualização da produção de biofilme, a partir das cepas isoladas.

- Caracterização do perfil de sensibilidade a antimicrobianos e pesquisa do gene *mec*A.

Referências Bibliográficas

AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin. Diagn. Lab. Immun.,** v. 8, p. 959-964, 2001.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2151–2156, 2001.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 61, p. 1-10, 2000.

BASELGA, R.; ALBIZU, I.; DE LA CRUZ, M.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. Phase variation of slime production in Staphylococcus aureus: implications in colonization and virulence. **Infect Immun.**, v. 61, p. 4857-62, 1993.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 9, p. 4799-4806, 1989.

BECKER, k.; FRIEDRICH, A. W.; LUBRITZ, G.; WEILERT, M.; Peters, G.; EIFF, C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains *staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. **J. Clin. Microbiol.,** v.41, p.1434-1439, 2003.

BEENKEN, K. E.; BLEVINS, J. S.; SMELTZER, M. S. Mutation of *sar*A in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. **Infec. Immun.,** p. 4206-4211, 2003.

BERGDOLL, M. S.; ROBBINS, R. N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **J. Milk Food Technol.,** v. 36, p. 610-2, 1973.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. **Bacterial Foodborne Pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 464-523, 1989.

BETLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B.; Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and Streptococcal exotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chem. Immu.**, v.55, p.1-35, 1992.

BORST, D.W.; BETLEY, M.J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with sea allele class. **Infect. Immun.**, v.62, p. 113-118, 1994.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiol.,** v.14, p.09-14, 2002.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A. L.; BEACHEY, E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infect. Immun.,** v. 37, p.318-26, 1982.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E. E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 254-261, 2009.

CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Vet. Microbiol.**, v. 121, p.1–17, 2007.

CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C.; SIERRA, D.; MARCO, J. Prevalence and etiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Rumin. Resear.**., v.17, p: 71-78, 1995.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is presente in *Syaphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infect. Immun.**, v.67, p.5427-5433, 1999.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Mol. Cel. Probes**, v. 19, p. 299-305, 2005.

CUCARRELA, C.; TORMO, M. A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, JR. Role of film-associated protein bap in the pathogegenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.,** v. 72, p. 2177-2185, 2004.

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) Disponível em: < http://www.dsmz.de/dsmz >. Acesso em 15 Fev. 2011.

ENDER, M.; McCALLUM, N.; BERGER-BACHI, B. Impact of *mec*A promoter mutations on *mec*A expression and beta-lactam resistance levels. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.298, p.607-617, 2008.

ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **J. Appl. Microbiol.,**v.96, p.1090-1096, 2004.

FERNANDEZ, M. M.; MARZI, M. C.; BERGUER, P.; BURYZN, D.; LANGLEY, R. J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigns SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Mol. Immunol.,** v. 43, p. 927, 938, 2006.

FERREIRA, L.M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L.F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus*

isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciên. Rural**, v.36, n.4, p.1228-1234, 2006

FERREIRA, J.L.; LINS, J.L.H.A.; CAVALCANTE, T.V.; MACEDO, N.A.A. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.8, n.2, p.261-266, 2007.

FONSECA, L F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. São Paulo: **Lemos Editorial**, 2000. 175p.

FOSTYER, T.J.; HOOK, M. Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, v.6, p. 484-488, 1998.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Vet. Microbiol.,** v.107, p.295–299, 2005.

FREITAS, M.A.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Rev. Microbiol.**, v.21, p.315-319, 1990.

FUEYO, J.M.; MARTIN, M.C.; GONZALEZ-HEVIA, M.A., MENDOZA, M.C. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **Int. J. Food. Microbiol.,** v.67, p 139-145, 2001.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ. F. Characterization of the *N-acetylglucosaminyltransferase* activity involved in the biosynthesis of the *Staphyloccocus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.18586-93, 1998.

HARRAGHY, N.; SEILER, S.; JACOBS, K.; HANNIG, M.; MENGER, M. D.; HERRMANN, M. Advances *in vitro* and *in vivo* models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. **Int. J. Artif. Organ.**, v. 29, p.368–378, 2006.

HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWAI, T.; ENDO, T.; EGUCHI, M. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. **J. Vet. Med. Scie,** v. 68, p. 165–170, 2006.

HAVERI, M.; ROSLOF, A.; RANTALA, L.; PYOROLA, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **J. Appl. Microbiol.**, v.103, p.993-1000, 2008.

HOLECKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Ann. Agric. Environ. Med.,** v. 9, p. 179-182, 2002.

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

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiol. Lett.**, v.236, p.163-173, 2004

JOHNS JUNIOR., M.B.; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4033-4039, 1988.

KHAMBATY, F.M.; BENNETT, R.W.; SHAH, D.B. Pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterisation of *Staphylococcus intermedius* implicated in a foodrelated outbreak. **Epidemiol. Infect.**, v.113, p.75–81, 1994.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OQUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.;

TAKAHASHI, N.K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K.; Whole genome sequencing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet.**, v.357, p.1225-1240, 2001.

LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R.; JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Vet. Microbiol.**, v. 76, p.153–162. 2000.

LASA, I.; PENADE´s, J.R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Res. Microbiol.**, v.157, p 99–107, 2006.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. **J. infect. Dis**., v.189, p.2334- 2336, 2004

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin *SEU* encoded by the egc cluster of Staphylococcus aureus. **J. Appl. Microbiol.**, v.95, p.38-43, 2003.

LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v.57, p.966-969, 2006.

MARGATHO, L.F.F.; HIPOLITO, M.; KANETO, C. N. Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. **Boletim Técnico Instituto Biológico**. São Paulo: Instititutо Biológico, n.9, 1998. 35p.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; DAVIS, W. C; BOHACH, G. A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins:

biological and evolutionary implications. **Infect. Immunol.**, v.61, p.4254-4262, 1993.

McKENNEY, D.; HUBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN. D.A.; PIER, G. B. The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesion. **Infect. Immunol.**, v.66, p.4711-4720, 1998.

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **J. Vet. Med. B.**, v. 53, p. 326–332, 2006.

MELO, C.B.; ALMEIDA, B.M.; OLIVEIRA, A.A.; AZEVEDO, H.C.; MELO, L.S. S.; MATA, S.S. Avaliação de uma metodologia profilática contra a mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, p.1011-1013, 2008.

MEMPEL, M.; LINA, G.; HOJKA, M.; SCHNOPP, C.; SEIDL, H.P.; SCHAFER, T.; RING, J.; VANDENESCH, F.; ABECK, D. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in*Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. **J. Clin. Microbiol. Infect.,** v.22, p. 306–309, 2003.

MENZIES, P.I.; RAMANOON, S.Z. Mastitis of sheep and goats. **Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract..**, v.17, p.333–358, 2001.

MUNSON, S.H.M.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J.; WELCH, R.A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v.66, p.3337-3348, 1998.

NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; ITURRINO, R.P.S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica. **Rev. Microbiol.**, v.19, p.369-373, 1988.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,** v.59, p.1316-1318, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; 7 th. ed. NCCLS document M2-A7. Wayne National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.

NEMATI, M.; HERMANS, K.; LIPINSKA, U.; DENIS, O.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M.; DEVRIESE, L.A.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: First detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. **Antimic. Agen. Chemot.,** v.52, p.3817-3819, 2008.

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. **Vet. Microbiol.**, v. 118, p.133–140, 2006.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Vet. Microbiol.**, v.124, p.187-191, 2007.

OMOE, K.; ISHIKAMA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg, seh* and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolate harboring *seg*, *she* or *sei* genes. **J. Clin. Microbiol.,** v.40, p.857-862, 2002.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related

putativetoxin encoded by two kinds of plasmids. **Infect. Immun.**, v. 71, p.6088–6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described Staphylococcal superantigenc toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **Fems Microbiol. Lett.,** v.246, p.191-198, 2005.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; DONAHUE, H.L.; NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infect. Immun.**, v.69, p.360-366, 2001.

PARK, J.Y.; FOX, L.K.; SEO, K.S.; McGUIRE, M.A.; PARK, Y.H.; RURANGIRWA, F.R.; SISCHO, W.M.; BOHACH, G.A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the spcecies identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. **Vet. Microbiol.**, v.147, p.142-148, 2011.

PEREIRA, U.P.; COSTA, G.M.; SILVA, M.A., SILVA, N. Mastite subclínica em bovinos leiteiros do sul de Minas Gerais. In: IV Encontro de Pesquisadores em Mastites, 4., 2007, Botucatu. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007, p.92.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Vencendo a Luta Contra a Mastite. Piracicaba: Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.

PIZZOLITTO, E.L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia**: modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, 177f. 1997. Tese (Doutorado): Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 1997.

POL, M.; RUEGG, P.L. Relationship between antimicrobial usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.262-273, 2007.

PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. **Vet. Microbiol.**, v.134, p.3-8, 2009.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. ***Veterinary medicine****:* a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007, p.724-772.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; DEUS, M.F.; SOUSA, D.C.; CAMARGO, C.H.; GODINHO, N.C.; GALINDO, L.A.; SOARES, T.C.S.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. PCR detection of enterotoxins genes in coagulase negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.7, p.1121-1123, 2010.

REN, K.; BANNAN, J.D.; PANCHOLI, V.; AMBROSE, L.; CHEUNG, L.A.; ROBBINS, J.C.; FISCHETTI, V.A.; ZABRISKIE, J.B. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. **J. Experimen. Med.**, v.180, p. 1675-1683, 1994.

RIBEIRO, M.T. Caracterização de *Staphylococcus* isolados de quartos mamários de bovinos inicialmente reagentes a prova do “Califórnia Mastitis Test”. 62f. 1991. Tese (Mestrado) Universidade Estadual do Rio de Janeiro. 1991.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France**. Int. J. Food Microbiol.,** v.77, p.61-70, 2002.

SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E; OLIVER, S. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Vet. Microbiol.,** v.134, p.73-81, 2009.

SHAFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal *locus* for staphylococcal enterotoxin B. **Infect. Immun.,** v.20, p.273- 278, 1978.

SOL, J.; SAMPIMON, O.C.; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 278-284, 2000.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.1438-1443,1995.

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

TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H.D.; PYÖRÄLÄ, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase negative staphylococci identified with API or AFLP. **Vet. Microbiol.**, v. 115, p. 199- 207, 2006.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-bas 282 ed analysis. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.3301-3307, 2007.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GOTZ, F.; LASA, I.; PENADES, J.R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, v.151, p. 2465-2475, 2005.

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

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 819-823, 1999.

VAN DE BUSSCHE, R.A.; LYON, J.D.; Bohach G.A. Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.2, p.281-292, 1993.

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. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p.179–185, 2003.

VAUTOR, E.; CARSENTI-DELLAMONICA, H.; SABAH, M.; MANCINI, G.; PEPIN, M.; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Res.**, v.72, p.197–199, 2007.

VIEIRA-DA-MOTTA, O.; FOLLY, M.M.; SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Braz. J. Microbiol.,** v.32, p.27-31, 2001.

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

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E.; DAPRA, V.; PICCININI, R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microb. Path.**, v.40, p.177–183. 2006.

CAPÍTULO I

*Escrito segundo normas da revista Food Control.

Staphylococcus sp isolated from cow's milk with subclinical mastitis and biofilm production from the strains isolated.

Miranda, E.S.[a]*, Araújo Júnior, J.P.[a], Fernandes Júnior, A.[a], Camargo, C.H.[a], Lee, S.H.I.[a], Oliveira, D.C.V.[a], Langoni, H.[b],Tesuneme, M.H.[c], Rall, V.L.M. [a]

[a] Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

[b] Sanitary Inspection of Animal Products, Faculty of Veterinary Medicine, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

[c] Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

*Corresponding author. Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University – UNESP. Post Office Box 510.18618-000, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Tel. (+5514) 3811-6240, Fax (+5514) 3815-3744
Email: elisangela.miranda@gmail.com

Resumo

***Staphylococcus* sp isolados de leite de vacas com mastite subclínica e produção de biofilme a partir das cepas isoladas.**

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada, principalmente, por *Staphylococcus* sp, em casos clínicos e subclínicos. São vários os fatores de virulência envolvidos nessa patogênese, entre os quais, a produção de biofilmes, o que explicaria a cronicicidade da infecção. A presença constante desses micro-organismos pode selecionar cepas resistentes, dificultando ainda mais sua erradicação. Também pode ser um perigo à saúde pública no momento da ordenha, pois o leite contaminado pode causar intoxicações, devido à ingestão de enterotoxinas pré formadas. O presente trabalho teve como objetivo a identificação de *Staphylococcus* sp isolados a partir de 279 amostras de leite de vacas saudáveis e 293 de vacas com mastite subclínica e formação de biofilmes. Foram isolados 63 (22,6%) cepas de *Staphylococcus* sp, entre as amostras de leite de animais hígidos e 80 (27,3%), entre os doentes. A espécie mais isolada entre os animais doentes foi *S. warneri* (27,5%), mas *S. aureus* (17,5%) foi a única espécie onde ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre ambos os grupos, comprovando sua maior ocorrência em animais doentes. Foram utilizadas duas metodologias para a verificação da produção de biofilme, o crescimento em agar vermelho congo e a técnica da microplaca, que foi melhor (p-valor 0,47) em relação ao vermelho congo (p-valor 0,29). *S. aureus* ocorreu predominantemente em vacas doentes, enquanto os ECN foram isolados de maneira indistinta, a partir do leite de vacas sadias e doentes. Assim, esse grupo deve ser melhor estudado para que seu real potencial patogênico seja definido

Palavras-chave: biofilme, mastite, *Staphylococcus* sp

Abstract

Biofilm production by *Staphylococcus* sp from milk of mastitics and healthy cows

Mastitis is an inflammation of breast tissue caused mainly by Staphylococcus sp in clinical and subclinical cases. Several virulence factors are involved in this pathogenesis, including the biofilm production which explains the chronic infection. The constant presence of these micro-organisms can select resistant strains, of difficulty its eradication. It can also be a hazard to public health during milking, because the contaminated milk can cause foodborne disease due to ingestion of preformed enterotoxin. This study aimed to characterize Staphylococcus sp isolated from 279 milk samples from healthy cows and 293 from cows with subclinical mastitis and the formation of biofilms. Were isolated 63 (22.6%) strains of *Staphylococcus* sp from milk samples from healthy animals and 80 (27.3%), from sick animals. The species most commonly isolated from sick animals was *S. warneri* (27.5%), but *S. aureus* (17.5%) was the only species with statistics differences (p-value 0.001) between both groups, demonstrating the highest occurrence in sick animals. Two methodologies for the verification of biofilm production was used, the growth in Congo red agar plate and microtiter plate assay and the last one was better (0.47) when compared to Congo red agar (0.29). *S. aureus* occurred predominantly in diseased cows, while the CNS were isolated in both groups Thus, this group should be further studied in order to define its real pathogenic role

Keywords: biofilm, mastitis, *Staphylococcus* sp

1. Introdução

A mastite bovina é uma das mais frequentes doenças infecciosas em rebanhos leiteiros (Pol & Ruegg, 2007), podendo ser classificada em clínica ou subclínica. Em estudo realizado por Martins et al. (2010), a prevalência de mastite, clínica ou subclínica, foi observada em 92 (85,2%) das 108 vacas examinadas, em propriedades leiteiras da microrregião de Cuiabá, MT/Brasil.

A mastite clínica é facilmente detectada pelos sintomas de inflamação de, pelo menos, um teto e/ou pela presença de grumos, flocos, ou anormalidade na coloração ou na consistência no leite, nos primeiros jatos de ordenha. Na mastite subclínica, os animais, aparentemente, estão saudáveis e para sua determinação são utilizados o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) (Breen et al., 2009 & Pantoja et al., 2009). O aumento dessas células no leite ocorre devido ao combate dos micro-organismos infecciosos, através da fagocitose e pela reparação dos tecidos de secreção de leite, danificados pela infecção ou lesão (Philpot & Nickerson, 2002).

Staphylococcus estão entre os micro-organismos mais comumente isolados em mastites (Freitas et al., 2005), sendo o S. *aureus,* a causa mais comum de mastite bovina, responsável pelas maiores perdas econômicas (Kozytska et al., 2010). A mastite causada por essa bactéria pode ser subclínica ou clínica, podendo apresentar severos sinais sistêmicos (Pyorala & Taponen, 2009).

Embora *S. aureus* seja considerado o principal patógeno envolvido em infecções intramamárias, o papel dos estafilococos coagulase negativa (ECN) recentemente foi revisto e esses micro-organismos, antes considerados contaminantes, agora são causadoras frequente de mastite, principalmente subclínica (Taponen et al., 2007), sendo responsáveis pelo aumento do número de células somáticas do leite e uma queda na sua produção (Luthje & Schwarz, 2006), fibrose intra-alveolar do tecido mamário e perda da função secretória (Marques, 2003).

Devido à heterogeneidade deste gênero, pois são mais de 45 espécies diferentes de *Staphylococcus,* a mastite causada por ECN é pouco compreendida e seu controle é complicado (Capurro et al., 2009; Dsmz.De/Dsmz, 2011), sendo causa persistente de inflamação intramamária, que pode (GILLESPIE et al., 2009) persistir durante os meses de lactação, caso não seja feito uma intervenção. Park et al. (2011) isolaram 263 ECN de amostras de leite de vacas com infecção intramamária, identificando 11 espécies, sendo *S. chromogenes* (72,2%), *S. xylosus* (9,1%) e *S. haemolyticus* (6,1%), as mais frequentes.

A formação de biofilme, entre outros fatores de virulência, foi observados em *S. aureus* isolados de mastite bovina (Cucarella et al, 2004 & Zecconi et al., 2006 & Oliveira et al., 2006), mas existem poucos estudos realizados com ECNs (Oliveira et al., 2006 & Taponen et al., 2008).

De acordo com Donlan & Costerton (2002), os biofilmes são caracterizados por células que formam microcolônias, estando irreversívelmente aderidas a um substrato ou umas a outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas. O exopolímero que

forma o biofilme protege as bactérias dos componentes do sistema imune do hospedeiro e a vários fatores externos. Cepas de *S. aureus* isoladas de mastite podem produzir biofilme, que parece auxiliar na aderência e colonização do micro-organismo ao epitélio glandular mamário. Algumas cepas produtoras apresentam aumento significativo na capacidade de colonização quando comparadas às cepas não produtoras (Aguilar & Iturralde 2001).

Assim, o presente estudo teve por objetivo identificar espécies de *Staphylococcus* isolados de amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite subclínica e verificar a formação de biofilme por dois métodos fenotípicos.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras de leite

Foram coletadas 279 amostras de leite de vacas saudáveis e 293, de vacas com mastite subclínica. As coletas foram realizadas durante 12 meses, em 10 propriedades distintas, no estado de São Paulo, Brasil.

2.1.1. California Mastitis Test (CMT)

Todas as amostras de leite foram submetidas ao CMT, de acordo com Schalm et al. (1971). Resumidamente, após a exclusão dos primeiros jatos de leite, 3 mL da amostra eram coletadas em bandeja específica do Kit, ao qual era adicionada a mesma quantidade do reagente (10 mg de púrpura de bromocresol, 1,5 g de hidróxido de sódio, 15 mL de teepol e 1000 mL de água

destilada). A mistura era gentilmente homogeneizada e as alterações de cor e consistência eram observadas em até 30 segundos.

A avaliação das amostras variou de negativa até 5 “cruzes” (fortemente positiva). Em uma escala de 1 a 5, amostras com o *score* a partir de 2 foram consideradas suspeitas de infecção intramamária e foram submetidas à contagem de células somáticas.

2.1.2. Contagem de Células Somáticas (CCS)

As amostras de leite positivas no CMT, a partir de 2 “cruzes”, foram submetidas à contagem de células somáticas, a fim de confirmar a infecção. Essa análise foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, com o auxílio do SomaCount 300 (Bentley Instruments).

Animais cujas amostras de leite apresentaram mais de 200.000 células/mL, juntamente com o CMT positivo (pelo menos 2 cruzes), foram considerados como portadores de mastite subclínica (Green et al., 2007 & Breen et al., 2009 & Pantoja et al., 2009).

2.2. Isolamento e Identificação das cepas de *Staphylococcus*

Todas as análises foram realizadas com meios de cultura da marca Oxoid (Inglaterra), exceto quando especificado.

O isolamento de estafilococos foi realizado em ágar Baird-Parker, incubado a 35°C/48h. Colônias características (pretas, com ou sem halo) foram submetidas aos testes de catalase e coagulase.

As cepas coagulase positiva foram submetidas ao kit "Staphytect Test Dry Spot" (Oxoid). A separação entre as duas espécies clumping positivo (*S.*

aureus e *S. intermedius*) foi realizada pela prova de Voges Proskauer e β-galactosidase.

As cepas de estafilococos coagulase negativa foram submetidas a um antibiograma, com bacitracina (0.04 U) and furazolidona (100 μg) a fim de separar ECN de *Kocuria*. (Bannerman & Peacock, 2007). Finalmente, as cepas foram identificadas utilizando o API Staph (Biomérieux, França) e, quando necessários, foram utilizados testes bioquímicos adicionais, segundo Murray (2007).

2.3. Produção de biofilme

2.3.1. Pesquisa da produção de biofilme pelo método do Ágar Vermelho Congo

Cada cepa foi semeada em ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), acrescido do corante Vermelho Congo (0,8%) e incubada a 35ºC/72 horas. Os isolados produtores de biofilme formaram colônias pretas, enquanto os não produtores permaneceram vermelhos (Freeman et al., 1989). Como controle positivo foi usada a cepa ATCC 35556 de *S. aureus* e como negativo, foi utilizado *S. epidermidis* ATCC 12228 (Arciola et al., 2001).

2.3.2 Formação de biofilme em microplaca.

A cultura, crescida em caldo tripticase soja (TSB), foi diluída até 1,5 x 10^8 UFC (0,5 na escala de MacFarland), com o auxílio do *Densicheck* (Biomeriéux), utilizando-se TSB. Uma alíquota de 200 µl foi semeada, em quadruplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato. Após período de incubação de 48 horas para *S. aureus* e 72 horas para ECN, a placa foi lavada

três vezes, com PBS (pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com violeta cristal 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, para a remoção do corante, a placa foi seca em temperatura ambiente e colocada em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), com leitura em 570 nm. As cepas que apresentaram valores maiores que 0,1 foram consideradas produtoras de biofilme (Mack et al., 2000 &, Vasudevan et al., 2003 & Oliveira et al., 2007). Os controles utilizados foram os mesmos citados no item 2.3.1.

Para comparar a produção de biofilmes pelos dois métodos, os dados foram submetidos ao Teste entre Duas Proporções (p-valor igual a 0,001) (ZAR, 1996).

3. Resultados

Foram analisadas 279 amostras de leite de vacas saudáveis, com o isolamento de 63 (22,6%) cepas de *Staphylococcus* sp. Entre as 293 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, 80 (27,3%) foram positivas para esses micro-organismos.

Pela Tabela 1, pode-se observar as espécies identificadas, a partir das amostras de leite de vacas saudáveis e doentes positivas para estafilococos, sendo isoladas 15 cepas de *S aureus* e 128 de ECN.

Tabela 1. Identificação das espécies de *Staphylococcus,* isoladas a partir de amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite subclínica.

Espécies (N)	**Saudáveis N(%)**	**Doentes N(%)**	**Total N(%)**
S. aureus	1 (1,6)	14 (17,5)	15 (10,5)
S. epidermidis	11 (17,5)	11 (13,8)	22 (15,4)
S. warneri	15 (23,8)	22 (27,5)	37 (25,9)
S. haemolyticus	5 (7,9)	7 (8,8)	12 (8,4)
S. saprophyticus	19 (30,2)	13 (16,3)	32 (22,4)
S. simulans	1 (1,6)	4 (5)	5 (3,5)
S. xylosus	7 (11,1)	6 (7,5)	13 (9,1)
S. cohnii spp cohnii	1(1,6)	1 (1,3)	2 (1,4)
S. chromogenes	2 (3,2)	-	2 (1,4)
S. hominis	1 (1,6)	-	1 (0,7)
S. capitis	-	2 (2,5)	2 (1,4)
Total	**63 (44,1)**	**80 (55,9)**	**143 (100)**

S. aureus apresentou associação significativa (p-valor 0,001) entre os grupos, estando mais presente no grupo de vacas doentes. Em relação a *S. saprophyticus,* também ocorreu uma associação significativa (p-valor 0,024), entretanto, devido seu maior isolamento entre as vacas saudáveis. Essa espécie foi a mais comumente isolada entre os ECNs (30,2%), a partir de animais hígidos, seguido por *S. warneri* (23,8%) e *S. epidermidis* (17,5%).

Considerando-se as cepas de *Staphylococcus* sp isoladas entre os animais com mastite subclínica, a espécie mais isolada foi *S. warneri* (27,5%), seguida por *S. aureus* (17,5%) e *S. saprophyticus* (16,3%).

Pela Figura 1, pode-se observar a aparência de duas cepas produtoras de biofilme (colônia preta) e de duas não produtoras (colônia vermelha).

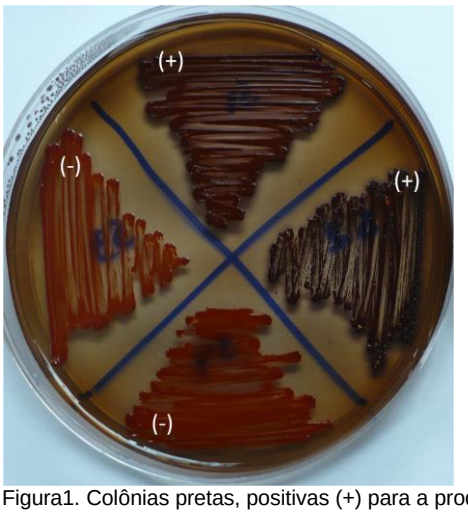


Figura1. Colônias pretas, positivas (+) para a produção de bioflime e vermelhas, negativas (-), para a não produção.

A produção de biofilme em microplaca pode ser visualizada pela Figura 2. A maior ou menor coloração dos poços indica a quantidade de biofilme formada e corada pelo violeta genciana, cuja leitura foi realizada em leitor de Elisa.

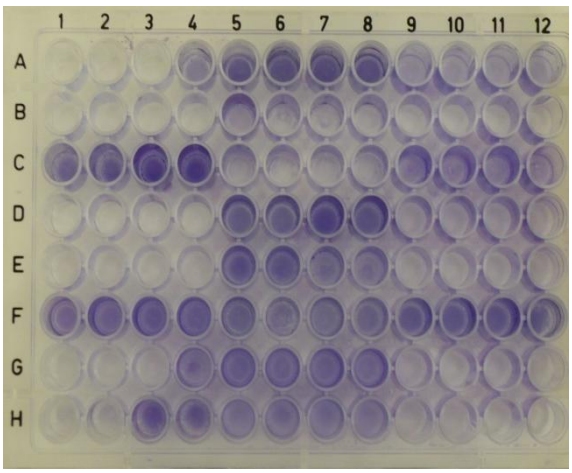


Figura2. Produção de biofilme em microplaca

A Tabela 2 apresenta os resultados da produção de biofilme, pelos métodos de vermelho congo e microplaca, pelas cepas isoladas, de ambos os grupos. Comparando-se os dois métodos, ocorreu diferença estatística entre ambos, sendo a microplaca (p-valor 0,47) melhor do que o vermelho congo (p-valor 0,29) com p-valor igual a 0,001.

Tabela 2. Formação de biofilme, pelos dois métodos, pelas diferentes espécies de *Staphylococcus*, isoladas das amostras de leite de vacas saudáveis e doentes.

	Produção de biofilme			
	Vacas saudáveis		Vacas doentes	
	+ (%)	- (%)	+ (%)	- (%)
S.aureus	1 (100)	-	11 (78,6)	3 (21,4)
S. epidermidis	4 (36,4)	7 (63,6)	6 (54,5)	5 (45,5)
S. warneri	3 (20)	12 (80)	14 (63,6)	8 (36,4)
S. haemolyticus	2 (40)	3 (60)	5 (71,4)	2 (28,6)
S. saprophyticus	17 (89,5)	2 (10,5)	10 (76,9)	3 (23,1)
S. simulans	-	1 (100)	2 (50)	2 (50)
S. xylosus	4 (57,1)	3 (42,9)	5 (83,3)	1 (16,4)
S. cohinni cohinni	-	1(100)	-	1 (100)
S. chromogenes	2 (100)	-	-	-
S. hominis	1 (100)	-	-	-
S. capitis	-	-	1 (50)	1 (50)
TOTAL	34 (54%)	29 (46%)	54 (67,5%)	26 (32,5%)

S. warneri foi a única espécie que apresentou diferença estatística (p=0,004), onde as cepas isoladas de vacas doentes realmente foram mais produtoras de biofilme, em relação às cepas oriundas de vacas saudáveis.

As espécies *S. aureus*, *S. simulans*, *S. cohinni cohinni* e *S. hominis* produtoras de biofilme isoladas de leite de vacas sadias não serão consideradas na discussão devido ao baixo número de cepas isolados (1 ou 2). Entre as doentes, pela mesma razão, as espécies *S. cohinni cohinni* e *S. capitis* serão desconsideradas.

A produção de biofilme entre os grupos apresentaram uma tendência significativa (p-valor 0,070) para o grupo doente.

O método da microplaca foi o mais eficiente, onde 67 cepas foram produtoras de biofilme. Na técnica do Agar Vermelho-Congo, somente 43 espécies foram produtoras.

4. Discussão e Conclusão

O gênero *Staphylococcus* sp é um dos principais organismos causadores de mastite bovina. No atual trabalho, entre as 293 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, 27,3% foram positivas para esses micro-organismos. Em Goiânia, Drescher et al. (2010) observaram um valor um pouco maior, de 31,4%, entretanto porcentagem muito maior foi observada por Ferreira et al. (2007), em Teresina/Piauí, de 74,6%.

S. aureus é um dos principais patógenos relacionados à mastite bovina. Considerando-se as 293 amostras de leite de vacas com mastite subclínicas analisadas, esse micro-organismo esteve presente em 4,8% delas. Benites et al. (2002), encontraram 7,8%, no estado de São Paulo e Zafalon et al. (2007), em Jaboticabal, observaram 5% de positividade durante o desenvolvimento de um trabalho da relação custo-benefício da antibióticoterapia durante a lactação. Em

1988, Nader Filho et al., em São Paulo, também encontraram baixa positividade, de 11,9% de *S. aureus* isolados do mesmo tipo de amostra. Frequências um pouco maiores foram observadas em Minas Gerais, por Ribeiro et al. (1991), que encontraram 15,6% das amostras positivas. Em 2000, Andrade et al., em Goiás, observaram positividade expressivamente maior, de 43,6% e valores próximos foram determinados em 2001, por Vieira da Motta et al., que encontraram 39,7% de positividade, a partir de 362 amostras de leite de vaca com mastite subclínica, no interior do estado do Rio de Janeiro. Recentemente, Martins et al. (2010) isolaram 21,5% de *S. aureus* a partir de leite de vaca com mastite subclínica em propriedades leiteiras da microrregião de Cuiabá, MT/SP.

Entre as 293 amostras de leite de vacas doentes, foram isoladas 66 (22,5%) cepas de ECN. Reis et al. (2003), no Amazonas observaram 20% e Santos et al. (2010), no Paraná, encontraram esses micro-organismos em 24,4% das 427 amostras de leite analisadas. Valores menores e maiores foram observados por Machado e Marin (2008), em Jaboticabal e por Benites et al. (2002).,em São Paulo, de 14,9% e 53,8%, respectivamente.

Considerando-se as cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de animais doentes, 82,5% foram classificadas como ECN. Pyorala & Taponen (2009) concluíram que esses micro-organismos podem causar infecção persistente, resultando em um aumento da contagem de células somáticas do leite, afetando sua qualidade e diminuindo a produção.

Alguns *Staphylococcus* são encontrados normalmente na pele de tetos sadios e nas mãos dos ordenhadores. As espécies *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. warneri* são consideradas parte da microbiota bacteriana dessas regiões, enquanto *S. xylosus* e *S. sciuri* estão relacionados à contaminação ambiental

(Philpot & Nickerson, 2002). Esses dados justificam o isolamento de várias dessas espécies nas amostras de leite de vacas sadias ou doentes, nesse trabalho, com uma alta porcentagem de *S. warneri* (25,9%), *S. saprophyticus* (22,4%) e *S. epidermidis* (15,4%).

Nos Estados Unidos, Rajala-Schultz et al. (2004) encontraram 65,5% de *S. chromogenes*, 10,1% de *S. simulans* e 4,4% de *S. epidermidis* entre os ECNs isolados. Luthje & Schwarz (2006), na Alemanha, de um total de 259 cepas de ECN isoladas de mastite subclínica identificaram *S. chromogenes* (33,2%), *S. simulans* (23,2%), *S. epidermidis* (11,7%), *S. xylosus* e *S. haemolyticus* (9,4%). No mesmo ano, Taponen et al. na Finlândia isolaram 38,5% de *S. simulans*, 26,15% de *S. chromogenes*, 4,6% de *S. haemolyticus*, 3% de *S. warneri* e 1,54% de *S. epidermidis*, *S. equorum* e *S. hominis*. Sawant et al. (2009), nos Estados Unidos, encontraram *S. chromogenes* e *S. epidermidis* como as espécies mais isoladas e Febler et al. (2010), na Alemanha, encontraram resultados semelhantes, onde as espécies mais encontradas foram *S. chromogenes* e *S. simulans*. Park et al. (2011), nos Estados Unidos, isolaram 263 cepas de ECNs, a partir de infecção intramamária, com a identificação de 11 espécies sendo *S. chromogenes* (72,2%), *S. xylosus* (9,1%), *S. haemolyticus* (6,1%), *S. sciuri subsp. carnaticus* (3%), *S. hycus* (3%), S*. simulans* (2,7%), *S. caprae* (1,1%), *S. epidermidis* (0,8%), *S. succinus* (0,8%), *S. capitis* e *S. hominis* (0,4%).

No presente estudo, *S. chromogenes* não foi isolado entre as amostras de leite de vacas doentes, sendo encontrada somente em isolados de vacas saudáveis, em uma baixa porcentagem, de 3,2%. *S. simulans* foi isolado a partir de amostras de leite de vacas doentes, também em baixa porcentagem, de 5%.

Pode-se observar, nos trabalhos acima citados, que as espécies predominantes foram, principalmente, *S. chromogenes* e *S. simulans.* Todos esses trabalhos são de países do hemisfério norte, com condições climáticas e de manejo dos animais muito diferentes das brasileiras, pois nesses países, o inverno é extremamente rigoroso e, por muitos meses, os animais são mantidos confinados. Nos trabalhos brasileiros pesquisados (BENITES et al., 2002; REIS etal., 2003; MARTINS et al, 2010;SANTOS et al., 2010), os autores não chegaram a identificar o grupo dos ECNs a nível de espécies, impossibilitando uma discussão maior sobre quais seriam as predominantes em nosso país.

Staphylococcus produzem muitos fatores de virulência e vários deles estão envolvidos no quadro de mastite, sendo um dos principais, a produção de biofilme. A produção de biofilme pode ser verificada por vários métodos, utilizando-se tubos de borossilicato, ágar vermelho-congo, microplaca, ensaio de bioluminescência ou microscopia de fluorescência (Zufferey et al.,1998). Embora cada método apresente vantagens e desvantagens, o da microplaca foi descrito como sendo de alta especificidade e sensibilidade (Mathur et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com Mathur et. (2006), pois o método da microplaca apresentou diferenças estatisticamente significativas, com 67 cepas positivas (46,8%), em relação ao vermelho congo, com positividade de 43 cepas (29,3%). Entretanto, assim como outros autores, várias cepas eram positivas em um método e negativas no outro e vice-versa. Vasudevan et al. (2003) testaram 35 cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite e 32 (91,4%) produziram colônias pretas no VC, enquanto somente 24 (68,6%) foram produtoras pela técnica da na microplaca. Oliveira et al. (2006) observaram que, de 8 cepas *S. aureus* isolados de vacas com mastite

subclínica, somente 2 (25%) foram positivos para os dois métodos, enquanto que, entre as 6 cepas de *S. epidermidis*, 4 (66,6%) foram positivas em ambos os métodos.

Ainda em relação às 67 cepas positivas (46,8%) pela metodologia da microplaca, Mathur et al. (2006) observaram resultados semelhantes, utilizando a mesma técnica, pois onde 80 (52,6%) de 152 cepas de *Staphylococcus* spp 80 (52,6%) foram produtoras de biofilme.

Considerando-se as cepas isoladas de vacas doentes, em nosso estudo, 54 (67,5%) cepas de *Staphylococcus* sp foram positivas, por uma e/ou outra técnica. A espécie mais produtora foi *S. xylosus*, com 5 (83,3%) cepas positivas entre 6, entretanto, deve ser ressaltado o pequeno número de amostras.*S. aureus* foi o segundo maior produtor, pois 11 (78,6%) das 14 cepas foram produtoras. Fox et al (2005) encontraram positividade de produção menor para esse microrganismo, de 41%, mas deve ser lembrado que os autores utilizaram somente uma metodologia, a da microplaca, assim como Vautor et al (2007), que observaram valores menores ainda, de 26%.

Quanto às cepas de *Staphylococcus* sp isoladas a partir de leite de vacas saudáveis, 34 (54%) foram produtoras de biofilme por qualquer um dos métodos analisados, enquanto o restante das outras 29 (46%) não produziram. Embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa, ocorreu a produção de biofilme pela maioria das cepas. Não foram encontrados na literatura, nenhum trabalho que tenha pesquisado a produção de biolfilme por *Staphylococcus* sp, isolados de vacas saudáveis.

Pode-se dizer que foi surpreendente a grande quantidade de cepas produtoras desse fator de virulência, tão importante na patogênese da doença.

Entretanto, esses animais podem ter sido classificados erroneamente, como saudáveis, abrigando uma mastite oculta, não detectável pelos testes normalmente utilizados (CMT e CCS). Inicialmente, a bactéria infecta o úbere, ganha acesso à região superior da glândula mamária, se adere ao epitélio dos ductos alveolares e começam a produzir toxinas, o que estimula a quimiotaxia para macrófagos e neutrófilos do sangue para o leite, resultando no aumento da contagem de células somáticas, com inflamação das glândulas mamárias e danos às células epiteliais. Como resultado, a bactéria alcança a camada subepitelial, se ligando ao fibrinogênio e outros receptores celulares e estabelece uma infecção crônica (Foster & Hook, 1988). Muitas dessas infecções estão associadas com o crescimento bacteriano envolto por uma matrix exopolissacarídica, conhecida como biofilme, que confere proteção às microcolônias (Costerton et al., 1999). Devido ao biofilme, as células não estão susceptíveis à fagocitose pelos macrófagos e ficam mais resistentes a alguns antimicrobianos (Amorena et al., 1999 & Monzon et al., 2002). Sabe-se que a produção de biofilme nos estafilococos é regulada por vários genes, incluindo o *bap* e o *cluster ica* (*ica*ABCD). Segundo Ubeda et al. (2003), o gene *bap* pode ser inserido numa ilha de patogenicidade, SaPIbov2. Essa característica foi encontrada somente em cepas de *Staphylococcus* aureus (Cucarella et al., 2001) e de outros ECNs como *S. epidermidis, S. chromogenes, S. xylosus* e *S. simulans,* isolados de mastite (Tormo et al., 2005a). Segundo os resultados de Cucarella et al. (2004), a presença desses dois genes (*bap* e *ica*) favoreceu a ocorrência de infecções suaves em 22% dos úberes pesquisados, com baixas contagens de células somáticas. Essa situação, então, leva ao engano, no momento da classificação da mastite, isto é, o animal apresenta a mastite

subclínica, não acusada pelos testes e assim esse animal não é tratado e nem separado do resto do rebanho, podendo ocorrer a disseminação da bactéria pelo rebanho. Essa situação parece ocorrer porque, na ilha de patogenicidade SaPIbov2, os genes responsáveis pela produção de toxinas podem ser substituídos ou sofrer inserção de vários transposon, incluindo o gene *bap*. Assim, não ocorre a produção de toxinas que desencadeiam a resposta imune e nem ocorre reconhecimento da bactéria pelos macrófagos, uma vez que estas estão protegidas pelo biofilme, causando pouca ou nenhuma injúria, com uma baixa contagem de células somáticas. Por outro lado, cepas não produtoras de biofilme ficam mais expostas, mas se forem produtoras de toxinas, vão causar lesão dos tecidos em curto período de tempo, resultando na exposição de adesinas da célula hospedeira, o que permite que a bactéria se fixe nesses receptores e consiga se disseminar pelo organismo.

No atual trabalho, todas as cepas de *Staphylococcus* sp, isoladas de vacas classificadas como saudáveis apresentaram o gene *bap* (dados não mostrados), embora ainda não tenha sido realizada a pesquisa dos genes do *cluster ica*.

Com a exceção de *S. aureus*, que ocorreu predominantemente em vacas doentes, várias espécies de ECNs foram encontradas de maneira indistinta em ambos os grupos de animais, sugerindo maiores pesquisas que evidenciem o real potencial patogênico desse grupo. Na produção de biofilme, o método da microplaca foi o mais eficiente. Essa produção ocorreu em ambos os grupos, demonstrando ser o biofilme um dos fatores de virulência envolvidos, mas não o único, na patogênese da doença.

Referencias Bibliográficas

Aguilar, B., Iturralde, M. (2001). Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 82, 165-175.

Amorena, B., Gracia, E., Monzón, M., Lelva, J., Oteiza, C., Pérez, M., Alabart, J.L., Yago, J.H., (1999). Antibiotic susceptibility assay fot *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *Journal. Ant. Chem*. 44, 43-44.

Andrade, M.A., Dias Filho., Mesquita, F.C., Rocha, A.J. (2000). Sensibilidade in vitro de *S. aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.*Ciência Animal Brasileira* v.1, p.53-57.

Arciola, C. R., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2001). Presence of *ica*A and *ica*D genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from Catheter -Associated Infections. *American Society for Microbiology*, 39, 2151-2156.

Bannerman, T. L., & Peacock, S. (2007). *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive Staphylococci. In: Manual of Clinical Microbiology. MURRAY, P. R., BARON, E. J.; JORGEMAN, J. H.

Benites, N.R., Guerra, J.L., Melville, P.A., & Da Costa, E.O. (2002). etiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence*. Journal. Veterinary Medicine*, 49, 366-370.

Breen J.E., Green M.J., & Bradley A.J. (2009). Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *Journal of Dairy Science*, 92:2551-2561.

Capurro, A., Artusson, K., Waller, K.P., Bengtsson, B., Unnerstad, H.E., & Aspán, A. (2009). Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing and tuf gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolates from cases of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134, 327-333.

Costerton, J.W., Sterwart, S.P., (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.

Cucarella, C., Solano, C., Valles, J., Amorena, B., Lasa, I., & Penádes, J.R., (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formatio. *Journal of Bacteriology*, 183, 2888-2896.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J.R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus. American Society of Microbiology*, 72, 2177-2185.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) http://www.dsmz.de/dsmz. acesso dia 15/02/2011

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 167-193.

Drescher, G., Mattiello, S.P., Peixoto, R.M., De Vargas, A.C., Maciel, M.N., & Da Costa, M.M. (2010). Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. *Ciência Animal Brasileira*, 11, 188-193

Febler, A.T., Billerbeck, C., Kadlec, K., & Schwarz. S. (2010). Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1576-1582.

Ferreira, J.L., Lins, J.L.H.A., Cavalgante, T.V., & Macedo, N.A.A. (2007) Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Ciência Animal Brasileira*, 8, 261-266.

Foster, T., & Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbioogy,* 6, 484-488.

Fox, L.K., Zadoks, R.N., & Gaskins, C.T. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology*, 107, 295-299.

Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slimeproduction by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42, 872-874.

Freitas, M.F.L., Pinheiro Júnior, J.W., Stamford, T.L.M., Rabelo, S.S.A., Silva, D.R., Silveira Filho, V.M., Santos, F.G.B., Sena, M.J., & Mota, R.A. (2005). Perfil de Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. Arquivo Instituto Biologia, São Paulo, 72, 171-177.

Gillespie, B.E., Headrick, S.I., Boonyayatra, S., & Oliver, S.P. (2009). Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Veterinary Microbiology*, 134, 65-72.

Green, M.J., Bradley, A.J., Medley, G.F., & Browne, W.J. (2007). Cow, Farm, and Management Factors During the dry Period that Determine the Rate of Clinical mastitis Afte Calving. *Journal of Dairy Science*, 90, 3764-3776.

Kozytska, S., Straub, D., Pawlik, M.C., Hensen, S., Eckart, M., Ziebuhr, W., Witte, W., & Ohlsen, K. (2010). Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 145, 360-365.

Luthje, P., & Schwarz, S. (2006). Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotype and genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 966-969.

Machado, T.R.O., Correa, M.G., & Marin, J.M. (2008). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 278-282.

Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, j.k., Elsner, H. & Feucht, H. (2000). Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infection and Immunity*, 68, 3799-3807.

Marques, D.C. Criação de Bovinos. (2003) 7.ed. rev., atual e ampl., Belo horizonte, CVP Consultoria Veterinária e Publicações.

Martins, R.P., Silva, J.A.G., Nakazato, L., Dutra, V., & Filho, E.S.A. (2010). Prevalência e Etiologia Infecciosa da Mastite Bovina na Microregião de Cuiabá, MT. *Ciência Animal Brasileira*, 11, 181-187.

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24, 25-29.

Monzon, M.C., Oteiza, J., Leiva, M., & Amorena, B. (2002). Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolateds: low performace of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn. Microbial. Infection*, 44, 319-324.

Murray, P.R. et al. (2007). Manual of Clinical Microbiology. 9.ed. Washington: ASM, 2256p.

Nader, F.A., Rossi Jr, O.D., & Iturrino, R.P.S. (1988). Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica. *Rev. Microbiology*, 19, 369-373.

Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F., & Vilela, C.L. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*, 118, 133-140.

Oliveira, M., Nunes, S. F., Carneiro, C., Bexiga, R., Bernardo, F., & Vilela, C. L. (2007). Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*, 124, 187-191.

Pantoja, J.C.F., Hulland, C., & Ruegg, P.L. (2009). Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. Journal of Dairy *Science*, 92, 139-148.

Park, J.Y., Fox, L.K., Seo, S.K., McGuire, M.A., & Park, Y.H., Rurangirwa, F.R., Sischo, W.M., Bohach, G.A. (2011). Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*, 147, 142-148.

Philpot, W.N., Nickerson, S.C. (2002) Vencendo a Luta Contra a Mastite. Piracicaba: Westfalia Landtechnik do Brasil, 192p.

Pol, M., & Ruegg, P.L. (2007). Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. *American Dairy Science Association*, 90, 262-273.

Pyorala, S., & Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134, 3-8.

Rajala-Schultz, P.J., Smith, K.L., Hogan, J.S., & Love, B.C. (2004). Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary Microbiology,* 102, 33-42.

Reis, S.R., Silva, N., & Brescia. (2003). M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, 55, 651-658.

Ribeiro, M.T. Caracterização de *Staphylococcus* isolados de quartos mamários de bovinos inicialmente reagentes a prova do “Califórnia Mastitis Test”. Rio de Janeiro, 1991, 62p. (M.S. Thesis. Instituto de Veterinária. UFRRJ).

Santos, L.L., Pedroso, T.F.F., & Guirro, E. (2010). Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de santa Izabel do oeste, Paraná. *Ciência Animal Brasileira*, 2, 860-866.

Schalm, O.W., & Noorlander, D.O. (1957). Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *Journal American Veterinary Medicine*, 130,199.

Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H. D., & Pyorala, S. (2006). Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology,* 115, 199-207.

Taponen, S., Koort, J., Bjorkroth, J., Saloniemi, H.,& Pyorala, S. (2007). Bovine Intramammary Infections Caused by Coagulase-Negative Staphylococci May Persist Throughout Lactation According to Amplified Fragment Length Polymorphism-Based Analysis. *American Dairy Science Association,* 90, 3301-3307.

Taponen, S., Bjorkroth, J., & Pyorala, S. (2008). Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extamammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal of Dairy Research,* 75, 422-429.

Tormo M.A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I., Penades, J.R., 2005. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? Microbiology, 151, 2465-2475.

Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., & Penadés, J.R. (2003). Sip, na integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Molecular. Microbiology*, 49, 193-210.

Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T.,& Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology,* 92, 179-185.

Vautor, E., Carsenti-Dellamonica, H., Sabah, M., Mancini, G., Pepin, M., & Dellamonica, P. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). *Small Ruminant Res.,* 72, 197–199.

VIEIRA-DA-MOTTA, O., FOLLY, M.M., & SAKYIAMA, C.C.H. (2001). Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brazilian Jounal of Microbiology*, 32, 27-31, 2001.

Zafalon,L.F., Nader Filho, A., Oliveira, J.V., & Resende, F.D. (2007). Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59, 577-585.

Zar, J.H. (1996). Biostatistical analysis . 3rd.ed. Prentice Hall, New Jersey p.662

Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Dapra, V., & Piccinini R. (2006). Role of several Staphylococcus aureus virulence factores on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbiology Pathogeny*, 40, 177-183.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Jounal of Virology*, 72, 9873–9880.

CAPÍTULO I I

*Escrito segundo normas da revista Microbiol Veterinary.

Sensibilidade a antimicrobianos por cepas de *Staphylococus* sp, isolados de vacas sadias e com mastite subclínica

Miranda, E.S.[a]*, Araújo Júnior, J.P.[a], Fernandes Júnior, A.[a], Camargo, C.H.[a], Lee, S.H.I.[a], Oliveira, D.C.V.[a], Langoni, H.[b],Tesuneme, M.H.[c], Rall, V.L.M. [a]

[a] Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

[b] Sanitary Inspection of Animal Products, Faculty of Veterinary Medicine, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

[c] Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

*Corresponding author. Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University – UNESP. Post Office Box 510.18618-000, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Tel. (+5514) 3811-6240, Fax (+5514) 3815-3744
Email: elisangela.miranda@gmail.com

Resumo

Sensibilidade a antimicrobianos por cepas de *Staphylococus* sp, isolados de vacas sadias e com mastite subclínica

A mastite, clínica ou subclínica, causada por *S. aureus* e estafilococos coagulase negativa (ECN) é reconhecida como uma das principais doenças que afetam o gado leiteiro, causando enormes perdas financeiras. Assim, é de extrema importância o controle da disseminação da doença entre o rebanho, assim como, o tratamento de cada animal doente. Foram analisadas 279 amostras de leite de vacas saudáveis, com o isolamento de 63 (22,6%) cepas de *Staphylococcus* sp e 293 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, onde 80 (27,3%) foram positivas para esses micro-organismos. O gene *mec*A foi observado em 14 (9,8%) entre as 143 cepas de estafilococos, não sendo observado em *S. aureus*. Várias cepas foram resistentes à oxacilina, na ausência do gene *mec*A, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos de resistência. Somente uma (7,2%) entre as 14 cepas de *S. aureus*, isolado de vacas doentes apresentaram resistência à penicilina, enquanto essa característica foi observada em 61,6% das cepas de *S.saprophyticus*. *Staphylococcus* sp, isolados de leite de vacas com mastite ou saudáveis foram resistentes a vários antimicrobianos. Cepas naturalmente resistentes podem ocorrer no ambiente, mas também podem sugerir que ocorra a disseminação de bactérias resistentes entre os animais sadios.

Palavras-chave: antibiótico, mastite, *mec*A, *Staphylococcus* sp.

ABSTRACT

Sensitivity to antibiotics by strains of *Staphylococcus* sp, isolated from healthy and subclinical mastitic cows.

Mastitis clinical or subclinical caused by *S. aureus* and coagulase negative staphylococci (CNS) is recognized as one of the major diseases affecting dairy cattle, causing huge financial losses. Thus, it is extremely important to control the spread of disease among the herd as well as the treatment of each infected animal. We analyzed 279 milk samples from healthy cows, with the isolation of 63 (22.6%) strains of *Staphylococcus* sp and 293, from cows with subclinical mastitis, where 80 (27.3%) were positive for these microorganisms. The *mec*A gene was observed in 14 (9.8%) among 143 strains of staphylococci, but not in *S. aureus*. Several strains were resistant to oxacillin in the absence of the *mec*A gene, suggesting the involvement of other resistance mechanisms. Only one (7.2%) among 14 strains of *S. aureus* isolated from sick cows were resistant to penicillin, while this feature was observed in 61.6% of *S.saprophyticus* isolates. Staphylococcus sp isolated from milk of cows with mastitis and healthy ones were resisitent to several antibiotics. Naturally resistant strains may occur in the environment but can also suggest the occurrence of spreading of the multiple antibiotic resistance among healthy animals.

Keywors: antibiotic, mastitis, *mecA*, *Staphylococcus* sp

1. Introdução

A mastite bovina é uma das doenças mais freqüentes e a principal causa do uso de antimicrobianos em vacas leiteiras (Pol & Ruegg, 2007). No mundo todo, *S. aureus* é considerado um dos principais patógenos causadores de mastite clínica e subclínica (De Oliveira et al., 2000; Tenhagen et al., 2006). A prevalência de *S. aureus*, isolados do leite de vacas com mastite pode ser bem variada. Pitkala et al. (2004) observaram positividade de 10,2% na Finlândia e Shitandi et al. (2004), de 30,6%, no Quênia. Em 2007, Wang et al. encontraram a prevalência de 25,2% na China. No Brasil, também foram observadas porcentagens bem diferentes. Em 2000, Andrade et al., em Goiás, encontraram alta positividade, de 43,6%. Zafalon et al. (2007), em Jaboticabal, isolaram *S. aureus* em 5% dos casos de mastite subclínica. Recentemente, Martins et al. (2010) isolaram 21,5% de *S. aureus*, a partir do mesmo quadro clínico. Já os estafilococos coagulase negativa (ECN) são mais frequentemente isolados do que *S. aureus*, causando, principalmente, mastite subclínica, com aumento da contagem de células somáticas e diminuição da produção de leite (Salmon et al., 1998; Gentili et al., 2002).

Os ECNs parecem ser mais resistentes aos antimicrobianos, quando comparados com *S. aureus*, podendo tornar-se multiresistentes. O mecanismo de resistência mais comum em estafilococos é a produção da enzima beta-lactamase, o que resulta em resistência a penicilina G e aminopenicilinas (Taponen and Pyrola, 2009).

Em um estudo realizado por Silva et al. (2004), onde se isolou 37% de *S. aureus* de mastite clínica e subclínica, 64% das cepas foram sensíveis à penicilina G, 96% a oxacilina e 100% a trimetoprim/sulfametoxazole. Entre os

ECNs isolados (60%), a sensibilidade a penicilina G foi de 40%, para a oxacilina e para trimetoprim/sulfametoxazole, a sensibilidade foi de, respectivamente, 77,5% e 97,5%.

Pyrola & Taponen (2009) concluíram, baseados em relatos disponíveis, que a mastite causada por ECN parece responder bem aos antimicrobianos utilizados no tratamento, com taxas de cura de 80 a 90%. Entretanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento de mastite ou qualquer outra infecção pode levar a um aumento dos níveis de resistência dos micro-organismos, em relação a essas drogas, incluindo-se ai as bactérias que compõem a microbiota do animal (Contreras et al., 1995).

Para tratamento da mastite, a resistência à meticilina, que é causada pela expressão do gene *mec*A, é de particular interesse. Na verdade, esse mecanismo confere resistência a quase todos os *β*-lactâmicos e estes antibióticos ainda são usados com freqüência no tratamento de mastites por *S. aureus* (Sawant et al., 2005). Essa resistência parece ser mais rara em *S. aureus* do que em ECNs (Taponen & Pyorala 2009). Entretanto, Moon et al. (2007) não observaram diferenças, pois isolaram 835 cepas de *S. aureus* e 763 de ECNs de amostras de leite de vacas com mastite. Destas, das 21 cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina pelo antibiograma, 13 (61,9%) possuíam o gene *mec*A e entre os 19 ECNs, 12 (63,2%) apresentaram esse gene.

Olson et al. (2002) demonstraram, em estudos *in vitro,* que o crescimento das bactérias em biofilme pode torná-las de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos efeitos de agentes antimicrobianos, quando comparado ao crescimento de bactérias planctônicas da mesma linhagem. Muitos mecanismos são conhecidos por influenciarem na resistência do biofilme aos

agentes antimicrobianos, incluindo a dificuldade na penetração desses agentes através da matriz do biofilme, taxa de crescimento alterado dos organismos no biofilme e alterações fisiológicas devido ao modo de crescimento do biofilme (Melchior et al., 2006).

O presente estudo teve como objetivo determinar a sensibilidade das cepas de *Staphylococcus* sp, isoladas de amostras de leite de vacas sadias e doentes, a vários antimicrobianos e pesquisa do gene *mecA*.

2. Material e Métodos

2.1. Bactérias

Todas as análises foram realizadas com meios de cultura da marca Oxoid (Inglaterra), exceto quando especificado.

Amostras de leite de vacas saudáveis (279) e mastíticas (293) foram coletadas durante 12 meses em propriedades localizadas no estado de São Paulo, Brasil. O isolamento de estafilococos foi realizado em ágar Baird-Parker com 5% de emulsão de gema de ovo e telurito e incubado a 35°C por 48h; colônias características de estafilococos foram triadas pelos testes de catalase e coagulase. As cepas coagulase positiva foram submetidas ao kit "Staphytect Test Dry Spot" (Oxoid). A separação entre as duas espécies clumping positivo (*S. aureus* e *S. intermedius*) foi realizada pela prova de Voges Proskauer e β– galactosidase. As cepas de estafilococos coagulase negativa foram identificadas utilizando o API Staph (Biomérieux) e, quando necessários, foram utilizados testes bioquímicos adicionais, segundo Murray (2007).

2.2. Detecção do gene *mec*A

Para extração e purificação empregou-se o kit comercial “MiniSpin” (GE Healtcare). Para as reações de PCR foi utilizado um volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x, 1,0 µM de Cloreto de Magnésio, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer*, água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), com ciclo inicial de 94ºC durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94ºC durante 2 minutos para desnaturação, anelamento dos primes (F 5’-ACTGCTATCCACCCTCAAAC-3’) e R 5’-CTGGTGAAGTTGTAATCTGG-3’) a 58 ºC por 30 segundos e 72ºC durante 1 minuto para extensão. Como controle positivo foi usada a cepa *S. aureus* BMB 9393 (Arciola et al., 2001).

2.3. Teste de disco-difusão

As cepas foram submetidas a testes de susceptibilidade a alguns antimicrobianos, através do método Kirby-Bauer, com discos impregnados. Os isolados a serem testados foram repicados em tubos com caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), que foram incubados a 35°C/24 h. Após esse período, com o auxílio de uma solução salina, o crescimento foi ajustado numa concentração de, aproximadamente 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de MacFarland) e, com auxílio de uma zaragatoa esterilizada, o inóculo foi espraiado na superfície de uma placa com ágar Mueller – Hinton. Após a absorção completa do inóculo, os discos foram colocados sobre o ágar com o auxílio de uma agulha esterilizada.

Foram usados os seguintes antimicrobianos (Cefar Diagnóstica Ltda): penicilina G (10 U.I.), oxacilina (1 μg), cefoxitina (30 μg), cefuroxima (30 μg), trimetropina (5 μg),sulfametaxazol/trimetropin (25 μg), gentamicina (10 mcg), cefalexina (30 μg), ceftriaxona (30 μg).

As cepas foram consideradas resistentes, de sensibilidade intermediária ou sensíveis, de acordo com uma tabela de mensuração dos halos para cada antimicrobiano usado, fornecido pelo fabricante dos discos impregnados (CLSI, 2010).

Para a comparação entre as diferenças de sensibilidade entre as espécies, foi utilizado o Teste do Qui-quadrado.

3. Resultados

Das 293 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, 80 (27,3%) foram positivas para a presença de bactérias do gênero S*taphylococcus*, sendo 22 cepas de *S. warnei* (27,5%), 14 de *S. aureus (*17,5%), 13 de *S. saprophyticus* (16,3%/), 11 de *S. epidermidis* (13,8%), 7 de *S. haemolyticus* (8,8%), 6 de *S. xylosus* (7,5%), 4 de *S. simulans* (5%), 2 de *S. capitis* (2,5%) e uma de *S. cohnii ssp cohnii* (1,3%).

Entre as 279 amostras de leite de vacas saudáveis, 63 (22,6%) foram positivas sendo 19 isolados de *S. saprophyticus* (30,2%), 15 de *S. warnei (*23,8%), 11 de *S. epidermidis* (17,5%), 5 de *S. haemolyticus* (8%), 7 de *S. xylosus* (11,1%), 2 de *S. chromogenes* (3,2%), e uma (2%) de *S. hominis*, *S. aureus*, *S. cohnii ssp cohnii* de *S. simulans*.

Os resultados de resistência e sensibilidade das espécies nos grupos doentes e saudáveis em relação aos antibióticos utilizados podem ser observados nas Tabelas 1e 2.

Espécies com pequeno número de cepas isoladas (1 a 5) não foram consideradas, pela má interpretação que isso pode ocasionar, pois seriam descritas resistência de 50% ou 100% , para várias espécies, independente de sua origem.

Entre as cepas de *S. aureus* isoladas de vacas doentes, somente uma (7,15%) apresentou resistência à penicilina. Em relação a este antibiótico, *S. saprophyticus* foi a espécie que apresentou maior resistência com 8 cepas (61,6%), entre as vacas doentes e 8 (42,1%), entre as saudáveis.

Em relação à oxacilina, um dos principais marcadores fenotípicos da presença do gene *mec*A, 18 (28,6%) entre as 63 cepas isoladas de leite de vacas sadias e 12 (15%) das 80 cepas de animais doentes foram resistentes a esse antibiótico. Embora biologicamente essa resistência tenha ocorrido mais em cepas isoladas de vacas sadias do que das doentes, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Dentre as 30 cepas resistentes a esse antibiótico, somente 6 (20%) apresentavam o gene *mec*A (3 *S. saprophyticus, 2 S. xylosus* e 1 *S. chromogenes*).

Tabela 1. Perfil de sensibilidade aos antibióticos das cepas de *Staphylococcus* sp isoladas, a partir de amostras de leite de vacas doentes.

		S. aureus	*S. epidermidis*	*S. warneri*	*S. haemolyticus*	*S. saprophyticus*	*S. simulans*	*S. xylosus*	*S. cohnii spp cohnii*	*S. capitis*
		N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
PEN	R	1 (7,2)	3 (27,3)	4 (25)	2 (28,6)	8 (61,6)	-	4 (66,6)	-	-
	S	13 (92,9)	8 (72,8)	12 (75)	5 (71,4)	5 (38,4)	4 (100)	2 (33,4)	1 (100)	2 (100)
SUT	R	-	-	-	-	2 (15,4)	-	-	-	-
	S	14 (100)	11 (100)	16 (100)	7 (100)	11 (84,6)	4 (100)	6 (100)	1 (100)	2 (100)
CFO	R	-	-	-	-	1 (7,7)	-	-	-	-
	S	14 (100)	11 (100)	16 (100)	7 (100)	12 (92,3)	4 (100)	6 (100)	1 (100)	2 (100)
CRX	R	-	-	-	-	3 (23,1)	-	1 (16,7)	-	-
	S	14 (100)	11 (100)	16 (100)	7 (100)	10 (76,9)	4 (100)	5 (83,3)	1 (100)	2 (100)
CFE	R	-	-	-	-	1 (7,7)	-	1 (16,7)	-	-
	S	14 (100)	11 (100)	16 (100)	7 (100)	12 (92,3)	4 (100)	5 (83,3)	1 (100)	2 (100)
TRI	R	-	-	-	-	1 (7,7)	-	-	-	-
	S	14 (100)	11 (100)	16 (100)	7 (100)	12 (92,3)	4 (100)	6 (100)	1 (100)	2 (100)
OXA	R	-	1 (9,1)	5 (31,3)	-	5 (46,2)	-	1 (16,7)	-	-
	S	14 (100)	10 (90,9)	11 (68,8)	7 (100)	7 (53,9)	4 (100)	5 (83,3)	1 (100)	2 (100)
CRO	R	-	-	5 (31,3)	-	6 (46,2)	-	1 (16,7)	-	-
	S	14 (100)	11 (100)	11 (68,8)	7 (100)	7 (53,9)	4 (100)	5 (83,3)	1 (100)	2 (100)
GEN	R	-	-	-	-	1 (7,7)	-	1 (16,7)	-	-
	S	14 (100)	11 (100)	16 (100)	7 (100)	12 (92,3)	4 (100)	5 (83,3)	1 (100)	2 (100)

Legenda: PEN: penicilina; SUT: sulfametaxazol/trimetropin; CFO: cefoxitina;CRX: cefuroxima;CFE: cefalexina; TRI: trimetropina; OXA: oxacilina; CRO: ceftriaxona; GEN: gentamicina

Tabela 2. Perfil de sensibilidade aos antibióticos das cepas de *Staphylococcus* sp isoladas, a partir de amostras de leite de vacas saudáveis.

		S. aureus	*S. epidermidis*	*S. warneri*	*S. haemolyticus*	*S. saprophyticus*	*S. simulans*	*S. xylosus*	*S. cohnii spp cohnii*	*S. chromogenes*	*S. hominis*
		N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N (%)
PEN	R	-	3 (27,3)	3 (50)	2 (40)	8 (42,1)	-	2 (28,6)	-	1 (50)	-
	S	1 (100)	8 (72,7)	3 (50)	3 (60)	11 (57,9)	1 (100)	5 (71,4)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
SUT	R	-	-	-	1 (20)	2 (10,5)	-	2 (28,6)	-	1 (50)	-
	S	1 (100)	11 (100)	6 (100)	4 (80)	17 (89,5)	1 (100)	5 (71,4)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
CFO	R	-	-	-	-	1 (5,3)	-		-	1 (50)	-
	S	1 (100)	11 (100)	6 (100)	5 (100)	18 (94,8)	1 (100)	7 (100)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
CRX	R	-	-	-	1 (20)	3 (15,8)	-	1 (14,3)	-	1 (50)	-
	S	1 (100)	11 (100)	6 (100)	4 (80)	16 (84,2)	1 (100)	6 (85,7)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
CFE	R	-	-	-	-	2 (10,5)	-	1 (14,3)	-	1 (50)	-
	S	1 (100)	11 (100)	6 (100)	5 (100)	17 (89,5)	1 (100)	6 (85,7)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
TRI	R	-	-	-	1 (20)	2 (10,5)	-	2 (28,6)	-	1 (50)	-
	S	1 (100)	11 (100)	6 (100)	4 (80)	17 (89,5)	1 (100)	5 (71,4)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
OXA	R	-		3 (33,4)	2 (40)	8 (42,1)	-	2 (28,6)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
	S	1 (100)	11 (100)	4 (66,6)	3 (60)	11 (57,9)	1 (100)	5 (71,4)	-	1 (50)	-
CRO	R	-	-	2 (33,4)	2 (40)	7 (36,9)	-	3 (42,9)	1 (100)	1 (50)	1 (100)
	S	1 (100)	11 (100)	4 (66,6)	3 (60)	12 (63,2)	1 (100)	4 (57,2)	-	1 (50)	-
GEN	R	-	-	-	-	-	-	2 (28,6)	-	1 (50)	-
	S	1 (100)	11 (100)	6 (100)	5 (100)	19 (100)	1 (100)	5 (71,4)	1 (100)	1 (50)	1 (100)

Legenda: PEN: penicilina; SUT: sulfametaxazol/trimetropin; CFO: cefoxitina;CRX: cefuroxima;CFE: cefalexina; TRI: trimetropina; OXA: oxacilina; CRO: ceftriaxona; GEN: gentamicina

Entre as 143 cepas, 129 (90,2%) não apresentaram o gene *mec*A e tampouco foram resistentes à cefoxitina, outro antibiótico considerado marcador fenotípico desse gene. Entre os 14 isolados positivos para o *mec*A,

(9,8%), 5 (3,5%) eram *S. saprophitycus,* seguido por 3 (2,1%) cepas de *S. xylosus* e de *S. warneri* e por uma cepa (0,7%) de *S. epidermidis, S. chromogenes* e *S. haemolyticus*. Entre as 14 cepas, 2 foram resistentes ao antibiótico cefoxitina (*S. saprophyticus e S. chromogenes*) e 12 foram sensíveis, apesar da presença do gene. Considerando-se as mesmas 14 cepas, positivas para o gene *mec*A, 6 (42,9%) foram resistentes a oxacilina.

4. Discussão e Conclusão

Antimicrobianos são usados comumente para o controle de bactérias causadoras da mastite, sendo necessário monitorar a susceptibilidade dos patógenos envolvidos (Gentilini et al., 2002; Sawant et al., 2005; Luthje and Schwarz, 2006).

Na literatura pesquisada, foram encontrados poucos relatos de *Staphylococcus* isolados de leite de vacas saudáveis, dificultando a discussão desses resultados.

Embora biologicamente as cepas de animais saudáveis tenham demonstrado maior resistência, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Entre os trabalhos encontrados, poucos classificaram os ECNs até espécie (Machado et al., 2008; Pyorala and Taponem, 2009; Ferreira et al., 2010). Por esse motivo, usaremos o grupo ECNs no geral para facilitar a discussão dos resultados.

Lollai et al. (2008) analisaram a resistência à penicilina de *Staphylococcus* sp, isolados de mastite ovina na Itália, encontrando baixos valores para os S*. aureus* (4,1%) e *Staphylococcus* sp. (15,3%).

Pyorola & Taponen (2009), em uma revisão, relataram níveis de resistência a penicilina em *S. aureus* de 7% na Noruega, 7 a 12% na Europa, sendo esses valores semelhantes ao obtido em nosso estudo (7,15%). Valores maiores foram encontrados na Dinamarca (18 a 30%) e Finlândia (52%). Entre os ECNs, 25% das cepas apresentaram resistência, na Dinamarca; 32% na Finlândia, 36% na Noruega, sendo esses resultados semelhantes ao nosso, onde 26,5% dos ECNs foram resistentes a esse antibiótico. No entanto, segundo esses autores, valores maiores foram encontrados na Europa (41 a 61%). Essa grande variação encontrada talvez possa ser explicada pelo uso indiscriminado e inadequado da penicilina na medicina veterinária, selecionando assim cepas resistentes e, ainda, pela presença da β-lactamase em algumas cepas do *S. aureus.* Esta enzima consegue romper o anel β-lactâmico, a molecular fundamental no mecanismo de ação deste antibiótico (Andrade et al., 2000).

As cefalosporinas também contêm o anel β-lactâmico, diferenciando-se das penicilinas por apresentarem um anel diidrotiazina de seis membros em vez do anel tiazolidina de cinco membros (Madigan et al., 2004). No presente estudo, as cepas foram testadas com quatro tipos de cefalosporinas (CFO, CFE e CRX, CRO). Entre os ECNs isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, a resistência encontrada para esses antibióticos foram de 0%, 1,25%, 3,75% e 15%, respectivamente. Rajola-Schultz et al. (2004), nos EUA, não encontraram resistência entres os ECNs isolados para os antibióticos Cefalotina e Ceftiofur. Andrade et al. (2000) em Goiana/GO testaram cefaperazona entre os *S. aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, obtendo 8,25% de resistência.

Nunes et al. (2007), em Portugal, testaram cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* ao cefazolin e todas foram sensíveis. Entre os ECNs testados com cefotaxima e cefalexina por Machado et al. (2008), a resistência foi de 50,4% e 77%, respectivamente. Ferreira et al. (2010) no município de Teresina/Piauí encontram uma resistência a cefalotina de 13,33% entre os *Staphylococcus sp* isolados.

Poucos trabalhos foram encontrados utilizando o antibiótico sulfametoxazole/trimetoprim no controle da mastite. Em Recife/PE, nenhuma cepa de estafilococcos coagulase positiva foi resistente a esse antibiótico (Freitas et al., 2005), concordando com nossos resultados. Todas as cepas de *S. aureus* isoladas por Nunes et al. (2007) também foram sensíveis. Entre os ECNs testados por Rajola-Schultz et al., (2004), 12,5% foram resistentes a esse antibiótico. Machado et al. (2008) encontraram resistência de 52,2%, valor superior ao encontrado nesse estudo (1,25%).

A avaliação com gentamicina para as cepas de *S. aureus* foi de 3,4% de resistência na Argentina (Gentilini et al., 2000). No mesmo ano Andrade, et al., em Goiânia encontraram 9,28% de resistência. Em 2005, Freitas et al., encontraram 51% em Recife/PE. Em Barretos/SP, para Zafalon et al. (2007), a resistência foi de 13,9% e em Portugal nenhuma cepa apresentou resistência. Esses últimos valores estão de acordo com os encontrados nesse estudo, onde nenhuma das cepas apresentaram resistência, embora baixa resistência tenha sido descrita pelos primeiros autores. Entre os ECNs, o número de cepas resistentes foi de 44%, em estudo conduzido por Machado et al. (2008), discordando do presente, onde somente 2,5% apresentaram resistência.

Em 2000, Gentilini et al. não encontraram resistência a oxacilina em *S. aureus* isolados de mastite bovina. Rjala-Schultz et al. (2004) nos EUA encontraram 1,8% de resistência entre os ECNs isolados. Freitas et al. (2005), analisando estafilococos coagulase positiva, encontram 15% de resistência no Recife/PE. Em 2007, Nunes, et al. não encontraram cepas de *S. aureus* resistentes. Recentemente, Machado et al. (2008), em Ribeirão Preto/SP, encontraram 80,7% de resistência a oxacilina entre os *Staphylococcus sp* isolados. Esse valor foi superior ao encontrado por Ferreira et al. (2010) em Teresina/Piauí sendo 32,6% resistentes. Nosso estudo apresentou uma resistência muito baixa para esse antibiótico (15%).

Na maioria das vezes a resistência a oxacilina no *S. aureus* é determinada pela presença do gene *mec*A, gene responsável pela síntese da "penicillin-binding protein" (proteína ligadora de penicilina) 2a, ou 2' (PBP2a ou PBP2'), que possui baixa afinidade para a oxacilina e outros antimicrobianos β-lactâmicos. Esse gene faz parte de uma ilha genômica de resistência chamada "Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*" (SCCmec), podendo conter também outros genes de resistência a antimicrobianos (LOWY, 2003).

Segundo Nunes (2000), a resistência aos antimicrobianos não é um problema restrito a bactérias de ambiente hospitalar, estando também disseminada entre os micro-organismos da comunidade. Os MRSA associados à comunidade (CA-MRSA) estão mais associados ao SCCmec dos tipos IV e V carregando menos genes determinantes de resistência do que os I a III que são mais encontrados em infecções causadas por MRSA associados as cuidados de saúde pública (HCA-MRSA). Os tipos IV e V são elementos genéticos

menores e com mais mobilidade que os outros, com uma tendência a ser menos multirresistentes que os HCA-MRSA (Daum, 2007).

Moon et al. (2007), a partir de cepas isoladas de mastite bovina na Coréia, encontraram o gene *mec*A em 13 (62%) dos 21 MRSA e 12 (63,%) dos 19 MRCNS testados. Os MRCNS foram identificados em *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. xylosus, S. intermedius* e *S. hominis*.

Mais recentemente, Fleber, et al. (2010) encontraram 15 (12,4%) de 121 ECNs *mec*A positivos na Alemanha, sendo *S. epidermidis* (6,6%), *S. haemolyticus* (4,1%), *S. saprophyticus* (0,82%) e *S. capitis* (0,82%). Em nosso estudo, dentre os 14 ECNs (9,8%) que apresentaram o gene *mec*A 5 (3,5%) eram *S. saprophitycus,* 3 (2,1%) *S. xylosus* e *S. warneri* e 1 (0,7%) *S. epidermidis, S. chromogenes* e *S. haemolyticus*. Vanderhaeghen et al. (2010) analisaram 118 cepas de *S. aureus* isolados de mastite e 11 (9,3%) continham o gene *mec*A, sendo 9 dessas cepas isolados de mastite subclínica.

Em nosso estudo entre os 14 MRCNS apresentaram resistência de 50% para penicilina, 42,9% para oxacilina, 35,7% ao cefuroxima, 28,6% para sulfametaxazol/trimetropin, ceftriaxona, trimetropina e gentamicina, 21,4% para a cefalexina e 14% para a cefoxitina.

Pelos resultados obtidos pode-se observar a presença de *Staphylococcus* sp, isolados de leite de vacas com mastite ou saudáveis, resistentes a vários antimicrobianos. Esses dados sugerem que pode ocorrer a disseminação de cepas resistentes entre os animais saudáveis, reforçando a importância epidemiológica da mastite na produção leiteira e saúde pública.

Referências Bibliográficas

Andrade, M.A., Dias Filho, F.C., Mesquita, A.J., Rocha, P.T., 2000. Sensibilidade in vitro de *S. aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.Cienc. Animal. Bras. 1, 53-57.

Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J. Clin. Microbiol**.** 39, 2151–2156.

CLSI. Clinical and laboratory standards institute.2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Table: M100 - S19; 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne, PA 19087-1898 USA.

Daum, R.S., 2007. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. N Engl J Med. 357,380-90.

Ferreira, J.L.,Pigatto, C.P., Henriques, J.L.F., Lins, A., Aguiar Filho, J.L.C., Cavalcante, T.V., 2010. Bactérias causadoras de mastite subclínica em rebanhos leiteiros no município de Teresina, Piauí. Ver. Cient. Eletronica de Med. Vet. V.14.

Febler, A.T., Billerbeck, C., Kadlec, K., Schwarz. S., 2010. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. J. Ant. Chemo. 65, 1576-1582.

Contreras, A.; Corrales, J.C.; Sierra, D.; Marco, J., 1995. Prevalence and etiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. Small Rumin. Resear**.**., 17, 71-78.

De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aarestrup, F.M., 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. J. Dairy Sci. 83, 855-862.

Freitas, M.F.L., Pinheiro Júnior, J.W., Stamford, T.L.M., Rabelo, S.S.A., Silva, D.R., Silveira Filho, V.M., Santos, F.G.B., Sena, M.J., Mota, R.A., 2005. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. Arq. Inst. Biol. 72, 171-177.

Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M., DeGregorio, O., 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy. 83, 1224-1227.

Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Rodriguez, M., De Torrest, R.A., 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 85, 1913–1917.

Lollai, S.A., Ziccheddu, M., Mauro, C.D., Manunta, D., Nudda, A., Leori, G., 2008. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995-2004). Small Ruminant Research. 74, 249-254.

Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 111,1265-73.

Luthje, P., Schwarz, S., 2006. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. J. Antimicrob. Chemother. 57, 966–969.

Machado, T.R.O., Correa, M.G., Marin, J.M., 2008. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60, 278-282.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Microbiologia de Brock. 541p.

Martins, R.P., Silva, J.A.G., Nakazato, L., Dutra, V., Filho, E.S.A., 2010. Prevalência e Etiologia Infecciosa da Mastite Bovina na Microregião de Cuiabá, MT. Ci. Anim. Bras. 11, 181-187.

Melchior, M.B., Fink-Gremmels, J., Gaastra, W., 2006. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J. Vet. Med. B. 53, 326–332.

Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y.H., Park, Y.H., Joo, Y.S.; Koo, H.C., 2007. Phenotypic and genetic antibiogran of methicillin-resisteant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. J. Dairy Sci. 90, 1176-1185.

Murray, P.R. et al. (2007). Manual of clinical microbiology. 9.ed. Washington: ASM, 2256p.

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

Nunes, F.S., Cavaco, B.L.M., Vilela, C.L., 2007. Technical Note: Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. J. Dairy Sci. 90, 3242-3246.

Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Canadian Journal of Veterinary Research 66, 86-92.

Pitkala, A., Haveri, M., Pyorala, S., Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T., 2004. Bovine mastitis in Filand 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci. 87, 2433-2441.

Pol, M., Ruegg, P.L., 2007. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. American Dairy Science Association, 90, 262-273.

Pyorala, S., Taponen, S., 2009. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. Veterinary Microbiology, 134, 3-8.

Rajala-Schultz, P.J., Smith, K.L., Hogan, J.S., Love, B.C., 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. Vet. Microbiol. 102, 33-42.

Salmon, S.A., Watts, J.L., Aarestrup, F.M., Pankey, J.W., Yancey, R.J., 1998. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. J. Dairy Sci. 81, 570-578.

Sawant, A.A., Sordillo, L.M., Jayarao, B.M., 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. J. Dairy Sci. 88, 2991–2999.

Silva, E.R., Siqueira, A.P., Martins, J.C.D., Ferreira, W.P.B., Silva, N., 2004. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. Small Ruminant Research 55, 45-49.

Shitandi, A., Sternesjo, A., 2004. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large and small scale producers in Kenya. J. Dairy Sci. 87, 4145-4149.

Taponen, S., Pyorola, S., 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet. Microbiol. 134, 29-36.

Tenhagen, B.A., Koster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W., 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89, 2542-2551.

Vanderhaeghen, W., Cerpentier, T., Adriaensen, C., Vicca, J., Hermans, K., Butaye, P., 2010. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Vet. Microbial. 144, 166-17.

Zafalon, L.F., Nader Filho, A., Oliveira, J.V., Resende, F.D., 2007. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 577-585.

Wang, B., Liu, M.C., WU, C.M., Song, L.H., Shen, J.Z., 2007. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Hohehot. J. Vet. Med. 43, 30-32.