

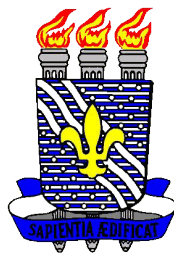
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**RESISTÊNCIA À METICILINA EM *Staphylococcus spp.* ISOLADOS DE  
CABRAS LEITEIRAS EM OHIO, EUA**

Guilherme Santana de Moura

Areia-PB

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Resistência à Meticilina em *Staphylococcus spp* isolados de Cabras Leiteiras  
em Ohio, EUA.**

Guilherme Santana de Moura

**Trabalho de conclusão de curso realizado  
apresentado como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em Medicina  
Veterinária pela Universidade Federal da  
Paraíba, sob orientação do Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>.  
Celso José Bruno de Oliveira**

Areia-PB  
2014

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da  
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.*

M929r Moura, Guilherme Santana de.

**Resistência à metilina em *Staphylococcus* spp isolados de cabras leiteiras em Ohio, EUA. / Guilherme Santana de Moura. - Areia: UFPB/CCA, 2014.**  
30 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Celso José Bruno de Oliveira.

1. Cabras leiteiras – Ohio-EUA 2. Metilina – Resistência 3. Leite – *Staphylococcus aureus* I. Oliveira, Celso José Bruno de (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 636.39

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Guilherme Santana de Moura

TÍTULO: Resistência à Meticilina em *Staphylococcus spp* isolados de Cabras  
Leiteiras em Ohio, EUA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção  
do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da  
Paraíba.

Aprovada em:  
Nota:

**Banca Examinadora**

---

Profº Dr. Celso José Bruno de Oliveira  
Univeridade Federal da Paraíba

---

Profª Drª. Suzana Aparecida Costa de Araújo  
Univerdidade Federal da Paraíba

---

Profº Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira  
Universidade Federal da Paraíba

---

Profº. Márcio de Castro Menezes  
Coordenação de TCC

## DEDICATÓRIA

À toda minha família, namorada e amigos,  
A todos que acreditaram no meu sonho e me incentivaram,  
Aos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, por me amar tanto e por sempre estar presente nas horas mais difíceis me protegendo e me livrando de todo o mal; pela benção que foi a minha graduação e tudo o que ela me proporcionou.

Aos meus pais e a minha irmã, por todo o amor, paciência, carinho e compreensão. Por SEMPRE acreditarem em mim em todos os momentos me dando o suporte necessário pra que eu conseguisse chegar até aqui. Por vocês eu me dediquei para retribuir todo o esforço que vocês fizeram para garantir a melhor educação que eu pude ter. Vocês são o meu maior exemplo. Essa vitória é nossa e não minha somente. Agradeço a Deus por ter a melhor família do mundo.

Aos minha avó Sila e minha Tia Berenice, que ajudaram ativamente na minha educação; sempre presentes em todos os momentos, me ajudando a enfrentar os desafios que apareceram, me dando carinho e amor incondicional.

Aos meusavós e tios paternos, por serem a inspiração para que eu escolhesse a Medicina Veterinária como profissão. A vocês eu devo todos os ensinamentos do campo e o amor no trabalho com animais.

À minha namorada Morgana, por ter me erguido na hora que eu precisava, por me ter trazido de volta a vontade de me dedicar a algo realmente valoroso. Muito Obrigado pelo seu amor. Agradeço a Deus por ter te encontrado e espero um dia retribuir todo este seu empenho em me fazer feliz.

À minha primeira orientadora de Iniciação Científica, Suzana Araújo, por ter aberto as portas do laboratório, pela confiança que a senhora depositou em mim sempre, pelo incentivo à pesquisa e as várias horas de orientação. Muito obrigado pela parceria e amizade.

Ao Professor Rafael Vieira que, mesmo não tendo sido meu orientador em pesquisa, se fez presente me orientando na vida acadêmica, me ajudando em muitas das questões relacionadas ao intercâmbio e também em questões pessoais. Muito Obrigado!

Aos meus mestres, orientadores e amigos, Valeska Shelda, Ricardo Romão, Danilo Stipp, Alexandre Alves, Patricia Givisiez, Paulo Sérgio e Mércia Barros, por todos os ensinamentos, as conversas, orientações e apoio. Muito Obrigado por acreditarem em mim e por me dar as oportunidades nos laboratórios, programas e atividades acadêmicas que contribuíram, e muito, para que conseguisse tudo o que eu construí na Medicina Veterinária.

Ao meu orientador e amigo Celso José Bruno de Oliveira, meu maior incentivador na vida acadêmica antes mesmo da veterinária. O senhor é um exemplo de pessoa e de profissional. O seu amor e talento pela ciência é algo inspirador. Muito Obrigado por todas as oportunidades que o senhor me proporcionou, por me orientar na vida pessoal, por não ter receio em opinar em decisões importantes para mim, pela oportunidade do intercâmbio e pela participação ativa em toda a minha formação.

A special thanks to all my friends in IDMEL team and The Ohio State University, Valeria, Obanda, Julius, Give, Joe, Dr. Molla, Grace and Noelle, for all your friendship, help and support to do my research, to believe in my potential as a visiting scholar and for made my life in Columbus more happy.

Dr. Gebreyes, thank you so much for this huge opportunity, for your orientation, for accept me in your laboratory and in the College of Veterinary Medicine, a so well-known University as Ohio State. It was an amazing experience for my career and my life.

Dr. Willian Shulaw, thank you for all your help, time, american culture classes, for my best purchase in the US, for drive me to the farms and, more than the other things, thank you so much for your friendship. I will never forget all that you did for me.

Aos meus amigos Aryanno Diógenes, Elaine Medeiros, Tarcísio Oliveira, Janaína Veras, Ana Paula Nunes e Raíssa Ataíde, que estiveram presentes durante toda minha trajetória acadêmica e na minha vida. Sem vocês tudo seria muito mais difícil. Saber que posso contar com vocês é sempre confortante e motivador. Muito Obrigado!

À minha amiga Karla Sousa, pela grande parceria ao longo desses anos, por confiar em mim, pela compreensão, por sempre estar presente na hora que precisei. Muito obrigado pela sua amizade.

## RESUMO

O leite e seus derivados podem ser contaminados por uma grande variedade de microrganismos patogênicos, dentre eles destaca-se o *Staphylococcus aureus*, bactéria importante na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos. Uma porcentagem crescente dos isolados que são encontrados das mais diferentes fontes, apresentam resistência à meticilina (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) podendo provocar doenças graves em seres humanos e animais. Este estudo tem como objetivo determinar a prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina em rebanhos caprinos no Estado de Ohio, EUA. Foram coletadas 120 amostras de leite e 120 amostras de swabs de tetos. Estas amostras foram processadas no Laboratório de Doenças Infecciosas e Epidemiologia Molecular da Universidade do Estado de Ohio (IDMEL – OSU). Após o isolamento microbiológico, foram realizadas a caracterização fenotípica e genotípica das colônias através de PCR para o genes *nuc* e *mecA*. Quinze amostras foram positivas para *S. aureus* (6,2%), nove de leite e seis a partir dos tetos. Dentre elas, cinco MRSA (2%) foram detectados, dois deles isolados do leite de cabra e outros três, isolados dos tetos. Também foram detectados três isolados (1,25%) que possuíam o gene *mecA* porém mostraram resultados negativos para o teste de coagulase. Este estudo é o primeiro a descrever a ocorrência de MRSA em rebanhos caprinos leiteiros norte-americanos. Isso é importante uma vez que, sem esse conhecimento, é impossível controlar de forma eficaz este organismo responsável por grande parte das infecções intramamárias clínicas sendo também um patógeno humano importante e motivo de grandes preocupações com a saúde pública.

Palavras-chave: Resistência, MRSA, caprinos, PCR.

## ABSTRACT

Milk and dairy products can be contaminated by a large number of pathogenic microorganisms including *Staphylococcus aureus*, an important bacteria in the epidemiology of foodborne illnesses. An increasing percentage of isolates from different sources, has shown resistance to methicillin (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA), and can cause serious diseases in humans and animals. This study aimed to determine the prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* in dairy goat herds in the State of Ohio. A total of 120 milk samples and 120 teat skin swabs samples were collected. These samples were processed in IDMEL - OSU, where the phenotypic and genotypic characterization of the colonies was performed by PCR for the *nuc* and *mecA* genes. Fifteen samples were positive for *S. aureus* (6.2%), nine from milk samples and six from skin samples. Among them, five MRSA (2%) were detected, two of them isolated from goat milk and other three, isolated from the skin of the teats. Three isolates (1.25 %) who had the *mecA* gene but showed negative results for coagulase test, were also detected. This study is the first to show the prevalence and characteristics of MRSA in American dairy goats. This is important because without this knowledge, it is impossible to effectively control this organism responsible for much of clinical intramammary infections and an important human pathogen and a cause of great concern for public health.

Keywords : Resistance , MRSA , goats , PCR .

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
2.2 <i>Staphylococcus</i> em Pequenos Ruminantes .....	13
2.3 Resistência Antimicrobiana de <i>Staphylococcus spp.</i> .....	15
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina – MRSA.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Seleção das Propriedades.....	17
3.2 Coleta das Amostras .....	17
3.3 Isolamento e Fenotipagem .....	19
3.4 PCR.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
5. CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

## 1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados podem ser contaminados por uma grande variedade de microrganismos patogênicos, dentre eles destaca-se o *Staphylococcus aureus*, bactéria importante na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos, seja pela sua alta prevalência, pelos riscos associados a manipulação durante a produção, ou pela produção de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares.

Um dos motivos pelo qual o *S. aureus* vem sendo frequentemente pesquisado é porque ele constitui um problema importante tanto do ponto de vista da medicina veterinária bem como em relação à saúde pública, já que este patógeno pode ser transmitido para a população humana através do contato direto com os animais ou pela ingestão de alimentos contaminados oriundos destes.

Uma porcentagem crescente dos isolados que são encontrados das mais diferentes fontes, apresentam resistência à meticilina (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) podendo provocar doenças graves em seres humanos e animais. Por isso, é importante compreender a epidemiologia do problema de modo que sejam desenvolvidas medidas que visem reduzir as infecções bem como ser capaz de criar abordagens terapêuticas eficazes. O MRSA pode espalhar entre os seres humanos ou de animais para humanos, ou da forma inversa, de humanos para animais. Devido a dificuldade no tratamento das infecções por MRSA, é essencial para entender as suas fontes comuns e os fatores de risco relacionados.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo determinar a prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em rebanhos caprinos leiteiros no Estado de Ohio.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi descoberta na década de 1880 comumente associada a infecções na pele e em tecidos moles causando condições dolorosas, como furúnculos, síndrome da pele escaldada e impetigo. As formas mais graves da infecção por *S. aureus* podem progredir para a pneumonia bacteriana e septicemia, ambas podem ser levar a morte dos indivíduos acometidos. *S. aureus* adquirido a partir de alimentos preparados ou armazenados de forma inadequada também pode causar uma forma de intoxicação alimentar.

*Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, catalase positivos que formam arranjos semelhantes a "cachos de uva", anaeróbios facultativos, e sensíveis à lisostafina (Huber & Huber, 1989). É reconhecido como patógeno capaz de sobreviver em alimentos refrigerados (Freitas et al., 2004). Cápsula, peptidoglicano, proteína A, adesinas, enzimas extracelulares, leucocidinas e hemolisinas são alguns dos fatores de patogenicidade encontrados neste gênero (Sousa, 2008 ;Trabulsi, 2002).

A característica isolada mais importante para classificar o gênero *Staphylococcus* é determinada pela prova da coagulase (Koneman et al., 2001), que avalia a capacidade de produção da enzima. Bactérias que produzem a coagulase são capazes de promover uma reação de coagulação, aglutinando o plasma humano ou de coelho. *S. aureus* são coagulase positivos (Devriese et al., 2005) e a incidência deste microrganismo é elevada em casos de infecção hospitalar (Faria et al., 2005; Burke, 2003).

### 2.2 *Staphylococcus* em Pequenos Ruminantes

Alguns trabalhos evidenciam maior incidência de *S. aureus* em rebanhos de cabras leiteiras em contraste com a presença dos *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN). Nestes casos, têm-se quadros mais severos de mastite (Ameh & Tari 2000). Santos et al. (2007) estudaram os aspectos clínicos e características do

leite de ovelhas com mastite induzida experimentalmente com a inoculação de *S. aureus*, sendo observado um quadro de mastite com evolução aguda dos sintomas em todas as ovelhas, sendo o tratamento empregado (antimicrobiano intramamário e sistêmico, além de anti-inflamatório não esteróide) eficiente na recuperação dos animais. Contudo, o dano causado às glândulas mamárias não foi revertido. *S. aureus* destaca-se como agente causador da mastite do tipo contagiosa, sendo seu tratamento difícil devido à elevada resistência (Fagundes & Oliveira 2004). As enterotoxinas produzidas por este microorganismo pertencem a uma grande família de toxinas produzidas por dois gêneros bacterianos: *Staphylococcus ssp.* e *Streptococcus ssp.* Em seres humanos, estas toxinas estão associadas com quadros de choque tóxico, além de intoxicações alimentares, diversas formas de alergias e doenças autoimunes (Balaban & Rasooly 2000).

Em pequenos ruminantes, o agente de maior prevalência em mastites clínicas é o *Staphylococcus aureus* (Santos, 2009) sendo responsável por muitos casos de mastite gangrenosa, o mais grave tipo de mastite, resultando muitas vezes no óbito dos animais, quando não, na perda parcial ou total do úbere. Neste quadro o animal apresenta um úbere com a pele azulada, fria e sem sensibilidade devido à necrose. O leite no início apresenta alguns grumos que rapidamente aumentam em quantidade. Em 24 horas pode haver apenas um líquido seroso ou sanguinolento.

A mastite gangrenosa pode ser causada por uma infecção mista por *Clostridium spp.* e *Staphylococcus aureus* conjuntamente (ou não) com *Mannheimia haemolytica* ou pela ação de uma alfa-toxina de *Staphylococcus aureus*, que causa lesão nos vasos sanguíneos, resultando em necrose isquêmica coagulativa de tecidos adjacentes (Quinn et al. 1994).

No Brasil, os estudos com epidemiologia molecular, envolvendo *S. aureus* isolados de caprinos e ovinos ainda são escassos (Aires-de-Sousa et al. 2007). Estes autores caracterizaram *S. aureus* isolados de casos de mastite subclínica nas espécies bovina, bubalina, caprina e ovina de diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro. Estes estudos demonstraram que apenas um clone foi responsável pela maioria dos casos de mastite subclínica em várias regiões do estado do Rio de Janeiro. Além disso, observou-se que este clone não apresenta hospedeiros específicos, tendo a capacidade de colonizar e causar infecção nas diferentes espécies animais.

### 2.3 Resistência Antimicrobiana de *Staphylococcus spp.*

Alexander Fleming observou inibição do crescimento em sua placa de ágar em que ele cultivava cepas de *Staphylococcus spp.* Ele verificou que um microorganismo que viria a ser chamado de *Penicillium notatum*, foi a causa da inibição do *Staphylococcus* em torno dele, como resultado de alguma substância química excretada para o meio. Isso marcou o início da descoberta do potencial da penicilina, em conjunto com vários outros diferentes agentes antimicrobianos, no combate as doenças infecciosas, tratando e curando milhões de seres humanos e animais.

No entanto, em 1940, um número de falhas no tratamento e ocorrência de algumas bactérias como o *Staphylococcus spp.* que possuíam a capacidade de crescer na presença de penicilina, foi o início da era da resistência antimicrobiana e da percepção de que, após o uso contínuo e indiscriminado dessas drogas, elas perderiam o efeito contra as bactérias devido à pressão seletiva que estava sendo exercida pela utilização destes agentes. No entanto, os agentes antimicrobianos têm sido melhorados ao longo dos anos, combatendo com sucesso as doenças infecciosas até os dias de hoje.

O aumento da prevalência da resistência tem sido relatada em muitos patógenos, em diferentes regiões do mundo, incluindo os países em desenvolvimento (Byarugaba, 2005). Isto tem sido atribuído à evolução das características microbianas, pressões seletivas do uso de antimicrobianos, e as alterações sociais e tecnológicas que melhoram o desenvolvimento e transmissão de organismos fármaco-resistentes. Embora a resistência antimicrobiana seja um fenômeno biológico natural, muitas vezes reforçada como consequência da adaptação dos agentes infecciosos pela exposição aos antimicrobianos usados em seres humanos ou na agricultura aliado ao uso generalizado de desinfetantes na fazenda e em domicílios (Walsh, 2000), acredita-se que o uso de antimicrobianos é o mais importante responsável pelo aumento da resistência antimicrobiana (Aarestrup et al, 2001; Byarugaba, 2004).

O *Staphylococcus aureus* pode exemplificar melhor do que qualquer outro agente patogênico humano a evolução adaptativa das bactérias na era dos antibióticos. Ele tem demonstrado uma capacidade única para responder rapidamente a cada novo antibiótico com o desenvolvimento de um mecanismo de

resistência, começando com a penicilina e metilina, até os mais recentes, a linezolida e daptomicina. Os mecanismos de resistência incluem inativação enzimática do antibiótico (penicilinase e enzimas de modificação de aminoglicósido), alteração do alvo com a diminuição da afinidade para com o antibiótico (sendo exemplos notáveis: proteína de ligação à penicilina 2a resistente à metilina de *S. aureus* e D - Ala - D - Lac de precursores peptidoglicano de estirpes resistentes à vancomicina), a interceptação do antibiótico (para vancomicina e possivelmente daptomicina) e bombas de efluxo (fluoroquinolonas e tetraciclinas). Matrizes genéticas complexas (elemento cromossômico estafilocócico - cassete *mec* ou o operon *vanA*) foram adquiridas por *S. aureus* através de transferência horizontal de genes, enquanto a resistência a outros antibióticos, incluindo alguns dos mais recentes (por exemplo as fluoroquinolonas, linezolida e daptomicina) desenvolveu-se através de mutações espontâneas e seleção positiva. A detecção dos mecanismos de resistência e sua base genética é um importante apoio para a vigilância da susceptibilidade a antibióticos em *S. aureus* (Pantosti, 2007).

#### **2.4 *Staphylococcus aureus* Resistente à Metilina – MRSA**

No final de 1940 e durante toda a década de 1950, *S. aureus* desenvolveu resistência à penicilina. A metilina, uma forma de penicilina, foi introduzida para combater o problema crescente de *S. aureus* resistente a penicilina. A metilina foi um dos tipos mais comuns de antibióticos usados para tratar infecções por *S. aureus* mas, em 1961, cientistas britânicos identificaram as primeiras cepas de *S. aureus* que resistiram à metilina. Este foi o chamado nascimento do MRSA.

MRSA é realmente resistente a uma classe inteira de antibióticos penicilínicos chamados de beta-lactâmicos. Essa classe de antibióticos inclui penicilina, amoxicilina, oxacilina, metilina, e outros.

*S. aureus* está evoluindo ainda mais e começou a mostrar resistência aos antibióticos adicionais. Em 2002, médicos nos Estados Unidos documentaram as primeiras cepas resistentes ao antibiótico vancomicina, que vinha sendo utilizado como antibiótico de última instância para uso contra *S. aureus*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção das Propriedades**

As propriedades foram escolhidas através de um banco de dados mantido pelo Colegio de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Ohio, onde os proprietários foram convidados a participar do experimento por contato via correio eletrônico. Ao passo que recebíamos a confirmação da participação, as visitas foram sendo agendadas.

#### **3.2 Coleta das Amostras**

A coleta das amostras foi realizado seguindo os horários regulares das ordenhas obedecendo a rotina de cada propriedade e foi dividida em duas etapas:

##### Swab de teto

Após a contenção dos animais, um swab estéril foi friccionado na pele dos tetos das cabras. Depois disso, os swabs foram colocados em um tubo de ensaio, também estéril, contendo 5mL de caldo Müller-Hinton com 6.5% de NaCl.

##### Leite

Após a higienização do teto com álcool 70%, prosseguimos com a coleta do leite; foi desprezado o primeiro jato e depois coletado 10mL de leite em tubo de ensaio estéril.



**Figura 1.** Coleta de leite em tubo estéril.

Todas as amostras foram acondicionadas em caixa térmica e levadas até o Laboratório de Doenças Infecciosas e Epidemiologia Molecular (IDMEL-OSU) onde estas foram processadas.



**Figura 2.** Acondicionamento das amostras em caixa térmica para transporte ao laboratório.

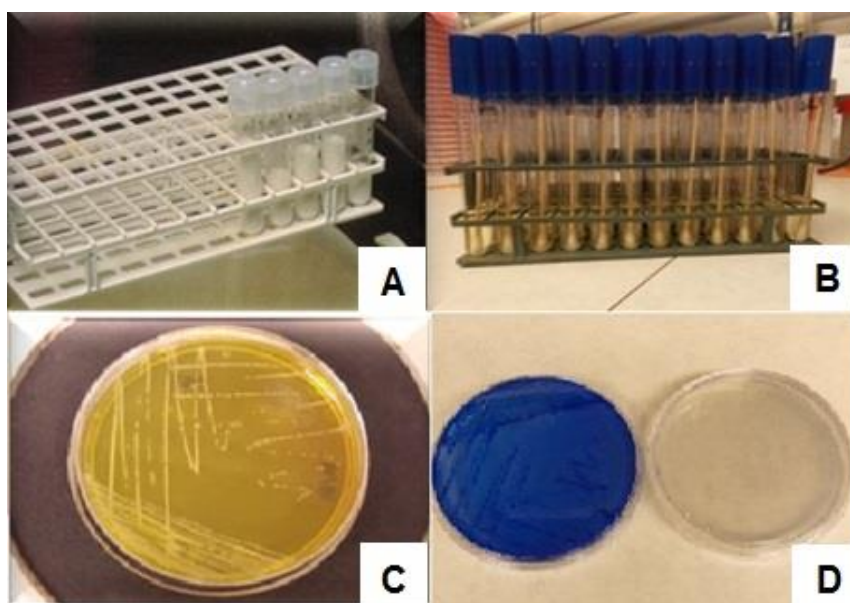
### 3.3 Isolamento e Fenotipagem

#### Amostras de leite

Foram inoculadas diretamente em placas de Ágar Manitol Salgado (Mannitol Salt Agar - MSA) e também em placas de Ágar de Triagem para resistência à Oxacilina (Oxacillin Resistance Screening Agar - ORSA)(Figura 3D). Ambas as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 12h. Nas placas de Manitol Salgado, foram selecionadas colônias com características típicas (pequenas, arredondadas, nas cores branca e amarela e que tornasse o meio amarelo) (Figura 3.C) e inoculadas em placas de ágar Müller-Hinton e reincubadas em estufa a 37°C por mais 12h. Depois disso, foram realizados os testes de Catalase e Coagulase para que fossem identificados fenotipicamente os estafilococos coagulase positivo e negativo.

#### Amostras de Swab de Pele

Os swabs, colocados em caldo Müller-Hinton com 6,5% de NaCl (Figura 2B), foram incubados previamente por 12h em estufa a 37°C para depois seguirem protocolo semelhante ao que foi feito com as amostras de leite.



**Figura 3.** (A) Amostras de leite; (B) Amostras de swab de pele em Caldo Müller Hinton com 6,5% de NaCl; (C) Placa de Manitol Salgado com colônia de *S. aureus*; (D) Placa de ORSA com crescimento bacteriano ao lado do controle negativo.

### 3.4 PCR

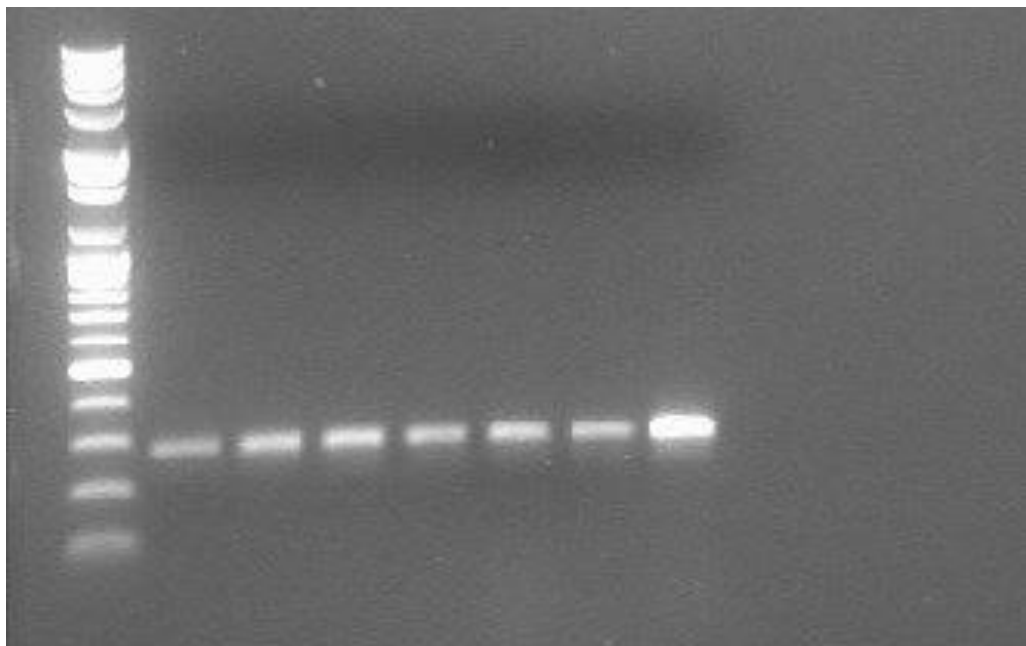
#### Extração e Purificação do DNA

As colônias foram repicadas em meio Müller-Hinton antes da extração do DNA. Foi utilizado o kit comercial QIAGEN DNeasy® Blood and Tissue para extração e purificação do DNA seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

#### PCR e Eletroforese em gel de agarose

A técnica foi realizada para detectar o gene *nuc*, que codifica a nuclease termoestável do *Staphylococcus aureus*, e o gene *mecA* que codifica a gene responsável pela resistência à Meticilina. Foram utilizadas placas de 96 poços do kit comercial Illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads. A cada poço, foram adicionados 24µL de uma pré-mistura constituída de primers e água purificada livre de RNase acrescidas de 1µL de DNA. O gene *nuc* foi detectado utilizando os primers *nuc1* 5'GCGATTGATGGTGATACGGTI-3' e *nuc2* 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'. O PCR foi efetuado sob as seguintes condições: desnaturação 94°C durante 1 minuto, hibridação a 55°C durante 0,5 minutos e extensão a 72 °C durante 1,5 minutos no total de 37 ciclos. Após o ciclo final, a reação foi terminada mantendo-o a 72 °C durante 3,5 min. Os produtos de PCR foram armazenados no termociclador, a 4°C até serem colhidas. O gene *mecA* foi detectado utilizando os primers *mecA* F5'-GGCTATCGTGTCACAATCG-3' e *mecA* R5'- CTGGAACTTGTTGAGCAGAG-3'. Os ciclos da reação foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 92°C por 45 segundos; 50°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo a 72°C por 4 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio; foi utilizado marcador de massa molecular de 1Kb. A presença de fragmentos de 533pb resultantes dos produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador e fotografados.



**Figura 4.** Produtos do PCR para o gene *nuc* após eletroforese em gel de agarose.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes fenotípicos, 65 amostras apresentaram crescimento bacteriano no ágar Manitol Salgado e mudaram a coloração deste de vermelho para amarelo, com colônias arredondadas, pequenas, brancas ou amarelas, sendo consideradas negativas aquelas com crescimento de colônias exudativas, sem forma definida e que não alteraram a cor do meio, ou que mudaram o meio para as cores laranja ou rósea.

Nas placas de Ágar de Triagem para Resistência à Oxacilina, 35 amostras apresentaram crescimento bacteriano, tornando o meio na cor azul. As placas que não apresentaram crescimento foram consideradas negativas.

As 65 amostras consideradas positivas no MSA foram submetidas aos testes de coagulase e catalase onde 15 amostras mostraram a capacidade de coagular o soro de coelho, destas, 9 foram de amostras de leite e 6 de amostras da pele. Todas as amostras foram positivas ao teste da catalase (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Resultados dos testes fenotípicos realizados nas amostras de leite e swab de pele.

	Leite	Pele
<b>MSA(240)</b>		
Positivo	12	53
Negativo	228	187
<b>ORSA(240)</b>		
Positivo	15	20
Negativo	225	220
<b>Coagulase(65)</b>		
Positivo	9	6
Negativo	3	47
<b>Catalase(65)</b>		
Positivo	12	53
Negativo	0	0

O Ágar Manitol Salgado é considerado um meio específico para *Staphylococcus spp.* já que estes organismos têm a capacidade de fermentar o manitol, alterando o pH transformando o meio da cor vermelha (vermelho de fenol) para cor amarela. Entretanto, outros microorganismos possuem também a capacidade de crescer neste mesmo meio, porém, não conseguem fermentar o manitol totalmente ou suas colônias tem aspecto exudativo e com odor forte (Haran, 2012).

As colônias que são capazes de crescer em meio enriquecido com Oxacilina mostram fenotipicamente capacidade de resistir a essa droga e a outras penicilinas semi sintéticas como a Meticilina, Nafcilina e Dicloxacilina que possuem radicais que as protegem contra a ação das beta-lactamases. Porém, o mecanismo pelo qual essas bactérias são resistentes apenas pode ser elucidado totalmente através de testes moleculares (Moon, 2007) .

O teste da coagulase é utilizada para distinguir espécies patogênicas de *Staphylococcus.spp* de espécies não patogênicas, sendo um bom indicador da virulência do *S.aureus*.

Em relação ao perfil genético, as 65 colônias positivas para crescimento em MSA foram submetidas ao PCR para detecção dos genes *nuc* e *mecA*. Destas, 15 das amostras continham o gene *nuc* em seu DNA, 9 delas eram de amostras de leite e 6 de pele. Todas as 15 amostras positivas ao teste da colagulase também foram positivas no PCR para o gene *nuc* o que é confirmatório para *S. aureus*. Para o gene *mecA*, foram detectadas 8 amostras positivassendo 2 do leite e 6 da pele. Dentre esses isolados, 5 apresentaram ambos os genes confirmando geneticamente a presença de MRSA. Os outros 3 isolados não possuíam o gene *nuc* sendo considerados *Staphylococcus spp.* Coagulase Negativa Resistentes à Meticilina (MR-CNS) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Frequência de detecção dos genes *nuc* e *mecA* nas amostras de leite e swab de pele positivas para crescimento em Ágar Manitol Salgado.

	<b>Gene <i>nuc</i></b>	<b>Gene <i>mecA</i></b>
<b>Leite</b>	9	2
<b>Pele</b>	6	6
<b>Total</b>	15	8

A presença de *Staphylococcus spp.* é um achado comum em rebanhos no mundo todo. Esse genero de bactérias é um microorganismo comensal da pele de todos os animais domésticos e está frequentemente associado a infecções clínicas e subclínicas das glândulas mamárias (Ameh, 2000).

**Tabela 3.** Prevalências de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.* Coagulase Negativa (CNS), *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) e *Staphylococcus spp.* Coagulase Negativa Resistente à Meticilina (MR-CNS) em amostras de leite e pele.

	<b>S. aureus</b>	<b>CNS</b>	<b>MRSA</b>	<b>MR-CNS</b>
<b>Leite (120)</b>	<b>9 (7,5%)</b>	<b>3 (2,5%)</b>	<b>2 (1,7%)</b>	<b>0</b>
<b>Pele (120)</b>	<b>6 (5%)</b>	<b>47 (39,1%)</b>	<b>3 (2,5%)</b>	<b>3 (2,5%)</b>
<b>TOTAL 240 (100%)</b>	<b>15 (6,2%)</b>	<b>50 (20,83%)</b>	<b>5 (2%)</b>	<b>3 (1,25%)</b>

Na **tabela 3** temos as prevalências dos microrganismos encontrados no estudo. Ao final, foram detectadas quinze amostras positivas para *S. aureus* (6,2%), nove de leite e seis a partir de amostras de pele. Dentre elas, cinco MRSA (2%) foram detectados, dois deles isolados do leite de cabra e outros três, isolados da pele dos tetos. A prevalência de MRSA em leite e produtos lácteos registrada em diferentes países ou mesmo regiões de um mesmo país difere significativamente.

Foram registradas altas prevalências de MRSA em leite produzido na maioria dos países africanos, por exemplo, 60,3% na Etiópia. A prevalência de MRSA em países asiáticos varia de alta, por exemplo, 28,3% no Irã (Mirzaei et al. 2012), para baixo, como na Coreia e Japão (Hata et al.2010; Moon et al.2007). Na maioria dos países europeus, a prevalência de MRSA em leite e produtos lácteos tem sido geralmente considerada baixa (Pexara et al, 2013). Nos Estados Unidos, as prevalências de MRSA em rebanhos de vacas leiteiras gira em torno de 1,3% a 4% (Haran et al, 2012), mas não há relatos de MRSA em rebanhos caprinos americanos.

Também foram detectados três isolados (1,25%) que possuem o gene *mecA* porém mostraram resultados negativos para o teste de coagulase. A maioria dos países desenvolvidos relata um aumento da quantidade de *Staphylococcus spp.* coagulase negativa resistentes a metilinafato esse que é confirmado com a presença do gene *mecA*.

## **5. CONCLUSÃO**

Mesmo com uma baixa prevalência em rebanhos caprinos (2%), devemos atentar para os animais positivos para MRSA já que estes podem ser considerados como reservatórios e disseminadores do patógeno para outros animais, seres humanos e no ambiente. Além disso, as enfermidades causadas por MRSA são consideradas sérias para saúde pública, sendo assim, é importante manter o monitoramento das cepas resistentes nas mais diversas fontes, incluindo os animais de produção, através de técnicas de epidemiologia molecular determinando a origem destas, o que nos ajuda no desenvolvimento de medidas profiláticas adequadas.

Este estudo é o primeiro a determinar a prevalência e características de MRSA em rebanhos caprinos americanos. Isso é importante uma vez que, sem esse conhecimento, é impossível de controlar de forma eficaz a este organismo responsável por grande parte das infecções intramamárias clínicas sendo também um patógeno humano importante e motivo de grandes preocupações com a saúde pública.

## REFERÊNCIAS

- AIRES-DE-SOUSA M., PARENTE C.E.S.R. VIEIRA-DA-MOTTA O., BONNA I.C.F., SILVA D.A. & LENCASTRE H. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**. 73(12):3845-3849; 2007.
- AMEH M.J.A.; TARI I.S. Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. **Small Ruminant Research**. 35:1-5; 2000.
- BALABAN N.; RASOOLY A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal of Food Microbiology**. 61:1-10; 2000.
- BURKE J. Infection control: a problem for patient safety. **New England Journal of Medicine**. 348(7):651–656; 2003.
- BYARUGABA DK. Antimicrobial resistance and its containment in developing countries. *Antibiotic Policies: Theory and Practice* New York: **Springer**, pp. 617-646; 2005.
- BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobials Agents** 24: 105–110; 2004.
- COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SORAES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P. & SOUZA, M.M.S. - Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. **Ciência Rural**, 37 (1): 195-200, 2007.
- COSTA, A. M.; KAY, I.; PALLADINO, S. Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in staphylococci by real-time multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic microbiology and infectious disease**; Volume 51 issue 1 Pages 13-17 DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.014; 2005.

DEVRIESE L.A., VANCANNEYT M., BAELEM., ET AL. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. Nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**. 55:1569-73; 2005.

DUIJKEREN, E.V.; BOX, A.T. A.; HECK, M.E.O.C.; WANNET, W.J.B. & FLUIT, A.C. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, 103: 91–97, 2004.

FAGUNDES H. & OLIVEIRA C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**. 34(4):1315-1320; 2004..

FARIA N.A., OLIVEIRA D.C., WESTH H., ET AL. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. **Journal of Clinical Microbiology**. 43:1836-42; 2005.

FREITAS W.C., SOUZA E.L., SOUSA C.P., TRAVASSOS A.E.R. Ocorrência de *Staphylococcus spp.* em massa refrigerada tipo pizza pronta. **Higiene Alimentar**. 122:67-70; 2004.

GHARIB, AHLAM A., ATTIA, ADEL M.A.; BENDARY, M.M. Detection of the Coa Gene in *Staphylococcus aureus* from Different Sources by Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Microbiological Research** 4 (1): 37-42, 2013.

HARAN K.P., GODDEN S.M., BOXRUD D., JAWAHIR S., BENDER J.B., SREEVATSAN S. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology** 50:688-695; 2012.

HATA E, KATSUDA K, KOBAYASHI H, UCHIDA I, TANAKA K, EGUCHI M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. **Journal of Clinical Microbiology** 48:2130-2139; 2010.

HUBER, M. M.; HUBER, T. W. Susceptibility of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* to lysostaphin. **Journal of Clinical Microbiology**; 27:1122-4; 1989.

JONES, R. D. ET AL. Prevalence of oxacillin- and multiresistant Staphylococci in clinical samples from dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 230, 2007.

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

KONEMAN E.W., ALLEN S.D., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER P.C., WINN W.C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

LO TURCO, RAQUEL O. Quantificação e identificação genotípica do gene COA de *Staphylococcus aureus* a partir de queijos e embutidos. 36f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

LOEFFLER, A; LLOYD, D. H. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? **Epidemiology and Infection**, n. 138, p. 595-605, 2010.

MIRZAEI H., FARHOUDI H., TAVASSOLI H., FARAJLI M., MONADI A. Presence and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk and ice cream in Tabriz by culture and PCR techniques.

**African Journal of Microbiology Resistance** 6: 6224-6229; 2012.

MOON JS, LEE AR, KANG HM, LEE ES, KIM MN, PAIK YH, PARK YH, JOO Y-S, KOO HC. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science** 90:1176-1185; 2007.

O'MAHONY R., ABBOTT Y., LEONARD F.C., MARKEY B.K., QUINN P.J., POLLOCK P.J., FANNING S., ROSSNEY A. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel. 2005.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, [S.l.], v. 10, n. 1, nov. 2009. ISSN 1518-1944. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/index.php/fen/article/view/8011/5794>>. Acesso em: 09 Fev. 2014. doi:10.5216/ree.v10i1.8011.

PANTOSTI A, SANCHINI A, MONACO M.; Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**. Jun;2(3):323-34; 2007.

PEXARA, A., SOLOMAKOS, N., GOVARIS, A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products - **Journal Hellenic Of Veterinary Medicine Society**, 64(1): 17-34; 2013.

SANTOS R.A., MENDONÇA C.L., AFONSO J.A.B. & SIMÃO L.C.V. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 27(1):6-12; 2007.

SANTOS, L. M. M. Mastite caprina: etiologia e influência na qualidade do leite. **Dissertação de Mestrado**: Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro. 52p; 2009.

SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABÁK, V.; RYSÁNEK, D.

*Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology** 92: 327–334, 2003.

SEYFARTH F. M., EMBORG, A. M., ET AL. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents Chemother** 45: 2054–2059; 2001.

SOUSA C.P. Mecanismos de patogenicidade de células bacterianas: resistência a agentes antimicrobianos. **LaesHaes**; 171:130-42; 2008.

STASTKOVA, Z.; KARPISKOVA, S.; R. KARPISKOVA, R. - Occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm. **Veterinarni Medicina**, 54, (9): 419–426, 2009.

TRABULSI L.R., ALTERTHUM F., GOMPERTZ O.F., CANDEIAS J.A. **Microbiologia. 3. ed.** São Paulo: Atheneu; 2002.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature** 406:775–781; 2000.