

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Staphylococcus aureus* NA CADEIA PRODUTIVA DE
SUÍNOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS**

Guido Carlos Iselda Hermans Masson
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Staphylococcus aureus* NA CADEIA PRODUTIVA DE
SUÍNOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS**

Guido Carlos Iselda Hermans Masson

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária)

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2011

Masson, Guido Carlos Iselda Hermans
M419s Staphylococcus aureus na cadeia produtiva de suínos e perfil de
resistência a antimicrobianos./ Guido Carlos Iselda Hermans Masson.
-- Jaboticabal, 2011
xiii, 60 f.; Il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho
Banca examinadora: Everlon Cid Rigobelo, Luiz Carlos Marques,
Mário Roberto Hatayde, Anibal de Sant'Anna Moretti
Bibliografia

1. MRSA. 2. Suínos. 3. Biofilme. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guido Carlos Iselda Hermans Masson – nasceu em Campinas aos 25 dias de junho de 1978. Ingressou em 1999 na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade José do Rosário Velano (UNIFENAS) em Alfenas – MG, formando-se em 2003. Atuou como Médico Veterinário na Clínica Veterinária Mundo Animal em Campinas - SP e posteriormente como representante técnico na área de suínos da NUTREMIX – Nutrição Animal em Monte Alto – SP. No ano de 2006 iniciou o mestrado junto ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de Jaboticabal na área de concentração de Clínica Médica Veterinária. Durante o curso desenvolveu o projeto de pesquisa intitulado “Infecção experimental por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Panama e tentativa de infecção experimental em leitões desmamados” obtendo o título de mestre em fevereiro de 2008. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de doutorado na mesma instituição. No ano de 2010 foi professor substituto junto ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – Unesp ministrando a disciplina “Clínica Médica de Suínos”. Atualmente é fiscal estadual agropecuário da Agência Goiânia de Defesa Agropecuária (Agrodefesa) do Estado de Goiás.

Cada um se movimenta, no mundo, no campo onde as possibilidades melhores estão colocadas para o seu crescimento. Nem sempre se recebe o que se merece. Antes, são propiciados os recursos para mais amplas e graves conquistas, que darão resultados mais valiosos.

Joanna de Ângelis

DEDICATÓRIA

A meu pai Guido August (in memorian) que me estimulou a crescer e sempre se orgulhou de minhas conquistas.

À minha filhinha Ana Beatriz (in memorian) que em tão pouco tempo me revelou uma nova maneira de ver a vida e me transmitiu o amor mais puro, doce e gostoso de sentir, tirando - me sorrisos e afastando-me a tristeza.

“Os ventos que as vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar.

Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado.

Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre.”

Bob Marley

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente e expressar meu reconhecimento a todos que de várias maneiras colaboraram e contribuíram não apenas para a realização deste trabalho, mas também por participarem desta conquista. Na impossibilidade de nomear cada um, deixo meu agradecimento pelo contributo prestado e que de alguma maneira encontrem aqui minha expressão de amizade e reconhecimento.

À Unesp e aos professores e funcionários do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo apoio e oportunidades ao longo desta jornada com carinho especial para Cláudia, Renata, Paulo, Diba e Lila.

Ao prof. Dr. Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho pela sabedoria, orientação, confiança e amizade.

À prof^a. Dr^a. Ana Lúcia da Costa Darini pela orientação, auxílio nas análises moleculares e permissão de uso de seu laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Câmpus de Ribeirão Preto.

À Joseane Cristina Ferreira pelas sugestões, ensinamentos práticos de biologia molecular repassados e principalmente pela dedicação e auxílio na execução das análises moleculares.

Aos meus pais, com carinho especial à minha mãe, que me deram a vida e a possibilidade de crescimento profissional sempre me apoiando e incentivando meus projetos e propósito de vida.

À minha querida esposa Guadalupe por todo apoio, incentivo, paciência e principalmente por compartilhar muitos momentos marcantes e inesquecíveis em minha vida. Também agradeço por ser minha companheira naqueles momentos de sacrifício e dificuldade.

À FAPESP pelo financiamento do projeto (proc. N°08/53919-3) e ao CNPq pela concessão de bolsa.

A Deus pelos ensinamentos e oportunidade da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRAC.....	xiv
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	3
2.2 Aspectos Epidemiológicos.....	4
2.3 <i>Staphylococcus</i> na clínica de suínos.....	8
2.4 <i>Staphylococcus</i> na linha de abate de suínos.....	10
2.5 Uso de antimicrobianos em suinocultura.....	12
III OBJETIVOS.....	15
IV MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Colheita das amostras.....	16
4.2 Análises microbiológicas.....	19
4.2.1 Identificação bioquímica	19
4.2.2 Identificação molecular.....	20
4.3 Obtenção do DNA genômico.....	21
4.3.1 Reação da cadeia da polimerase (PCR).....	22
4.3.2 Eletroforese em gel de agarose.....	24
4.4 Teste de resistência a antimicrobianos.....	25
V RESULTADOS.....	26
5.1 Análises microbiológicas.....	26
5.1.1 Identificação bioquímica.....	26
5.1.2 Identificação molecular.....	32

5.2	Teste de resistência a antimicrobianos.....	38
VI	DISCUSSÃO.....	41
VII	CONCLUSÕES.....	46
VIII	REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de animais amostrados por granja e fase do ciclo de produção em função do número de matrizes alojadas, valores entre parênteses, prevalência estimada maior que 20% e grau de confiança de 95%. Jaboticabal, 2011.....	17
Tabela 2. Número amostras colhidas da cavidade nasal, pernil, sala de desossa e utensílios utilizados ao longo da linha de abate de suínos em dois frigoríficos no Estado de São Paulo. Jaboticabal, 2011.....	18
Tabela 3. Primers utilizados na PCR para detecção de gene de resistência ao β – lactâmico (<i>mecA</i>), gene da coagulase (<i>coa</i>) e genes de virulência (<i>icaA</i> e <i>icaD</i>). Jaboticabal, 2011.....	23
Tabela 4. Etapas para amplificação dos genes <i>mecA</i> , <i>coa</i> , <i>icaA</i> e <i>icaD</i> . Jaboticabal, 2011.....	23
Tabela 5. Primers utilizados na PCR para detecção de genes específicos para <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. schleiferi subsp. coagulans</i> e <i>S. hyicus</i> . Jaboticabal, 2011.....	24
Tabela 6. Resultados das análises microbiológicas encontradas após a colheita de amostras de suabes da cavidade nasal de suínos em diferentes fases do ciclo de produção, suabes da cavidade nasal e das mãos de funcionários de cada granja. Jaboticabal, 2011.....	30
Tabela 7. Resultados das análises microbiológicas encontradas após a colheita de amostras de suabes da cavidade nasal de suínos, utensílios utilizados pelos magarefes, suabe de arrasto da porção interna do pernil e da sala de desossa ao longo do processo de abate de suínos em dois frigoríficos no Estado de São Paulo. Jaboticabal, 2011.....	31

Tabela 8. Amostras amplificadas após PCR utilizando primer específico para <i>S. aureus</i> a partir de isolados da cavidade nasal de suínos, cavidade nasal e mãos de funcionários de suinocultura. Jaboticabal, 2011.....	34
Tabela 9. Amostras amplificadas após PCR utilizando primer específico para <i>S. aureus</i> a partir de isolados da cavidade nasal de suínos, pernil, utensílios e desossa. Jaboticabal, 2011.....	35
Tabela 10: Principais fases do ciclo de produção de suínos em que se observou resistência a antimicrobianos de <i>S. aureus</i> isolados de suínos. Jaboticabal, 2011.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Meio de cultura ágar Braid-Parker. Observar a presença de colônias de coloração preta circundadas com halo transluzente características de <i>S. aureus</i> . Amostra isolada de suabe da cavidade nasal de suíno. Jaboticabal, 2011.....	27
Figura 2. Placa de petri com ágar sangue de carneiro 5%. Observar a presença de colônias de aspecto amarelado e formadoras de β hemólise. <i>S. aureus</i> isolado da cavidade nasal de suínos. Jaboticabal, 2011.....	27
Figura 3. Avaliação morfológica e tintorial em esfregaço fixado. Identificação de cocos Gram positivos. Observar as formações com aspecto de cachos de uva (setas) características de <i>S.aureus</i> . Amostra isolada de suabe nasal de suíno. Microscópio óptico com óleo de imersão (1000x). Jaboticabal, 2011.....	29
Figura 4. Prova do MRVP positiva, com formação de anel rosado. Ao lado direito algumas variações encontradas. <i>S.aureus</i> isolado da cavidade nasal de suínos. Jaboticabal, 2011.....	29
Figura 5. Prova da DNase positiva sugestiva de <i>S. aureus</i> . Colônia amarela com formação de halo claro ao redor (seta) devido a degradação da enzima DNase. Amostra isolada da cavidade nasal de suíno. Jaboticabal, 2011.....	30
Figura 6. <i>S. aureus</i> isolados ao longo da cadeia produtiva de suínos e sua distribuição entre cinco granjas de suínos (G1, G2, G3, G4 e G5) na região de Jaboticabal – SP. PL - Porca lactante, LL – leitão lactente, LC- leitão de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação, FN – amostra colhida da cavidade nasal de funcionário, FM – amostra colhida das mãos dos funcionários. Jaboticabal, 2011.....	31

Figura 7. Representação gráfica do número de <i>S. aureus</i> isolados na linha de abate de suínos. Amostras colhidas em dois frigoríficos (F1 e F2) no Estado de São Paulo. Utensílios - facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate. Jaboticabal, 2011.....	32
Figura 8. Identificação molecular de <i>S. aureus</i> em granjas (G1, G2, G3, G4 e G5) e fase do ciclo de produção (PL - porca lactante, LL – leitão lactente, LC- leitão de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação, FN – amostra colhida da cavidade nasal de funcionário, FM – amostra colhida das mãos dos funcionários) após PCR. Jaboticabal, 2011.....	33
Figura 9. Representação gráfica do número de <i>S. aureus</i> isolados na linha de abate de suínos. Amostras colhidas em dois frigoríficos (F1 e F2) no Estado de São Paulo. CN – cavidade nasal. Utensílios (Facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate). Jaboticabal, 2011.....	35
Figura 10. Identificação do gene de virulência <i>icaA</i> amplificado a 1315 pares de base (pb) a partir de amostras de <i>S. aureus</i> isolados da cavidade nasal de suínos. Da esquerda para a direita, peso molecular de 100pb e 1 kb DNA Ladder (Fermentas), seguida das amostras 14(-), 18(-), 24(-), 36 (-), 70(-), 138(-), 140 (-) 142(-), 145(+), 169(+), 196(+), 201(-), 205(+), 207(-), 271(+), 289(+), 298(+), 300(+), 304(+), 305(+), 306(+), 310(+), 324(+), 325(+), 326(+), 327(+). Jaboticabal, 2011.....	36
Figura 11. Identificação do gene de virulência <i>icaD</i> amplificado a 381 pares de base (pb) a partir de amostras de <i>S. aureus</i> isolados da cavidade nasal de suínos. Da esquerda para a direita, peso molecular de 100pb DNA Ladder (Fermentas), seguida das amostras 14(+), 18(+), 70(+), 143(+), 145(+), 154(+), 160(+), 169(+), 176(+), 179(+), 182(+), 185(+), 197(+), 201(+), 205(+), 207(+), 212(+), 227(-), 241(-), 242(+), 243(-), 249(-), 254(+), 255(+), 257(-), 271(+). Jaboticabal, 2011.....	37

Figura 12. Identificação do gene <i>coa</i> após PCR e corrida em gel de agarose com formação de bandas polimórficas (600 pb, 750 pb e 850 pb). Amostras de <i>S. aureus</i> isolados da cavidade nasal de suínos. Jaboticabal, 2011.....	37
Figura 13. Perfil de resistência múltipla de estirpes de <i>S. aureus</i> isolados ao longo da cadeia produtiva de suínos para estudo epidemiológico longitudinal. Jaboticabal, 2011.....	39
Figura 14. Perfil de resistência a antimicrobianos de estirpes de <i>S.aureus</i> isolados de suínos ao longo de sua cadeia produtiva para estudo epidemiológico longitudinal. S = sensível, I = indeterminado, R = resistente. Jaboticabal, 2011.....	40

***Staphylococcus aureus* NA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

RESUMO: *S. aureus* é responsabilizado por diversos problemas clínicos em suinocultura e em humanos. Estudos epidemiológicos comprovam o potencial deste microrganismo em adquirir resistência a antibióticos. Atualmente estirpes resistentes a meticilina (MRSA), responsabilizados por casos de infecções nosocomiais, são as mais estudadas uma vez que o MRSA encontra-se disseminado em ambientes extra-hospitalares e frequentemente tem sido isolado de vários animais domésticos inclusive suínos. O objetivo deste trabalho foi determinar a presença de *S. aureus* em granjas de suínos, identificar a ocorrência dos genes *mecA*, *icaA* e *icaD* e o perfil de resistência a antimicrobianos. Ao todo foram colhidas 458 amostras de cinco granjas e dois frigoríficos. As amostras foram semeadas em ágar Braid - Parker e ágar sangue seguido de provas bioquímicas. As amostras sugestivas, foram submetidas a PCR para confirmação de espécie, detecção do gene *coa*, *mecA* para avaliar a resistência a meticilina além dos genes de virulência *icaA* e *icaD* que expressam capacidade para formação de biofilmes. Na sequência, realizou-se o antibiograma para a avaliação de 11 antimicrobianos. Ao todo foram identificados 81 (79%) *S. aureus* isolados de todas as granjas e frigoríficos incluindo, três amostras isoladas de funcionários das granjas. Nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*. Em relação aos genes *icaA* e *icaD*, observou predomínio do gene *icaD* e que 41% das amostras foram positivas para os dois genes. O antibiograma demonstrou grande resistência às penicilinas e tetraciclina, além de grande quantidade de *S. aureus* multirresistentes.

Palavras – Chaves: *Staphylococcus aureus*, MRSA, Suínos, Biofilme

***Staphylococcus aureus* IN PIG PRODUCTION CHAIN AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILES**

ABSTRAC: *Staphylococcus aureus* are involved in a wide range of clinical problems to swine industry as son in humans. Epidemiological researchs prove his potential to acquire resistantence to antibiotics. Nowadays, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are responsabilized for nosocomial infections and many studies are done because MRSA are spread to extra hospitalar enrironment and frequently isolated from domestic animals including pigs. The aim of this study was to determine the presence o *S. aureus* at swine farms and identify the *mecA*, *icaA* and *icaD* genes and the resistant proflife to antibiotics. Overal, 458 swabs were taked from five pigeris and two slaurtherhouses. All the samples were placed on Braid – Parker and blood agar follow by biochemical analyses. The suspect colonies were submitted to PCR to confirm the *S. aureus* species, by the detection of the *coa* gene, *mecA* to avaible methicillin-resistant as son to the virulence gens *icaA* and *icaD* that can determine slime production. Antibiogram were done to evaluate the response to 11 antibiotics. All pigeris and slaurtherhouse were positive and 81 (79%) samples were *S. aureus* positive including three isolates from pigs employeers. The *mecA* gene was not detected. The *icaD* gene was most frequent and 41% were positive to both genes. The antibiogram show a lot of samples penicillin and tetraciclín resistant. Most of the samples were multirestant.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, swine, slime

I. INTRODUÇÃO

Microrganismos multirresistentes a antibióticos são conhecidos desde a década de 60 e atualmente representam grande problema à saúde pública. Dentre estes, o *S. aureus* vem se destacando pelo aumento de sua frequência como causa de infecções nosocomiais (TIEMERSMA et al., 2004) representando crescente problemática em unidades de saúde e em comunidades do mundo inteiro. Estirpes de *S. aureus* cada vez mais resistentes aos diversos antimicrobianos disponíveis têm estimulado a comunidade científica a buscar novas terapias que possam combater a infecção por este agente. Neste processo, a variante *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) ganha destaque já que apresenta resistência aos principais antibióticos utilizados em medicina humana e veterinária.

Inicialmente, os MRSA eram preocupação apenas em ambientes hospitalares e foram relacionados a muitos casos de infecções nosocomiais. Recentemente cientistas de vários países notaram que o problema ultrapassa o limite hospitalar, uma vez que os MRSA passaram a constituir problema também em ambientes externos, o que é conhecido como CA-MRSA (Community-

Associated Methicillin-Resistant *S. aureus*) sendo isolados com frequência de indivíduos saudáveis, com especial incidência na população de homossexuais.

Considerando que MRSA já foi isolado de outras espécies incluindo os suínos e que a importância destas na transmissão e disseminação do agente ainda não está muito bem elucidada além da crescente preocupação epidemiológica da disseminação extra-hospitalar destes microrganismos, muitos estudos estão sendo realizados em diversos países para se esclarecer completamente a sequência dos fatos e como tudo ocorre.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus* spp

Staphylococcus, segundo a literatura latina internacional, ou simplesmente estafilococos em português (WIKIPÉDIA, 2011) são microrganismos em forma de cocos com diâmetro variando de 0,5 a 1,5 μm (HERMANS et al., 2010) pertencentes ao grupo de bactérias classificadas como Gram positivas, imóveis e que fermentam glicose com produção de ácido (BIBERSTEIN & HIRSH, 1999). Geralmente ocorrem em arranjos individuais, aos pares, tétrades, cadeias curtas de três a quatro células ou em forma de grupamento irregular semelhante a cacho de uva (HERMANS et al., 2010).

Colônias de *Staphylococcus* apresentam coloração variando de branca, a amarelo alaranjado pela presença de pigmentos carotenóides (BIBERSTEIN & HIRSH, 1999; GOMES, 2011). Com exceção dos *S. aureus* subsp. *anarobius* e *S. saccharolyticus*, são catalase positivos e anaeróbios facultativos (HERMANS et al., 2010).

Segundo EUZÉBI (2011) o gênero é composto por 45 espécies e 24 subespécies que, conforme sua habilidade em produzir a enzima coagulase é

dividido em dois grupos – *Staphylococcus* coagulase positivos e *Staphylococcus* coagulase negativos (GOMES, 2011) que podem causar doenças em animais e humanos.

Staphylococcus spp. estão presentes em várias superfícies e nos mais diversificados ambientes desde a água até o pó. São também considerados simbioses uma vez que compõem a microbiota da pele, do trato respiratório de diversas espécies animais (BIBERSTEIN & HIRSH, 1999; BAKER et al., 2008) e transitoriamente no trato gastrointestinal (BIBERSTEIN & HIRSH, 1999).

Algumas espécies são patógenos oportunistas que podem causar infecções cutâneas, infecções oportunistas e até mesmo septicemias fatais (MURRAY et al., 1998), causadas pelo parasitismo do agente em infecções piogênicas superficiais, profundas ou por decorrência de intoxicações, após a ingestão de toxinas imunologicamente distintas.

2.2 Aspectos epidemiológicos

Um dos aspectos importantes a ser levado em consideração na epidemiologia do *S. aureus* é sua frequente resistência a antibióticos. Em 1928 Alexander Fleming, anunciou a descoberta de uma substância produzida pelo fungo *Penicillium notatum* que apresentava efeito inibitório sobre algumas bactérias. A indústria farmacêutica recebeu, a partir de então, grandes investimentos e promoveu a expansão da pesquisa de novos antibióticos. Até o final da década de 1960, muitos antibióticos foram introduzidos no mercado. No entanto, quase tão rápido quanto as descobertas, verificou-se o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos, principalmente devido ao seu uso indiscriminado e inadequado (MANRIQUE & GALVÃO, 1997) na medicina humana e veterinária.

Atualmente, a maior preocupação envolve estirpes resistentes à penicilina, à meticilina e a outros β -lactâmicos. *S. aureus* resistentes à meticilina e conhecidos pela sigla MRSA, são microrganismos emergentes e mundialmente disseminados, responsáveis por inúmeras infecções nosocomiais (MANGENEY et al., 2002; CADDICK et al., 2006).

Alguns trabalhos descrevem a presença de MRSA em cães, gatos, cavalos (BUSSCHER et al., 2006; WEESE et al., 2006a; WEESE et al., 2006b), vacas com mastite (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007), suínos (SERGIO et al., 2007) e animais silvestres (WALTHER et al., 2008). MRSA foi isolado de pacientes que tiveram contato com suínos (VOSS et al., 2005) e de pessoas que moravam próximas a granjas (ARMAND-LEFEVRE et al., 2005; HUIJSDENS et al., 2006), demonstrando semelhanças genotípicas. BAGCIGIL et al. (2007) relataram que, *S. aureus* presente na mucosa nasal pode ser transmitido entre animais e humanos.

No Canadá, 45% das granjas avaliadas foram positivas para MRSA (KHANNA et al., 2008) e na Holanda, NEELING et al. (2007) encontraram prevalência de 39%, em amostragem composta por 540 suínos sadios abatidos em frigoríficos distintos. Ainda na Holanda, van DUIJKEREN et al. (2008) demonstraram que a transmissão do agente entre granjas de suínos é possível, devido a comercialização de animais entre granjas produtoras de leitões (UPLs) e granjas de terminação, com prevalência de 23%. Estes mesmos autores descreveram, ainda, a disseminação de MRSA dentro da própria granja, no ambiente contaminado, onde, não ocorre vazio sanitário entre lotes. A transmissão e principalmente a disseminação aerógena é possível uma vez que *S. aureus* foi isolado de partículas de aerossóis em granjas de suínos (CHAPIN et al., 2005).

Desde a década de 80, o MRSA é considerado como um microrganismo emergente, responsável por muitos casos de infecções hospitalares. O grande problema está relacionado à resistência aos principais antibióticos, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos que são frequentemente utilizados em

hospitais e em animais de produção (SEGUIN et al., 1999) e eleitos para o tratamento da estafilococose. Recentemente, a resistência para macrolídeos foi descrita em suínos por BAGCIGIL et al. (2007).

Atualmente, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um dos microrganismos mais estudados visto a sua importância em saúde pública e distribuição mundial. MRSA já foi identificado inclusive em um hospital de Porto Alegre no Brasil (MACHADO et al., 2007).

A transmissão de *S. aureus* entre humanos ocorre comumente por contato direto, principalmente meio das mãos, ou indireto (SANTOS & DARINI, 2002) e talvez os humanos sejam a principal fonte de infecção para os animais. LEE et al. (2003) sugerem que o MRSA pode ser transmitido de animais para humanos. No entanto, o mecanismo exato de como a transmissão ocorre ainda carece de alguns estudos, uma vez que não está totalmente elucidado.

Levando em consideração que o isolamento de *S. aureus* resistentes a vários antibióticos a partir de suabes nasais e faríngeos foi significativamente maior em fazendeiros produtores de suínos do que os não produtores (AUBRY-DAMON et al., 2004) e que o MRSA já foi detectado em instalações de suínos (GIBBS et al., 2004), devemos considerar a importância da espécie como provável fonte de infecção para humanos.

O mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, desenvolvido pelo MRSA, está relacionado ao gene *mecA* produtor de uma proteína de ligação à penicilina - a PBP2a ou PBP2', desenvolvendo enzima que inativa a penicilina e a β -lactamase. Este gene é carregado em um elemento genético específico móvel estafilocócico (*Staphylococcal Cassette Chromosome, SSCmec*) (GEORGOPAPADAKOU, 1993; MERLINO et al., 2002) que são classificados em cinco tipos, de I a V, conforme a característica do gene. O conhecimento destes SSCmecs é muito importante para a compreensão da epidemiologia molecular do MRSA (MOMBACH et al., 2007).

Outro aspecto relevante na epidemiologia de *S. aureus* é a capacidade de se aderir as superfícies sólidas produzindo biofilmes compostos por multicamadas

de células embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos (CUCARELLA et al., 2001; FLACH et al., 2005). Esta organização é extremamente vantajosa à todas espécies de microrganismos, pois fornece proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003).

As células persistentes são consideradas como responsáveis pela sobrevivência da população bacteriana e a fisiologia adaptativa que elas passam demonstra ser a chave para a extraordinária sobrevivência dentro dos biofilmes (LEWIS, 2001). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a bactéria dentro do biofilme se torna de 10 a 1000 vezes mais resistente aos efeitos antimicrobianos, quando comparadas com bactérias livres (AMORENA et al., 1999).

A capacidade das bactérias se aderirem às superfícies se dá por meio de um antígeno capsular chamado de polissacarídeo adesina (PS/A). A formação de multicamadas de células no biofilme está associada com a produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA). Tanto a PIA, como a PS/A, são estruturas similares com um carbono comum de β -1-6 poliglicosamina, mas diferem em substituição primária no grupamento amina (VASUDEVAN et al., 2003).

O *ica* locus consiste nos genes *icaABC* e *D* que codificam proteínas mediante síntese de PIA e PS/A em espécies de *Staphylococcus* (McKENNEY et al., 1998; CRAMTON et al., 1999). Os genes *icaA* e *icaD*, são relatados como os principais na formação de biofilmes em *S. aureus* e *S. epidermidis*. O gene *icaA* codifica N-acetilglicosamina transferase, que é a enzima envolvida na síntese de N-acetilglicosamina oligômeros da UDP-N-acetilglicosamina (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaD* tem sido relatado como fundamental na máxima expressão da N-acetilglicosamina transferase, que conduz a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (GERKE et al., 1998).

Bactérias contendo o *ica* locus, foram encontradas em variedades de *S. aureus* isolados de infecções nosocomiais (CRAMTON et al., 1999) e em diferentes pontos na linha de abate de suínos (NITZSCHE et al., 2007). MOTTIN

et al. (2007) encontraram *Staphylococcus* coagulase positiva em apresuntado a níveis acima do permitido pela legislação em três estabelecimentos que comercializavam alimentos em Porto Alegre, no entanto não avaliaram as características genotípicas dos isolados.

2.3 *Staphylococcus* na clínica de suínos

A ubiquidade dos microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp. os faz presentes em todas as granjas e em animais de todas as idades. As principais espécies isoladas de suínos são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (TAYLOR, 1999).

Provavelmente, suínos infectados são as maiores fontes de infecções para outros suínos (TAYLOR, 1999). Entretanto, a distribuição de espécies do gênero é bem diversificada, uma vez que *S. aureus* já foi isolado de fezes, alimentos, água, piso e paredes de baias, aerossóis, articulações, pele, cavidade oronasal, traquéia, prepúcio, vagina, intestino (TAYLOR, 1999; LEE, 2003) e lavados alveolares (GANTER et al., 1990). *Staphylococcus epidermidis* foram isolados da glândula mamária de porcas com mastite (BERTSCHINGER, 1999).

S. aureus, *S. pseudointerdius* e *S. hyicus* são frequentemente isolados das criptas tonsilares de suínos hígidos (BAELE et al., 2001; O' SULLIVAN et al., 2011). A transmissão vertical de *S. hyicus* via canal vaginal no momento do parto foi demonstrada por WEGENER & SKOV-JENSEN (1992).

A epidermite exudativa provocada pelo *S. hyicus* principalmente na fase de maternidade e início da fase de creche logo após o desmame (JACKSON & COCKCROFT, 2007; SCOOT, 2007) é provavelmente a doença mais conhecida na suinocultura industrial.

No entanto, outras espécies do gênero podem acometer suínos de várias idades e causar doenças severas com variadas manifestações clínicas associadas a inúmeros fatores de virulência como a produção de toxinas extracelulares e enzimas (FOSTER, 1991). Na literatura, há descrito uma grande variedade de problemas e manifestações clínicas em suínos acometidos por *Staphylococcus*. Doenças no aparelho locomotor, infecções no trato gastrointestinal, infecções no trato urinário, cardiorrespiratório, endocardite, pleurite, doenças da pele, abscessos diversos, doenças reprodutivas, otites entre outras (SCOFIELD et al., 1974; EVERITT et al., 1981; TAYLOR, 1989; CHRISTENSEN et al., 1999; SOBESTIANSKY et al., 1999; DROLET & DEE, 1999; SCOTT, 2007; MENIN et al., 2008) são os mais comuns.

Além de todas estas manifestações clínicas, a morte súbita observada em suínos principalmente após o reagrupamento ou transporte, frequentemente esta associada à endocardite valvular de origem bacteriana incluindo *Staphylococcus* spp (TAYLOR, 1989), cujo gênero e espécie variam conforme a região, idade e estado imunitário dos animais (KATSUMI et al., 1997). Estes mesmos autores realizaram um estudo para determinar quais microrganismos poderiam ser isolados de suínos acometidos por endocardite na linha de abate em frigoríficos no Japão. Para tanto, colheram um total de 495 amostras que após exames microbiológicos revelaram grande prevalência de *Streptococcus* spp. (41,69%), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (12,7%), *Actinomyces pyogenes* (7,9%), *Pasteurella multocida* (2,2%), *S. aureus* (2%) entre outros incluindo *S. hyicus*.

Outro aspecto que deve ser considerado são os problemas reprodutivos manifestados em fêmeas em decorrência de infecções uterinas como metrite e endometrite necrozante (EVERITT et al., 1981) com morte embrionária (SCOFIELD et al., 1974) e fetal, além do aborto, abscessos mamários e mastite (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Como se pode ver, os *Staphylococcus* são responsabilizados por diversas doenças e problemas clínicos em suínos devendo, incontestavelmente, sua possível presença sempre ser levada em consideração na ocasião do diagnóstico

diferencial das enfermidades que acometem os suínos ou de suas complicações, inclusive no que diz respeito à prescrição de medicamentos.

2.4 *Staphylococcus* na linha de abate de suínos

Durante o processo de abate, a contaminação da carne pode ocorrer em diferentes pontos da linha, merecendo destaque as operações de preparo e industrialização, principalmente quando realizadas em ambientes insalubres ou de maneiras impróprias, bem como, o próprio estado de saúde dos animais (FERREIRA et al., 2011), considerando que, muitas vezes há a entrada, na linha de abate, de suínos que albergam microrganismos que, geralmente, não causam sinais clínicos ou perdas evidentes de desempenho produtivo nos animais ou que não causam lesões evidentes na linha de abate (CARDOSO et al., 2011).

Muitos destes microrganismos representam risco à saúde devido ao seu potencial em causar toxi-infecções. As bactérias são frequentemente envolvidas em doenças transmitidas por alimentos e, por isso, constituem uma das maiores preocupações em relação à inocuidade dos produtos de origem animal (CARDOSO et al., 2011)

Estes microrganismos, considerados patogênicos podem ser isolados de diversos locais, equipamentos e utensílios imprescindíveis ao processo de abate. A avaliação em diferentes pontos e etapas do abate comprovou a presença de enterobactérias e *Staphylococcus* coagulase positivos inclusive na etapa de escaldagem, chameusamento e refrigeração (SPESCHA et al., 2006) que segundo VAN CLEEF et al. (2010) tendem a aumentar ao longo do dia e se disseminar a outros pontos.

Outra importante fonte de infecção são os próprios animais. Análises microbiológicas realizadas em tonsila de suínos abatidos no Canadá mostraram a

importância de membros do gênero uma vez que *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. pseudointermedius* foram isolados de tonsilas de carcaças de suínos aparentemente hígidos e também daquelas desviadas para o departamento de inspeção federal (O'SULLIVAN et al., 2011). *Staphylococcus* foram também isolados a partir de suabes nasais de suínos após a insensibilização, ao longo da linha e também das carcaças avaliadas (TENHAGEN et al., 2009).

Estudo semelhante realizado na Alemanha comprou que o maior risco de contaminação de carcaças e a maior heterogenicidade dos isolados foi observado após a insensibilização dos suínos (BENEKE et al., 2011). Entretanto, a descrição das características genotípicas das estirpes contaminantes em carcaças suínas é escassa na literatura (NITZSCHE et al., 2007).

Não menos importante, são os humanos que trabalham em contato com os animais, seus produtos e subprodutos. Na Holanda, *S. aureus* foi isolado a partir de funcionários de três grandes frigoríficos de suínos na área de inspeção *antemortem*, o agente foi detectado em funcionários responsáveis pela condução dos animais, médicos veterinários e seus auxiliares e em menor proporção dos funcionários que atuavam nas áreas consideradas limpas da linha, ou seja, após a evisceração (VAN CLEEF et al., 2010). No Brasil, também existe a comprovação de *S. aureus* isolado em vários pontos da linha de abate em frigorífico de Minas Gerais (LIMA et al., 2004) e no Estado de São Paulo (BAKER et al., 2008).

Aspecto é preocupante o número de *S. aureus* resistentes a metilicina. O agente está disseminado e já foi identificado em vários países como Canadá (WEESE et al., 2011). Na Coreia foi identificado em 39 isolados de 161 amostras de carne suína (LEE, 2003). Na Suíça entre 2009 e 2010 houve um aumento significativo do número de isolados em frigoríficos com predomínio das linhagens, ST398-t034 and ST49- t208 (OVERESCH et al., 2011).

Conforme já comprovado na produção de carne, os próprios animais, trabalhadores, ambiente, equipamentos e utensílios utilizados podem ser fonte de contaminação, demonstrando a importância e o risco que a carne suína pode

representar à saúde pública quando processada sem os cuidados mínimos necessários para garantir sua inocuidade.

2.5 Uso de Antimicrobianos em suinocultura

A produção de suínos varia desde sistemas intensivos de produção com densidades elevadas de animais até as criações de subsistência, também conhecidas como de fundo de quintal ou criatórios de suínos, onde, geralmente existe de um a poucos animais por propriedade. Em ambos os casos, principalmente na suinocultura industrial, há uma incessante busca do homem por tecnologias que viabilizem o aumento nos índices produtivos. Esta busca por tecnologia culminou com mudanças marcantes para suinocultura. Os índices hoje alcançados são resultados de uma série de fatores relacionados ao melhoramento genético, investimentos em nutrição e sanidade.

Por outro lado, a intensificação dos métodos de produção de suínos aumentou significativamente a pressão de infecção e o nível de estresse para os animais resultando conseqüentemente, no desencadeamento de problemas com várias doenças infecciosas e relacionadas as tecnologias introduzidas e que se mantinham de forma inaparente (BARCELLOS et al., 2007).

Com isto, o uso de antimicrobianos em granjas de suínos tornou-se rotina e seu uso passou de tratamento empírico direcionado a doenças específicas e foi inserido como parte do manejo profilático e também como promotor de crescimento. Em sua grande maioria os tratamentos são realizados para o controle das doenças gastrintestinais sem informações precisas a respeito do agente etiológico (AARESTRUP et al., 2008). Este uso indiscriminado de antibióticos em medicina veterinária (AARESTRUP et al., 2008) esta relacionado

ao aumento de resistência (WHO, 2002) uma vez que, a prescrição não terapêutica pode selecionar bactérias comensais e patogênicas à resistência a antimicrobianos (CHAPIN et al., 2005).

O uso terapêutico é aquele que se direciona ao controle de infecções bacterianas pré-existentes, de forma individual ou grupal, mas a terapia individual em suinocultura muitas vezes é inviável. Estrategicamente abrimos mão do tratamento metafilático logo quando do aparecimento de sinais e ou sintomas de doença em pelo menos um animal do grupo, esperando – se que os demais venham a manifestar a doença (PALERMO-NETO, 2011).

Para tratamento de um grupo de suínos é comum utilizar-se a administração oral, pela via digestiva, seja por meio da alimentação ou via água de consumo. Esta forma de tratamento traz alguns riscos, como, por exemplo, a possibilidade da mistura não ser suficientemente homogênea. A ocorrência de incompatibilidade do antimicrobiano com componentes da ração, a insolubilidade e instabilidade na água e também o consumo reduzido em consequência de inapetência ou alteração na palatabilidade (PALERMO – NETO, 2007).

Ainda em relação ao risco destas vias de fornecimento, o intestino é o maior local de transferência de resistência antibiótica, tanto por causa do vasto número de bactérias presentes quanto em razão das oportunidades de disseminação destas em animais criados intensivamente (VAZ, 2009).

O uso prudente de antimicrobianos implica em balancear a susceptibilidade do agente e a concentração do antimicrobiano nos tecidos afetados com os eventuais efeitos adversos que ele possa produzir (PALERMO-NETO, 2007) tornando-se fundamental o conhecimento do perfil farmacocinético do antimicrobiano (BARCELLOS et al., 2007).

Seu uso inadequado pela não observância de uso prudente ou daquelas contidas nas bulas recaem sobre – os animais tratados, o proprietário da granja, meio ambiente, consumidor de produtos derivados dos animais tratados, do município, do Estado da Federação onde se encontra a granja e, até mesmo, sobre a suinocultura nacional (PALERMO-NETO, 2007).

A indicação para o uso de antimicrobianos específicos será tanto mais precisa quanto maior for o conhecimento sobre o agente etiológico da doença que se pretende tratar ou prevenir. A escolha dos medicamentos não é tarefa fácil, pois existe no mercado de produtos veterinários a opção de uma série ampla de princípios ativos e diversas marcas no mercado (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998; BARCELLOS et al., 2007).

III. OBJETIVOS

Realizar estudo epidemiológico longitudinal para avaliar a presença do *S. aureus* ao longo da cadeia produtiva de suínos, identificar a ocorrência do gene de resistência à meticilina (*mecA*), dos genes de virulência, formadores de biofilme (*icaA* e *icaD*) e o perfil de resistência a antimicrobianos.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colheita das amostras

Todas as amostras foram coletas de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) em 07 de maio de 2008 sob o protocolo n° 008064 – 08.

O cálculo do número de amostras coletadas por cada granja e fase do ciclo de produção foi realizado tomando como base a estimativa de prevalência de *Staphylococcus* spp. maior do que 20% (NEELING et al., 2007; KHANNA et al., 2008; van DUIJKEREN et al., 2008), com 95% de confiança.

Ao todo foram colhidas 458 amostras de cinco granjas de suínos de ciclo completo num raio de até 150 km de Jaboticabal e de dois frigoríficos, sendo um na região nordeste e outro na região noroeste do Estado de São Paulo. O número de amostras coletadas em cada fase (PL – porcas lactantes, LL - leitões lactentes, LC- leitões de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação) do

ciclo de produção das cinco granjas, o número de amostras colhidas de funcionários e durante o processo de abate, estão sumarizadas na Tabela 1 e na Tabela 2.

As granjas foram classificadas, conforme a eficiência do manejo sanitário e dos programas de limpeza e desinfecção em – A (para granjas que atenderam à todos os requisitos avaliados), B (para as granjas que atendiam pelo menos à três fatores avaliados) e C (para as granjas com deficiências nos procedimentos avaliados). Avaliou-se o tipo de manejo adotado em relação ao uso das instalações, manejo contínuo ou com intervalos entre lotes (vazio sanitário), produção em sítios separados e procedimentos de limpeza e desinfecção como lavagem, desmontagem, desinfecção, montagem e nova desinfecção além do controle de fluxo de pessoas e trânsito de veículos.

Tabela 1. Número de animais amostrados por granja e fase do ciclo de produção em função do número de matrizes alojadas, valores entre parênteses, prevalência estimada maior que 20% e grau de confiança de 95%. Jaboticabal, 2011.

	PL	LL	LC	SC	ST	FN	FM
Granja 1 (50)	10	10	10	10	10	01	01
Granja 2 (30)	10	10	10	10	10	01	01
Granja 3 (575)	10	10	10	10	10	06	06
Granja 4 (450)	10	10	10	10	10	03	03
Granja 5 (100)	10	10	10	10	10	02	02
Total	50	50	50	50	50	13	13

PL - porca lactante, LL – leitão lactente, LC- leitão de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação, FN – amostra colhida da cavidade nasal de funcionário, FM – amostra colhida das mãos dos funcionários. Total de amostras – 276. Valores entre parênteses são referentes ao total de matrizes alojadas em cada granja.

As amostras foram colhidas pelo emprego de suabes estéreis e tiveram origem da cavidade nasal dos animais e da cavidade nasal e das mãos de funcionários envolvidos no processo produtivo.

No processo de colheita, os animais foram fisicamente contidos. Leitões menores, até 15–20 Kg, foram contidos por um auxiliar. Ainda no chão, o animal era seguro pelas extremidades dos membros pélvicos. Em seguida era içado e travado entre o braço esquerdo e o corpo do auxiliar, que o mantinha com a cabeça para frente e horizontalmente posicionada. Animais maiores eram contidos no chão, em posição quadrupedal, mediante emprego de pito, aplicado em laço, no maxilar superior. Depois de contido, realizava-se a colheita da amostra, introduzindo o suabe e friccionando-o, suavemente, na mucosa nasal dos animais.

As amostras nasais e das mãos de funcionários voluntários, foram colhidas por eles próprios após explicação e demonstração do procedimento evitando qualquer forma de constrangimento aos mesmos. A amostra das mãos foi colhida friccionando as zaragatoas sobre a palma e entre os dedos de uma das mãos. As amostras nasais foram colhidas, conforme já descrito anteriormente, ou seja, introdução do suabe na narina e leve fricção na mucosa nasal.

Nos frigoríficos, (Tabela 2) foram colhidas amostras nasais e da carcaça dos animais, além de amostras dos utensílios empregados no processo de abate – cabos das facas, chairas e ganchos. As amostras nasais foram obtidas após a insensibilização elétrica e antes da sangria dos animais. As amostragens das carcaças foram realizadas após o abate, sendo obtidas por suabes de arrasto de área de 10 cm x 10 cm na região interna dos pernis. Na sala de desossa as amostras foram colhidas em diferentes pontos da esteira ou da mesa de preparo. Neste processo, utilizaram-se luvas e suabes estéreis.

Tabela 2. Número amostras colhidas da cavidade nasal, pernil, sala de desossa e utensílios utilizados ao longo da linha de abate de suínos em frigoríficos no Estado de São Paulo. Jaboticabal, 2011.

	Cavidade Nasal	Utensílios*	Pernil	Desossa
Frigorífico 1	50	10	20	11
Frigorífico 2	50	10	20	11
Total	100	20	40	22

*Facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Pesquisas em Suínos da FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal em tubos estéreis contendo 5 mL de caldo Müeller Hinton (Oxoid, CM0405) acrescidos com 7% cloreto de sódio (NaCl) acondicionados em caixa isotérmica.

4.2 Análises microbiológicas

4.2.1 Identificação bioquímica

No laboratório as amostras foram imediatamente semeadas em ágar Baird-Parker (Oxoid CM0275) acrescidos de 5% de gema de ovo e 1% de telurito de potássio 3,5% (Sigma PO677) e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas e em ágar sangue (Oxoid CM0055) com 5% de sangue de carneiro e incubadas a 37°C por 24 horas.

As colônias características de *Staphylococcus* spp foram submetidas a esfregaços e coradas pelo método de Gram para avaliação morfológica. Os preparados que revelaram a presença de cocos Gram positivos foram submetidos à prova da catalase.

As amostras positivas à prova da catalase foram submetidas às provas de coagulase em lâmina “Clump Test” e em tubo, utilizando plasma de coelho liofilizado (CECON) (HOLLBERG, 1973). Uma alçada das colônias catalase positivas foi transferida para tubos de vidro contendo 5 mL de caldo de infusão cérebro e coração – BHI (Oxoid CM0225) e incubada a 37 C° por 18 a 24 horas. As leituras para a verificação da produção de coagulase em tubo foram realizadas

uma, duas, três, quatro e 24 horas após a incubação das amostras a 37°C em banho-maria (GARCIA et al.,1980).

As amostras incubadas em caldo BHI, foram também semeadas em ágar DNase (Oxoid, CM0321) e novamente levadas à estufa bacteriológica por 24 horas. Outros 200µL foram transferidos para tubos de vidro contendo 3 mL de caldo MRVP - Teste do Vermelho de Metila e Voges-Proskauer para verificar a produção da acetoina e incubadas a 37°C por 48 horas. Posteriormente, adicionou-se o reativo de Barrit composto por uma solução de Alfa-Naftol 5% (VETEC COD 657) e Hidróxido de Potássio 40% (QEEL). Para a avaliação da prova da DNase foi adicionado o volume entre 1 e 2 mL após 24 horas de solução de ácido clorídrico 1N à superfície da placas.

Na sequência, uma alçada foi semeada em meio cromogênico – “Oxacilin Resistant *S. aureus*” (ORSA) (Oxoid, CM1008) suplementado com oxacilina (Oxoid SR0195E) para o crescimento seletivo de *S. aureus* resistentes a metilicina.

Finalmente os isolados foram estocados a – 20° C em caldo BHI acrescido de 20% de glicerol até o momento das análises moleculares.

4.2.2 Identificação molecular

Todas as análises moleculares foram realizadas no Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.3 Obtenção de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada conforme descrito por BOLANO et al. (2001) com algumas adaptações. O protocolo baseia-se na lise mecânica das células, obtida pelo uso de pérolas de vidro tratadas e foi adaptado para o gênero *Staphylococcus*, não sendo necessária a adição de enzimas para a ruptura da parede celular e membrana plasmática.

Cada linhagem bacteriana foi cultivada em 10 mL de BHI (Oxoid CM0225) e incubada a 37°C, por 18 horas. Após, as células bacterianas foram centrifugadas a 5600 x g por 5 minutos, a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 5 mL de solução fisiológica esterilizada (0,85% NaCl). Ao sedimento bacteriano foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro (~ 600 µm de diâmetro), previamente tratadas com ácido nítrico.

O tratamento das pérolas de vidro foi feito pela imersão das mesmas em solução de ácido nítrico (50%, w/v) por duas 2 horas, sob agitação. Em seguida, as pérolas foram lavadas 10 vezes em água destilada, com intervalos de 30 minutos. As pérolas foram mantidas, por 18 horas, em solução de dietilpirocarbonato (DEPC 1%, w/v) a 37 °C, e em seguida secas por duas horas, a 180°C.

Após a adição das pérolas de vidro, foi adicionado ao sedimento bacteriano a solução de lise (Tris-HCl 0,2M pH 8,5; NaCl 1,5%; EDTA 25mM de pH 8; SDS 0,5%) na proporção 1:3, ou seja, foi adicionado um volume de solução de lise correspondente a 3 vezes o volume de sedimento bacteriano. A mistura, sedimento bacteriano, solução de lise e pérolas de vidro foi agitada vigorosamente, em agitador mecânico, por 10 minutos.

Alíquota de 500 µL de cada extração foi transferida para tubo de centrifuga, ao qual foi adicionado o mesmo volume da mistura fenol-cloroformio-álcool isoamílico. O material contido em cada tubo foi homogeneizado, por inversão, e centrifugado a 16.000 x g por 15 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com isopropanol absoluto, na proporção 1:1, e mantido à temperatura de - 80°C, por 18 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos, a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos mantidos a temperatura ambiente para a secagem do DNA.

Após a secagem, o DNA foi suspenso em 50µL de água ultra pura (W-PCR, Sigma) e mantido a 4°C por 18 horas. Posteriormente, o DNA foi tratado com 1 µL de solução de RNase (1 mg/mL) e mantido a 37 °C, por 1 hora. Finalmente, o produto da extração foi quantificado utilizando-se o equipamento GeneQuant (Amersham Bioscience) e mantido a -20 °C, até o momento do uso.

4.3.1 Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada para um volume de 25µL adicionando-se 60ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos quatro nucleotídeos (Fermentas Life Sciences), 2,5 µL de tampão PCR 10X concentrado (Fermentas Life Sciences), 2,0 mM de solução de MgCl₂ (Fermentas Life Sciences), 0,625U de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences), 25PLol de cada um dos primers (Invitrogen Life Technologies) e água ultra-pura (q.s.p. 25 µL, Sigma). Utilizou-se o termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os primers utilizados estão descritos na Tabela 3 e os ciclos de amplificação na Tabela 4.

A PCR para identificação de espécies foi realizada conforme (SASAKI et al., 2010), porém individualmente para cada um dos primers testados (Tabela 5). Os ciclos de amplificação foram – desnaturação inicial a 92°C por 2 min. Seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, pareamento, 30 ciclos de 52°C por 30s, extensão 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 2 min.

Tabela 3. Primers utilizados na PCR para detecção de gene de resistência ao β – lactâmico (*mecA*), gene da coagulase (*coa*) e gene de virulência (*icaA* e *icaD*). Jaboticabal, 2011.

Gene	Primer	Sequência primer (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referência
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> 1	CTCAGGTACTGCTATCCACC	449	BIGNARDI et al 1996
	<i>mecA</i> 2	CACTTGGTATATCTTCACC		
<i>coa</i>	<i>coa</i> 1	GAACAAAGCGGCCCATCATTA	variável	WALKER et al., 1998
	<i>coa</i> 2	TAAGAAATATGCTCCGATTGTTTCG		
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> (R)	AAGATATAGCGATAAGTGC	1315	CIFTCI et al., 2009
	<i>icaA</i> (F)	CCTAACTAACGAAAGGTAG		
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> (R)	GGCAATATGATCAAGATA	381	CIFTCI et al., 2009
	<i>icaD</i> (F)	AAACGTAAGAGAGGTGG		

pb – Pares de Base

Tabela 4. Etapas para amplificação dos genes *mecA*, *coa*, *icaA* e *icaD*. Jaboticabal, 2011.

Etapas	<i>mecA</i>	<i>Coa</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
Desnaturação inicial	5 min. a 95°C	5 min. a 95°C	5 min. a 95°C	5 min. a 95°C
Desnaturação*	1 min. a 94 °C	1 min. a 94 °C	1 min. a 94 °C	1 min. a 94 °C
Pareamento*	30 s a 52 °C	40 s a 52 °C	1 min. a 49 °C	1 min. a 49 °C
Extensão*	30 s a 72 °C	1 min. a 72 °C	1 min. a 72 °C	1 min. a 72 °C
Extensão final	10 min. a 72 °C	10 min. a 72 °C	10 min. a 72 °C	10 min. a 72 °C

*Para estas três etapas foram realizados 30 ciclos

Tabela 5. Primers utilizados na PCR para detecção de gene específicos para *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus*. Jaboticabal, 2011.

Espécie	Prime	Sequência primer (5' - 3')	Fragmento (pb)
<i>S. aureus</i> *	au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359
	au-	GCCAATGTTCTACCATAGC	
<i>S. intermedius</i> *	in-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	430
	in-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC	
<i>S. schleiferi</i> *	sch-F	AATGGCTACAATGAT AATCACTAA	526
	sch-R	CATATCTGTCTTTTCGGCGCG	
<i>S. hyicus</i> *	hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	793
	ry-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC	

* Conforme SASAKI, et al., 2010. As reações foram feitas individualmente.

4.3.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. A estes produtos, foram adicionados 10 µL de solução de azul de bromofenol (33% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol em tampão TBE 0,5X) e aplicados no gel de agarose.

Os marcadores de peso molecular de 100pb e de 1000pb (Fermentas Life Sciences) foram aplicados no gel de agarose para a determinação do tamanho dos fragmentos obtidos. A eletroforese foi realizada a 90 volts, utilizando fonte EPS 200 (Pharmacia Biotech).

Cada gel, após ser corado com brometo de etídeo (1µg/mL) por 15 minutos, foi observado sob a luz ultravioleta e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação Alphamager (Alpha Innotech).

4.4 Teste de resistência a antimicrobianos

As amostras positivas, amplificadas pela PCR foram submetidas ao teste de sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos. Para tanto, os isolados foram repicadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por aproximadamente 18 horas e posteriormente semeadas em ágar sangue e novamente incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. As colônias repicadas foram diluídas em solução salina estéril 0,9% até atingir turbidez óptica comparável a da solução padrão da escala de MacFarland a 0,5%. Posteriormente, uma alçada foi semeada em placas de ágar Mueller-Hinton a partir da técnica de difusão em disco (BAUER et al., 1966) frente a 11 antimicrobianos representados pela vancomicina (Oxoid, CT0058), rifampicina (Oxoid, 0207), clindamicina (Oxoid, CT0064), penicilina G (Oxoid, CT0152), gentamicina (Oxoid, CT0024), tetraciclina (Oxoid, CT0054), ciprofloxacina (Oxoid, 0425), eritromicina (Oxoid, CT0020), cefepime (Oxoid, CT0771), cloranfenicol (Oxoid, CT 0013) e oxacilina (Oxoid, CT0159).

Os halos de inibição foram aferidos segundo o preconizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2010).

V. RESULTADOS

A avaliação das granjas em relação aos requisitos mínimos de biosseguridade avaliados e ponderados conforme a presença ou ausência e a eficácia dos programas de limpeza e desinfecção, manejo das instalações ou criação em dois ou mais sítios de produção permitiu a classificação das granjas. Nenhuma granja foi classificada como A. As granjas 1, 2 e 3 foram classificadas com B pois atendiam a pelo menos três requisitos. Nestas eram adotados o vazio sanitário, controle e restrição de entradas de pessoas e outros animais. A Granja três apresentou ainda, criação em dois sítios.

As granjas 4 e 5 utilizavam o sistema de criação sem intervalo entre os lotes, não existia livro de visitas. O controle da entrada de outros animais estava ausente e o programa de limpeza e desinfecção apresentou graves deficiências. Estas granjas foram classificadas como C.

5.1 Análises Microbiológicas

5.1.1 Identificação bioquímica

Colônias pretas circundadas por pequeno halo transluzente (Figura 1), características do gênero *Staphylococcus* spp. em ágar Braid – Parker e formadoras de beta hemólise em ágar sangue (Figura 2) foram isoladas de todas as granjas e ambos os frigoríficos comprovando sua importância à suinocultura.



Figura 1. Meio de cultura ágar Braid-Parker. Observar a presença de colônias de coloração preta circundadas com halo transluzente características de *S. aureus*. Amostra isolada de suabe da cavidade nasal de suíno. Jaboticabal, 2011.

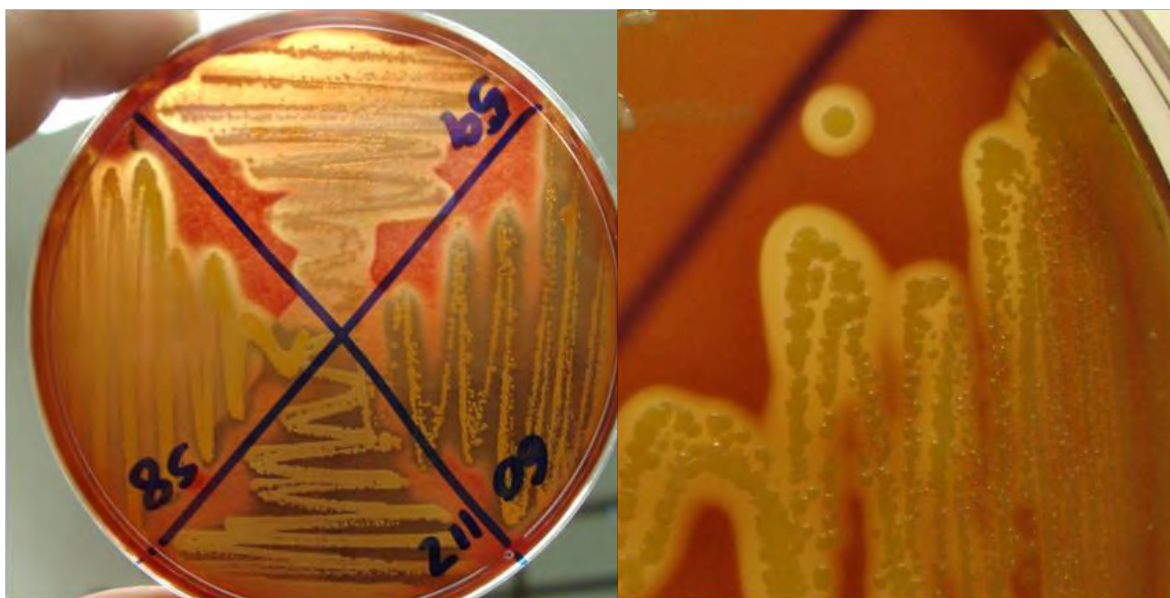


Figura 2. Placa de petri com ágar sangue de carneiro 5%. Observar a presença de colônias de aspecto amarelado e formadoras β hemólise. *S. aureus* isolado da cavidade nasal de suíno. Jaboticabal, 2011.

Todos os isolados foram ainda avaliados morfologicamente empregando-se a coloração de Gram (Figura 3) e posteriormente submetidos a provas bioquímicas iniciando-se pela prova da catalase, teste do vermelho de metila e Voges – Proskauer (Figura 4) e a prova da degradação do DNA pela ação da DNase (Figura 5).

Das 458 amostras colhidas nas cinco granjas e nos dois frigoríficos foram isoladas e classificadas como *Staphylococcus* spp. coagulase positivos, 103 (22,5%) amostras. Destas, 45 eram oriundas de granjas, incluindo a amostra de suabe nasal de um funcionário da granja 1 e três amostras de suabes das mãos de funcionários das granjas 1, 3 e 4 (Tabela 6 e Figura 6). As amostras restantes ($n = 58$) foram isoladas a partir das colheitas realizadas nos frigoríficos, durante o processo de abate (Tabela 7 e Figura 7). Tais resultados revelam que as prevalências de *Staphylococcus* spp. nas granjas e nos frigoríficos foram muito próximas, variando entre 10% e 12% respectivamente. Não houve crescimento de colônias bacterianas semeadas em ágar cromogênico – “Oxacilin Resistant *S. aureus*” (ORSA) (Oxoid, CM1008) suplementado oxacilina (Oxoid SR0195E).

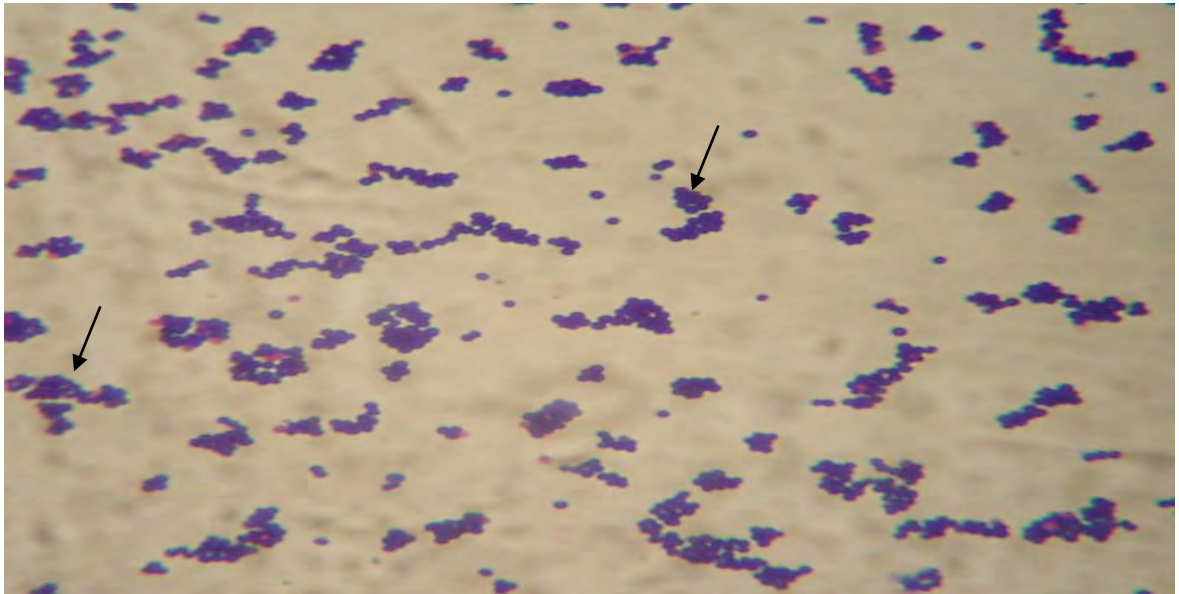


Figura 3. Avaliação morfológica e tintorial em esfregaço fixado. Identificação de cocos Gram positivos. Observar as formações com aspecto de cachos de uva (setas) características de *S. aureus*. Amostra isolada de suabe nasal de suíno. Microscópio óptico com óleo de imersão (1000x). Jaboticabal, 2011.

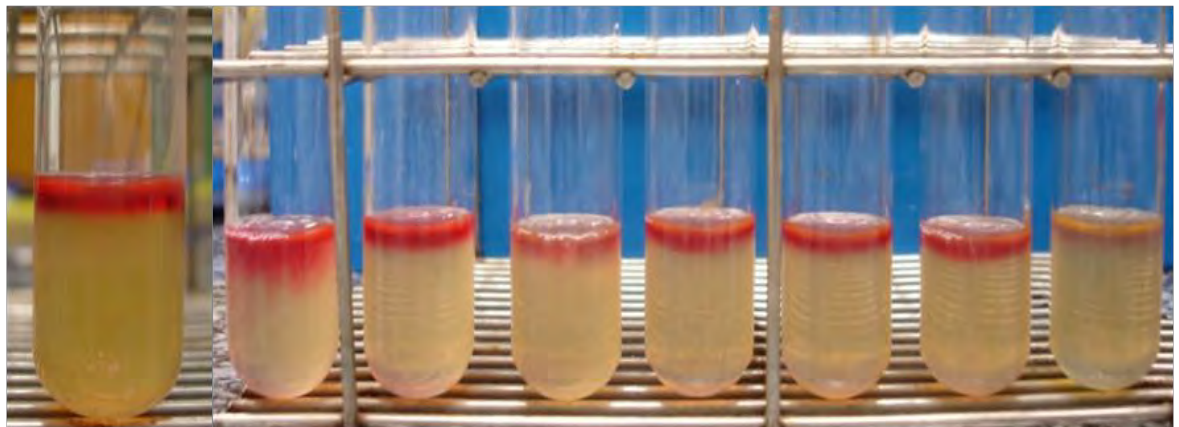


Figura 4. Prova do MRVP positiva, com formação de anel rosado. Ao lado direito algumas variações encontradas. *S. aureus* isolado da cavidade nasal de suínos. Jaboticabal, 2011.

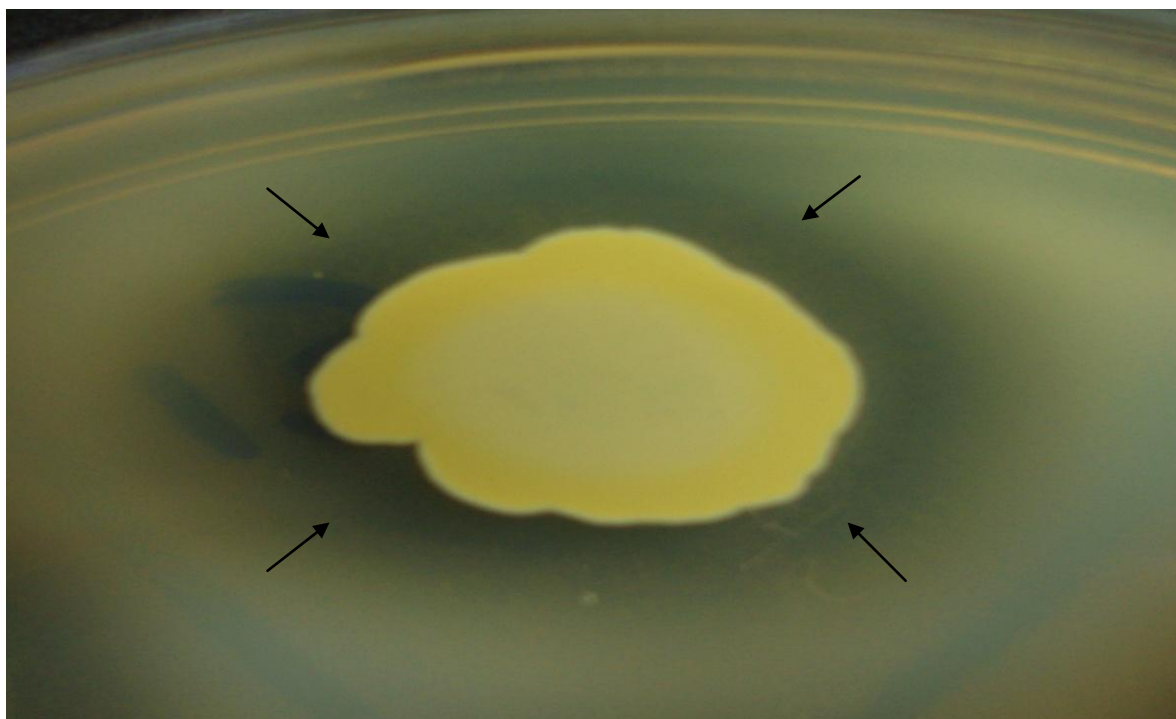


Figura 5. Prova da DNase positiva sugestiva de *S. aureus*. Colônia amarela com formação de halo claro ao redor (seta) devido a degradação da enzima DNase. Amostra isolada da cavidade nasal de suíno. Jaboticabal, 2011.

Tabela 6. Resultados das análises microbiológicas encontradas após a colheita de amostras de suabes da cavidade nasal de suínos em diferentes fases do ciclo de produção, suabes da cavidade nasal e das mãos de funcionários de cada granja. Jaboticabal, 2011.

	PL	LL	LC	SC	ST	FN	FM	TOTAL
Granja 1	1	0	1	1	1	1	1	6
Granja 2	0	1	0	0	0	0	0	1
Granja 3	0	0	0	4	3	0	1	8
Granja 4	2	2	2	3	6	0	1	16
Granja 5	2	2	1	5	4	0	0	14
Total	5	5	4	13	14	1	3	45

PL - porca lactante, LL – leitão lactente, LC- leitão de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação, FN – amostra colhida da cavidade nasal de funcionário, FM – amostra colhida das mãos dos funcionários.

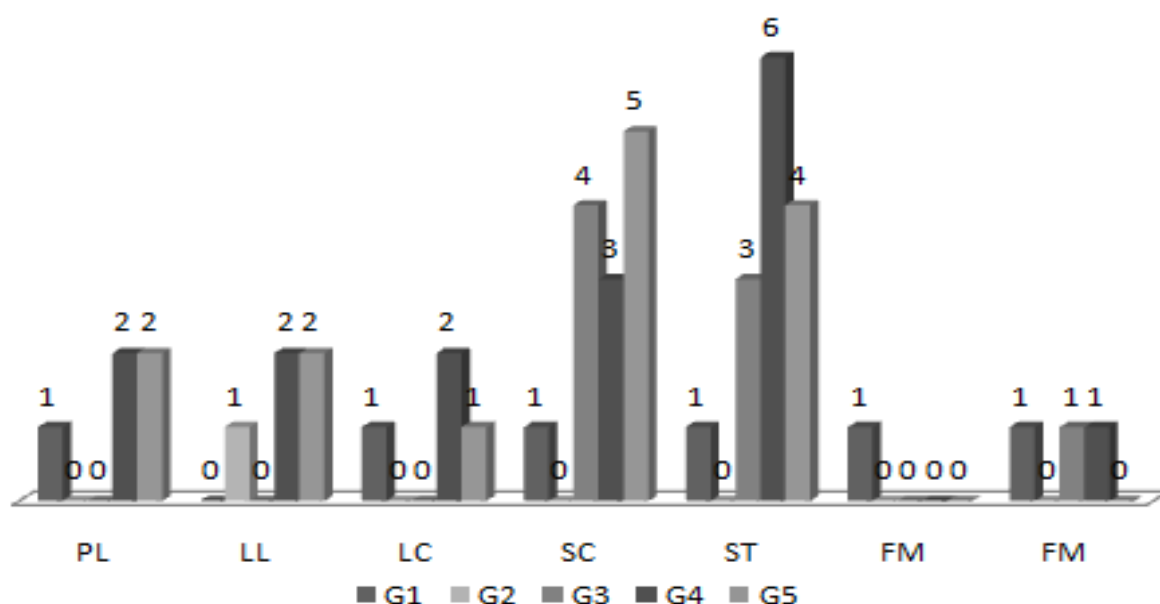


Figura 6. *S. aureus* isolados ao longo da cadeia produtiva de suínos e sua distribuição entre cinco granjas de suínos (G1, G2, G3, G4 e G5) na região de Jaboticabal – SP. PL - Porca lactante, LL – leitão lactente, LC- leitão de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação, FN – amostra colhida da cavidade nasal de funcionário, FM – amostra colhida das mãos dos funcionários. Jaboticabal, 2011.

Tabela 7. Resultados das análises microbiológicas encontradas após a colheita de amostras de suabes da cavidade nasal de suínos, utensílios utilizados pelos magarefes, suabe de arrasto da porção interna do pernil e da sala de desossa ao longo do processo de abate de suínos em dois frigoríficos no Estado de São Paulo. Jaboticabal 2011.

	Cavidade Nasal	Utensílios*	Pernil	Desossa	Total
Frigorífico 1	16	7	6	3	32
Frigorífico 2	16	3	7	0	26
Total	32	10	13	3	58

*Facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate

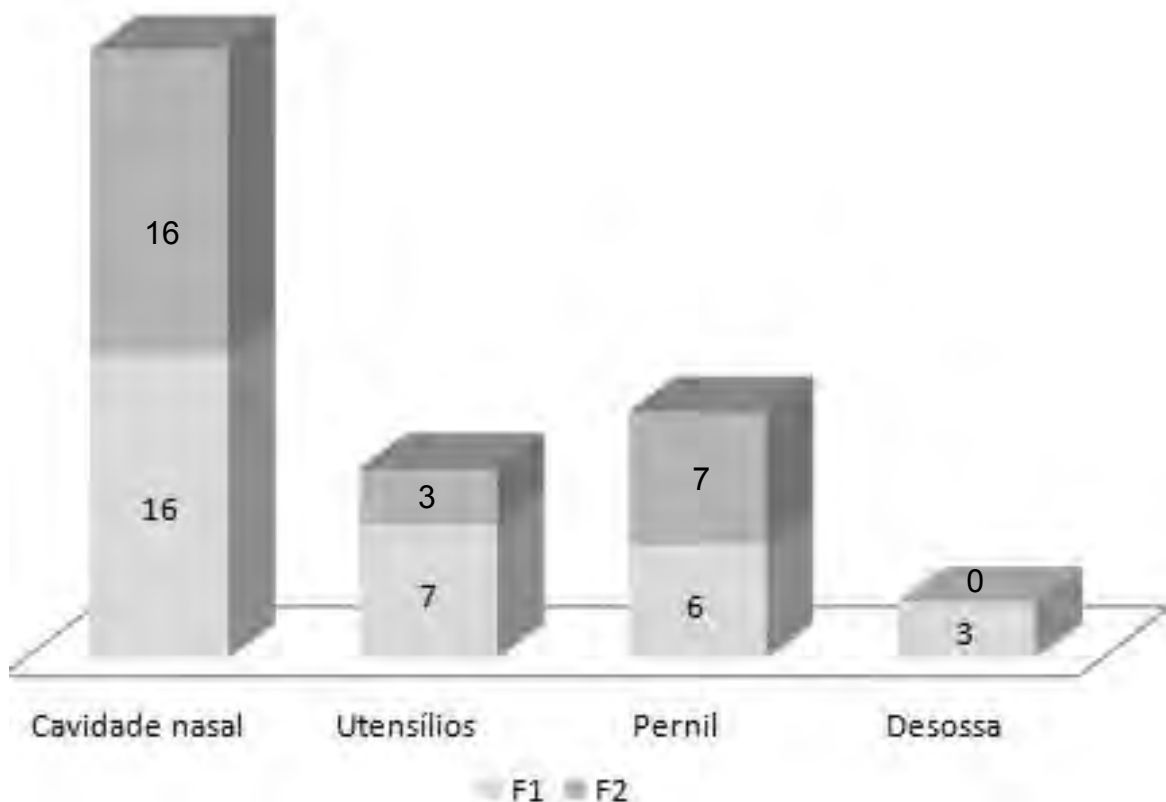


Figura 7. Representação gráfica do número de *S. aureus* isolados na linha de abate de suínos. Amostras colhidas em dois frigoríficos (F1 e F2) no Estado de São Paulo. Utensílios - facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate. Jaboticabal, 2011.

5.1.2 Identificação molecular (PCR)

A avaliação molecular para identificação das diferentes espécies pesquisadas revelou que dentre os 103 isolados apenas a espécie *S. aureus* foi identificada. Das amostras isoladas na microbiologia, 81 (79%) foram confirmadas como *S. aureus* (Figura 8).

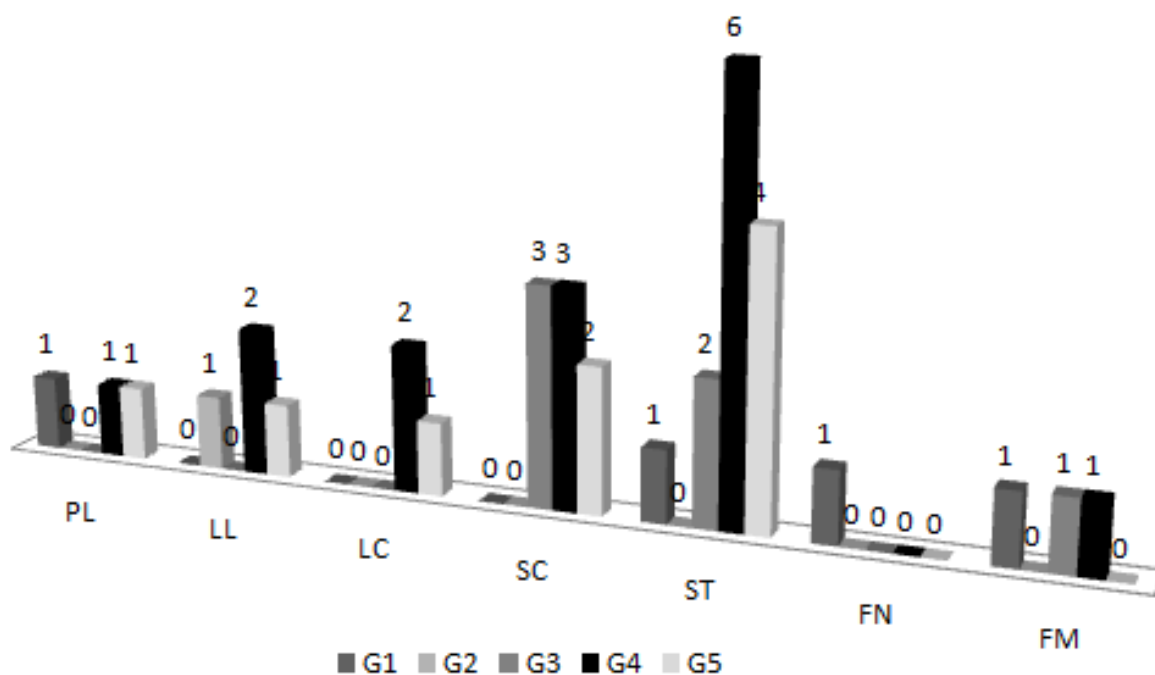


Figura 8. Identificação molecular de *S. aureus* em granjas (G1, G2, G3, G4 e G5) e fase do ciclo de produção (PL - porca lactante, LL – leitão lactente, LC- leitão de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação, FN – amostra colhida da cavidade nasal de funcionário, FM – amostra colhida das mãos dos funcionários) após PCR. Jaboticabal, 2011.

A comparação entre os resultados bioquímicos e moleculares demonstrou uma redução do número de amostras positivas para *S. aureus*. Para as amostras colhidas nas granjas houve uma diferença de 10 amostras para menos, a saber - uma amostra na maternidade de G5, uma de leitão lactente em G4, um leitão de creche em G5, três suínos em crescimento (uma em G4 e duas em G5), e quatro suínos em terminação (um em G3, dois em G4 e um em G5), conforme sumarizado na Tabela 8. Observou-se também uma diferença de menos 12 nas amostras colhidas durante o processo de abate de suínos. As deduções ocorrem todas em F1 da seguinte forma - seis suabes da cavidade nasal, três facas, dois suabes do pernil e uma após o resfriamento (desossa), conforme demonstrado na Tabela 9 e Figura 9.

Tabela 8. Amostras amplificadas após PCR utilizando primer específico para *S. aureus* a partir de microrganismos isolados da cavidade nasal de suínos, cavidade nasal e mãos de funcionários de suinocultura. Jaboticabal, 2011.

	PL	LL	LC	SC	ST	FN	FM	TOTAL
Granja 1	1	0	0	0	1	1	1	4
Granja 2	0	1	0	0	0	0	0	1
Granja 3	0	0	0	3	2	0	1	6
Granja 4	1	2	2	3	6	0	1	15
Granja 5	1	1	1	2	4	0	0	9
Total	3	4	3	8	13	1	3	35

PL - Porca lactante, LL – leitão lactente, LC- leitão de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação, FN – amostra colhida da cavidade nasal de funcionário, FM – amostra colhida das mãos dos funcionários.

Nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*, que expressa resistência para meticilina. As análises moleculares revelaram ainda que dentre os *S. aureus* isolados 38 (47%) foram positivas para o gene *icaA* (Figura 10) e 62 (76,5%) para o gene *icaD* (Figura 11). Trinta e três (41%) das amostras foram positivas para ambos os genes. Todas as amostras de *S. aureus* foram também positivas para o gene da coagulase (*coa*) que apresentou três tamanhos de fragmentos após amplificação (Figura 12) com 600 pb (2 amostras), 750 pb (16 amostras) e 850 pb (63 amostras).

Tabela 9. Amostras identificadas após PCR utilizando primer específico para *S. aureus* a partir de microrganismos isolados da cavidade nasal de suínos, pernil, utensílios e desossa. Jaboticabal, 2011.

	Cavidade	Utensílios*	Pernil	Desossa	Total
Frigorífico 1	10	4	4	2	20
Frigorífico 2	16	3	7	0	26
Total	26	07	11	2	46

*Facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate

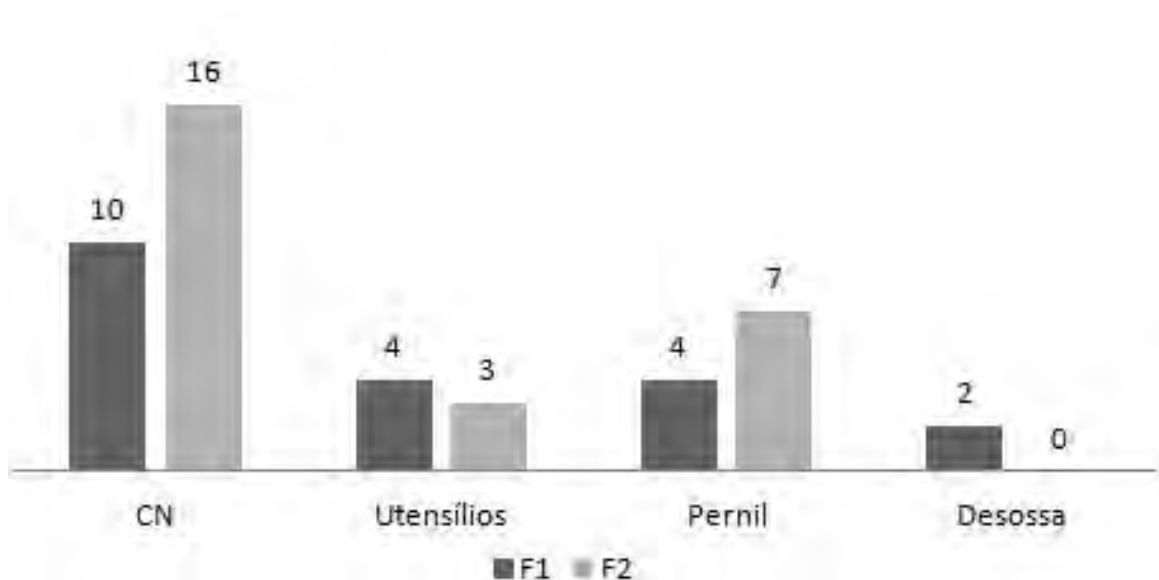


Figura 9. Representação gráfica do número de *S. aureus* isolados na linha de abate de suínos. Amostras colhidas em dois frigoríficos (F1 e F2) no Estado de São Paulo. CN – cavidade nasal. Utensílios (Facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate). Jaboticabal, 2011.

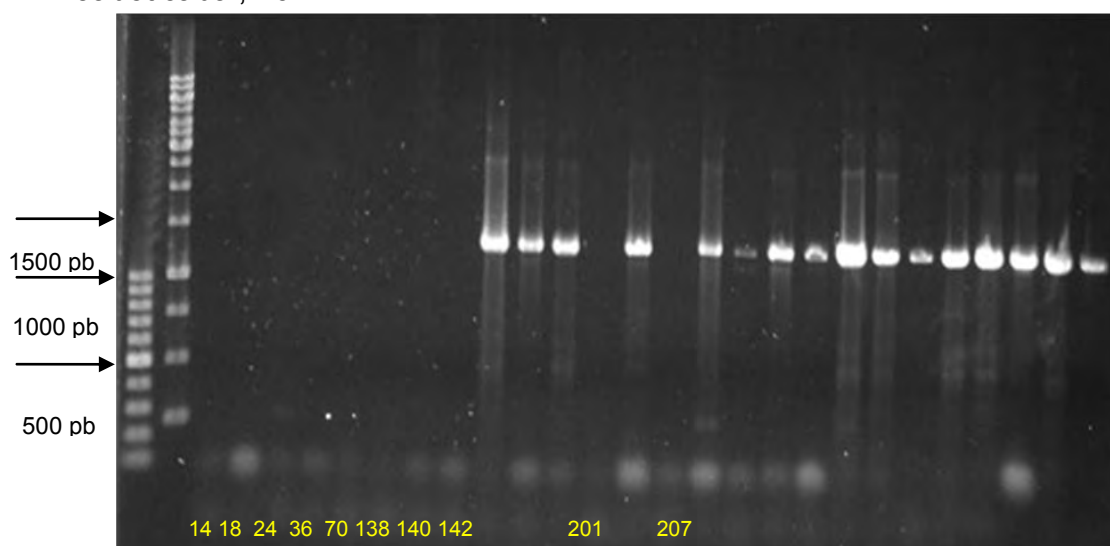


Figura 10. Identificação do gene de virulência *icaA* amplificado a 1315 pares de base (pb) a partir de amostras de *S. aureus* isolados da cavidade nasal de suínos. Da esquerda para a direita, peso molecular de 100pb e 1 kb DNA Ladder (Fermentas), seguida das amostras 14(-), 18(-), 24(-), 36 (-), 70(-), 138(-), 140 (-) 142(-), 145(+), 169(+), 196(+), 201(-), 205(+), 207(-), 271(+), 289(+), 298(+), 300(+), 304(+), 305(+), 306(+), 310(+), 324(+), 325(+), 326(+), 327(+). Jaboticabal, 2011.

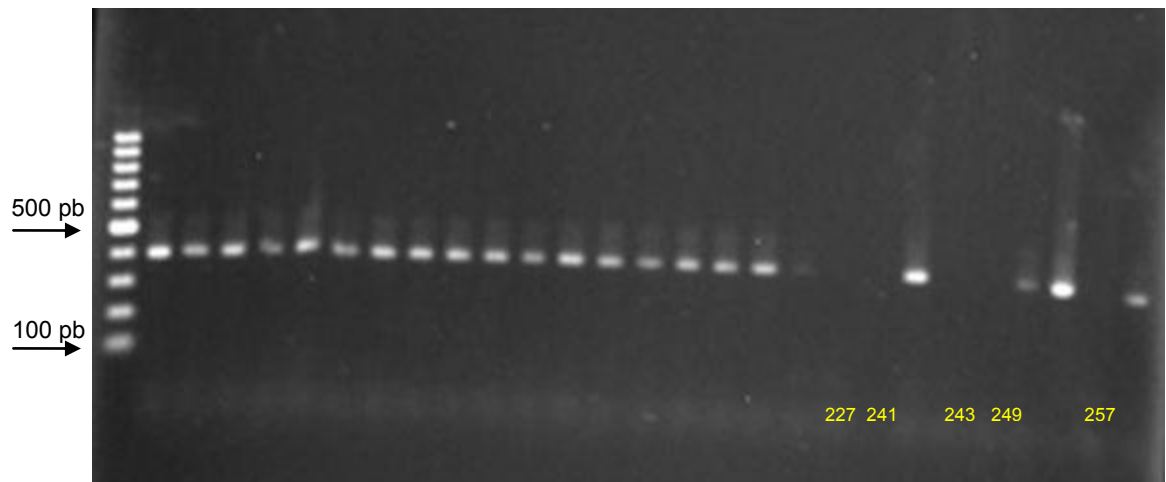


Figura 11. Identificação do gene de virulência *icaD* amplificado a 381 pares de base (pb) a partir de amostras de *S. aureus* isolados da cavidade nasal de suínos. Da esquerda para a direita, peso molecular de 100pb DNA Ladder (Fermentas), seguida das amostras 14(+), 18(+), 70(+), 143(+), 145(+), 154(+), 160(+), 169(+), 176(+), 179(+), 182(+), 185(+), 197(+), 201(+), 205(+), 207(+), 212(+), 227(-), 241(-), 242(+), 243(-), 249(-), 254(+), 255(+), 257(-), 271(+). Jaboticabal, 2011.

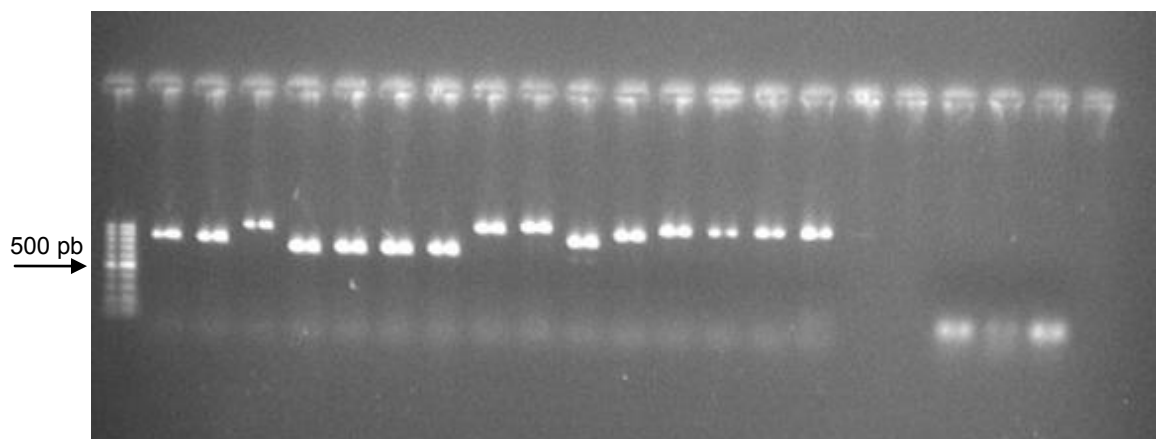


Figura 12. Identificação do gene *coa* após PCR e corrida em gel de agarose com a formação de bandas polimórficas (600 pb, 750 pb e 850 pb). Amostras de *S. aureus* isolados da cavidade nasal de suínos. Jaboticabal, 2011.

5.3 Teste de resistência a antimicrobianos

Os resultados do teste de resistência a antimicrobianos estão descritos na Tabela 10 e ilustrados graficamente nas Figuras 13 e 14. A análise global demonstrou a existência de resistência em todas as granjas, frigoríficos e em todas as fases do ciclo de produção. A maioria dos isolados apresentaram resistência para dois a cinco dos antimicrobianos testados (Figura 13). Os maiores índices de resistência foram encontrados para penicilina, tetraciclina e clindamicina (Figura 14).

Não foram encontrados *S. aureus* resistentes a vancomicina. Um isolado de uma porca de maternidade da granja 4 apresentou resultado não conclusivo. Na sequência, os antimicrobianos mais eficazes frente aos isolados foram a gentamicina, cefepime, oxacilina e rifamicina. Para oxacilina, quatro isolados, sendo, dois de suínos em terminação de G4, um da cavidade nasal e um da faca do magarefe da linha de inspeção do frigorífico 1 foram resistentes.

Para o perfil de resistência ao cloranfenicol, cujo uso em medicina veterinária foi proibido pelo Ministério da Agricultura em 2003, os resultados indicaram 46% (n=37) dos isolados como sensíveis 27% como resistentes e o restante como indeterminado.

Os isolados da cavidade nasal e das mãos do funcionário de G1 apresentaram resistência para rifamicina, penicilina, tetraciclina e eritromicina demonstrando grande semelhança apesar do isolado das mãos serem também resistente ao cefepime e cloranfenicol. Os outros isolados das mãos dos funcionários das granjas 3 e 4 foram resistentes para penicilina, tetraciclina e rifamicina, penicilina e gentamicina respectivamente. A Tabela 10 resume as principais fases do ciclo de produção em que ocorreu resistência aos antimicrobianos testados.

Tabela 10. Principais fases do ciclo de produção de suínos em que se observou resistência a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de suínos. Jaboticabal 2011.

	PL	LL	LC	SC	ST	Func.	Frig.
Rifamicina			X	X	X		X
Clindamica	X	X	X	X	X	X	X
Penicilina G	X	X	X	X	X	X	X
Gentamicina			X				X
Tetraciclina	X	X	X	X	X	X	X
Ciprofloxacina		X			X	X	X
Eritromicina	X	X	X	X	X	X	X
Cefepime	X						X
Cloranfenicol	X	X			X		X
Oxacilina					X		X

PL: porca lactante; LL: leitão lactente; LC: leitão em creche; SC: suíno em crescimento, ST: suíno em terminação; Func.: funcionário granja; Frig.: Frigorífico.

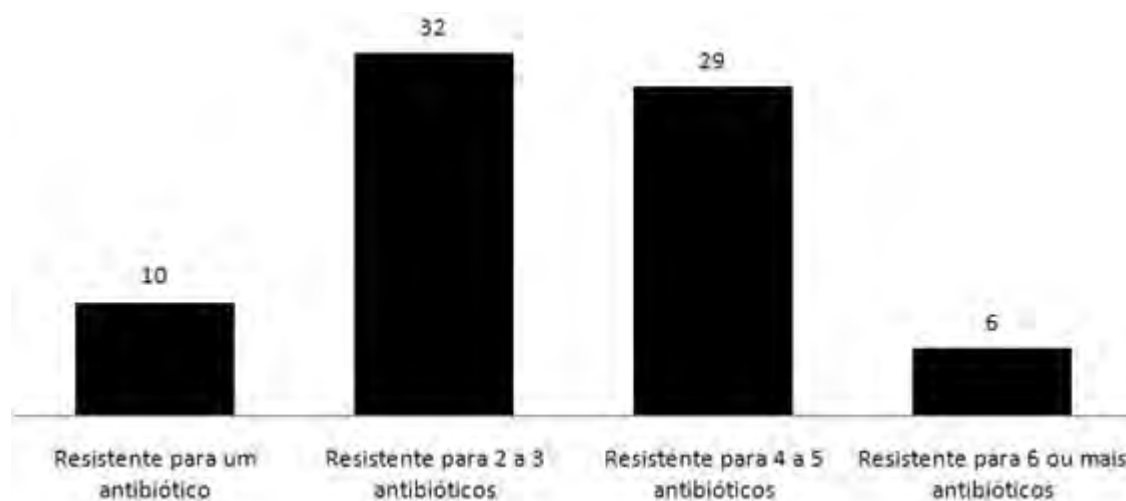


Figura 13. Perfil de resistência múltipla de estirpes de *S. aureus* isolados ao longo da cadeia produtiva de suínos para estudo epidemiológico longitudinal. Jaboticabal, 2011.

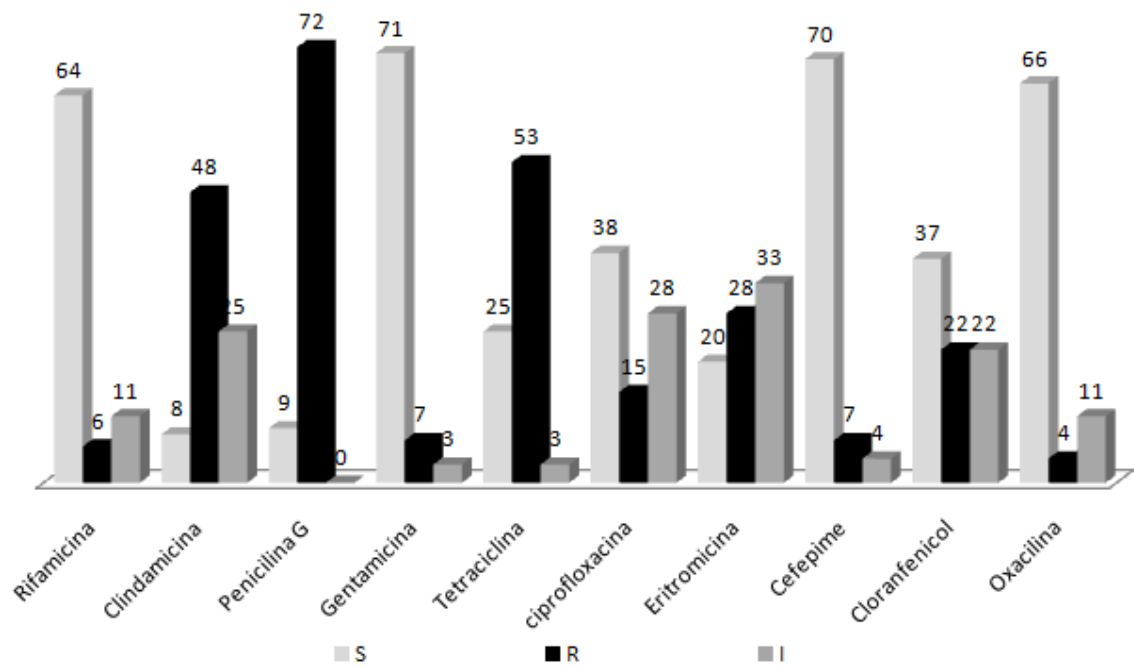


Figura 14. Perfil de resistência a antimicrobianos de estirpes de *S.aureus* isolados de suínos ao longo de sua cadeia produtiva para estudo epidemiológico logitudinal. S = sensível, I = indeterminado, R = resistente. Jaboticabal, 2011.

VI. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram a importância do *S. aureus* para a suinocultura, uma vez que, estes microrganismos foram isolados de todas as granjas e ambos os frigoríficos incluídos no estudo. O manejo higiênico sanitário adotado nas granjas influenciou a diferença no número de isolados. A classificação das granjas em relação aos aspectos de biossegurança considerando, principalmente, o intervalo entre os lotes e os programas de limpeza e desinfecção demonstrou que as granja 4 e 5 apresentaram condições mais favoráveis à contaminação das instalações porquê utilizavam o manejo contínuo. Outras deficiências higiênico – sanitárias foram observadas em relação ao programa de limpeza e desinfecção. Estas granjas foram classificadas como do tipo C. Segundo alguns autores, outros fatores podem favorecer a presença do agente no ambiente, destacando-se o status sanitário a idade dos animais e alguns fatores geográficos (KHANNA et al., 2008).

Nos frigoríficos 56 % dos isolados tiveram sua origem nos suabes nasais. Resultados semelhantes, porém, com prevalência de 70,8% e 64,7% foram

encontrados por TENHAGEN et al. (2009) e BENEKE et al. (2011). A presença de *S. aureus* em outros pontos do abate e principalmente na carcaça e após a refrigeração, em menor frequência, também foi encontrada por SOCORRO et al. (2004) comprovando que nestes pontos, também, existem riscos de contaminação das carcaças e à saúde pública.

Quatro isolados apresentaram-se, fenotipicamente, resistentes a oxacilina, porém negativas para o gene *mecA* que expressa a resistência à metilicina. LEE (2003) encontrou comportamento semelhante em dois *S. aureus* isolados de suínos também *mecA* negativos. Este fato pode ser explicado, já que o método de difusão em disco para a detecção de MRSA não é o de eleição, e falsos positivos podem ocorrer (JORGENSEN et al., 1991) pois, *S. aureus* produzem outras beta-lactamases fenotipicamente indistinguíveis (TURUTOGLU et al., 2006). A metodologia empregada, também pode interferir no diagnóstico e identificação de estirpes resistentes a metilicina (KHANNA et al., 2008).

A ausência do gene *mecA* também foi descrita por BAGCIGIL (2007) que avaliou 400 amostras de *S. aureus* isolados de animais domésticos incluindo 100 suínos. Na literatura, podemos encontrar diferentes prevalências de MRSA pelo mundo. Na Coreia a prevalência de MRSA em suínos variou de 0 a 7,8% e de 0 a 50% para as granjas (LIM et al., 2011). No Japão a prevalência encontrada foi de 0,9% (BABA et al., 2010) e na Malásia de 1,38% (NEELA et al., 2009). Dentre os países asiáticos a China foi o país com maior índice de MRSA (11,8%) (CUI et al., 2009). No continente europeu e na América do norte as prevalências são bem mais altas, sendo de 49% na Alemanha (TENHAGEN et al., 2009), 39% na Holanda (NEELING et al., 2007), 21% na Espanha (GÓMEZ-SANZ et al., 2010), 36% nos Estados Unidos (SMITH et al., 2009) e 26% no Canadá (KHANNA et al., 2008).

As análises microbiológicas foram bem sensíveis para o isolamento inicial e apesar de laboriosas e de requerer maior tempo para o diagnóstico podem seguramente ser aplicadas ao diagnóstico. Para a identificação da espécie outras provas seriam necessárias. Já as técnicas moleculares (PCR) mostram maior

especificidade para a identificação de *S. aureus* uma vez que 80% dos isolados foram confirmados como *S. aureus*.

A amplificação do gene *coa* indicada para identificação de *S. aureus*, apresentou a amplificação com diferentes tamanhos de fragmentos. O polimorfismo para este gene também foi descrito em amostras do continente europeu (SILVA et al., 2003; SANJIV et al., 2008; SINDHU et al., 2010) e no Brasil (COELHO et al., 2009) sendo atribuído a diferenças estruturais do gene (GOH et al., 1992) .

A ausência de outras espécies de *Staphylococcus* spp. está condicionada aos critérios utilizados para a triagem e isolamento microbiológico inicial, uma vez que os objetivos desde trabalho foi pesquisar *S. aureus* resistentes a meticilina e outros segmentos de primers específicos para outras espécies foram utilizados para certificar a ausência de outros *Staphylococcus* spp coagulase positivos entre os isolados.

Poucos isolados (n=10) foram resistentes somente para um antibiótico. Maior resistência foi observada para penicilina G e tetraciclina, antibióticos frequentemente utilizados na suinocultura. A quantidade de *S. aureus* acima de dois antibióticos (multirresistentes) foi predominante e os princípios ativos que os apresentaram menor eficiência foram respectivamente penicilina G, tetraciclina, clindamicina, eritromicina e ciprofloxacina. A resistência à clindamicina também foi encontrada por KADLEC et al. (2010). Seis amostras foram resistentes a mais de seis antibióticos.

Grande quantidade de *S. aureus* resistentes a penicilina (31%), tetraciclina (14%) e clindamicina (8%) principalmente nos isolados de suínos foi descrito no Canadá (RUBIN et al., 2011). A resistência para penicilina geralmente é elevada mas variável entre alguns países. Na Bélgica foram encontrados 60% de resistência, na Dinamarca 84%, na Alemanha 25%, no Japão 38% e no Reino Unido 32% (AARESTRUP et al., 2008). Já na Turquia observou-se 100% de resistência para penicilina (TURUTOGLU et al., 2006).

A capacidade dos *Staphylococcus* spp. adquirir resistência já é conhecida desde a década de 70 (LOWY, 2003). As bactérias podem adquirir resistência aos antibióticos de uma forma intrínseca ou através da aquisição de elementos genéticos carreando genes de resistência. A persistência desta resistência no animal depende de um grande número de fatores externos, como o estresse, transporte, manejo, doses terapêuticas utilizadas ou exposição prévia dos animais a antibióticos (VAZ, 2009).

Na suinocultura, o ponto crítico do uso destas substâncias é sua utilização como aditivos promotores de crescimento que pode ocorrer devido a ingestão de subdoses seja por deficiência no preparo da ração (mistura) ou na quantidade ingerida pelos suínos (PALERMO-NETO, 2011).

Relatos de multirresistência em humanos e animais incluindo os suínos, como observado neste estudo são facilmente encontrados na literatura (TUROTUGLU et al., 2006; MEGOTTO & PICOLI, 2007; AARESTRUP et al., 2008; COELHO et al., 2008; SCHLEGELOVA et al., 2008; TENHAGEN et al., 2009; KADLEC et al., 2010; RUBIN et al., 2011).

Em centrais de inseminação o perfil de resistência observado para *Staphylococcus* spp. foi resistência à rifampicina, norfloxacin, lincomicina e vancomicina. Para Ampicilina, ceftiofur, gentamicina, doxicilina, florfenicol, penicilina e estreptomicina observaram-se sensibilidade. Já para tetraciclina foi indeterminado (BATISTA et al., 2011).

O grande número de *S. aureus* resistentes a tetraciclina, eritromicina e clindamicina encontrados são considerados frequentes (van der WOLF et al. 2008). O maior índice de resistência para tetraciclina (68%) foi encontrada em *S. aureus* isolados de suínos quando comparado com outras espécies de interesse econômico (GOUSIA et al., 2011). BAGCIGIL et al. (2007), também descreve alta incidência de resistência a tetraciclina. Estes mesmos autores também observaram grande quantidade de *S. aureus* resistentes a clindamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e a rifampicina.

A resistência para eritromicina esta associada ao gene de resistência à macrolídeos (*ermC*) (LUTHJE & SCHWARS, 2006) e relaciona-se ao uso de outros macrolídeos como por exemplo a tilosina (BAGCIGIL et al., 2007) e lincosamidas (AUBRY-DAMON et al., 2004) amplamente utilizadas para o tratamento e prevenção de doenças entéricas e respiratórias dos suínos.

O perfil de resistência de MRSA isoladas em ambiente hospitalar demonstrou 72,5% de resistência à penicilina, 45% à eritromicina e 17,5% para tetraciclina. No Brasil, fora do ambiente hospitalar, MRSA apresentou 100% de resistência a penicilina, e 66% à eritromicina (MENEGOTTO & PICOLI, 2007). Algo semelhante foi observado por TENHAGEN et al. (2009), porém com maior índice de resistência para tetraciclina (100%), eritromicina (80,5%) e clindamicina (80,7%).

A literatura indica, entretanto, grande variabilidade no perfil de resistência aos antimicrobianos entre granjas, regiões e países (AARETRUP et al., 2008). Epidemiologicamente, a disseminação de *Staphylococcus* spp. multirresistentes vem apresentando mudanças tanto em medicina humana como veterinária (RUBIN et al., 2011).

Assim sendo, o potencial de mutação e alterações genéticas entre bactérias, combinado com o curto tempo de geração das bactérias, é de grande importância na limitação do uso de drogas para o controle de infecções nos animais (VAZ, 2009) e comprova claramente a importância epidemiológica e os riscos do uso inapropriado de antimicrobianos na produção animal, em especial a suinocultura.

VII. CONCLUSÕES

S. aureus mostraram-se importantes agentes, sendo isolados de todas as granjas e frigoríficos amostrados. Principalmente nas fases de crescimento, terminação e após insensibilização na linha de abate.

Não foram identificados *S. aureus* portadores do gene *mecA*, nas granjas e frigoríficos amostrados.

A incidência de *S. aureus* portadores dos genes de virulência foi alta entre os isolados devendo sua presença ser considerada na epidemiologia de resistência aos antimicrobianos testados.

Os maiores índices de resistência foram observados para penicilina, tetraciclina clindamicina e eritromicina.

VIII. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.; M.; DURAN, C.; O.; BURCH, G. S. Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 9, n.2, p. 135-148, 2008. doi: 10.1017/S1466252308001503.

AMORENA, B. et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed “in vitro”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 44, n.1, p. 43-45, 1999.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39 p.2151-2156, 2001.

ARMAND-LEFEVRE, L. RUIMY, R.; ANDREMONT, A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.11, n.5, p.711-714, 2005.

AUBRY – DAMON, H.; et al. Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 10, n. 5, p. 873 – 879, 2004.

BABA, K.; I. et al. Isolation of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in Japan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.36, p.352-354, 2010.

BAELE, M, et al. The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *Journal of applied microbiology*, Oxford. 2001;91:997–1003

BAGCIGIL, F.A.; et al. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicilin and erythromycin-resistant staphylococci in nasal cavity of domestic animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.121, p.307-315, 2007.

BAKER, S. R. et al. A pilot study of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in swine populations of Brazil and United States. **Proceedings in: American Association of Swine Veterinarians**, 2008.

BARCELLOS, D. E. S. N & SOBESTIANSKY, J. Uso de antimicrobianos em suinocultura. Goiânia: BC/UFG, 1998. p. 5 - 107. Algumas páginas: p. 8 – 10.

BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J.; SOBESTIANSKY, T. B. Uso de antimicrobianos. In: _____. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Canone, 2007. cap 16, p. 685 – 717.

BATISTA, F. et al. Teste de sensibilidade a antibióticos em bactérias isoladas de sêmen suíno. In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários

Especialistas em suínos (ABRAVES), 15., 201, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: ABRAVES, 2011. 1 CD – ROM.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**. Philadelphia, v. 45, p. 493-496, 1966.

BENEKE, B. et al. Prevalence of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* in a fresh meat pork production chain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.74, n.1, p. 126 – 129, 2011.

BERTSCHINGER, H.U.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections - coliform mastitis In: STRAW, E. B.; D'ALLAIRE, S. MENGELING, W. L. (ed.) **Diseases of Swine**. 8 ed Iowa: Iowa State University, 1999. cap. 32, p. 431 – 468.

BIBERSTEIN, E. L. & HIRSH, D.; C. Estafilococcus. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (ed.) **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 1, p. 108 – 112.

BIGNARDI, G. E.; et al. Detection of the mec-A gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v37 n.1, p. 53- 63 1996.

BOLANO, A.; et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.1, 221-224, 2001.

BUSSCHER, J. F. et al. The prevalence of methicillin-resistant *staphylococci* in healthy horses in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.113, p. 131-136, 2006.

CADDICK, J. M. et al. Description and critical appraisal of principal components analysis (PCA) methodology applied to pulse-field gel electrophoresis profiles of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.65, p. 87-95, 2006.

CHAPIN, A. et al. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. **Environmental Health Perspectives**, Carolina do Norte, v. 113, n. 2, p.137-142, 2005.

CARDOSO, M.R.I.; et al. Inocuidade dos alimentos de origem suína In: Congresso da associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES), 15., Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: ABRAVES, 2011. 1 CD – ROM.

CHRISTENSEN, G.; SØRENSEN, V.; MOUSING, D. Diseases of the respiratory system In: STRAW, E. B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. (ed.) **Diseases of Swine**. 8 ed. Iowa: Iowa State University, 1999. cap. 61, p. 913 – 940.

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

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5. ed. Wayne: Approved Standard M7-A5, v. 20, 2005.

COELHO, S.; M.; O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n. 5, p.369-374, 2009.

CRAMTON, S. E. et al. The intercellular adhesion (*ica*) locus is presence in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67 p.5427-5433, 1999.

CUCARELLA, C. et al. Bap a *Staphylococcus aureus* surface involved in biofilm formation. **Journal Bacteriology**, Washington, v.183, p. 2888-2896, 2001.

CUI, S. et al. Isolation and characterization of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** London, v. 64, p. 680 – 683, 2009.

DROLET, R.; DEE, S. A. Diseases of the urinary system. In: STRAW, E. B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. (ed.) **Diseases of Swine**. 8 ed Iowa: Iowa State University, 1999. cap. 63, p. 959 – 976.

EUZÉBI J.; P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Staphylococcus***. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 09 de out. 2011.

EVERITT, J.; I. et al. Porcine necrotizing Staphylococcal endometritis. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 18, n125, 1981, doi: 10.1177/030098588101800116

FERREIRA, V.C.S. et al. Condições de abatedouros no Estado da Paraíba. In: Congresso da Associação Brasileiras de Veterinários Especialistas em suínos (ABRAVES), 15. 2011, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: ABRAVES, 2011 1 CD-ROM.

FLACH, J.; KARNOPP, C; CORÇÃO G. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 33, p. 291-296, 2005.

FOSTER, T.J. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, Kidlington, v. 9, p. 221 – 227, 1991.

GANTER, M.; KIPPER, S.; & Hensel, A. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage of live anaesthetized pigs. Proceeding... International Pig Veterinary Society, 1990 11:109.

GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 584-553, 1980.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Penicillin-Binding Proteins and Bacterial Resistance to β -Lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.37 n. 10, p.2045-2053, 1993.

GERKE, P. et al. Characterization of N-acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* – polysaccharide intercellular adhesion. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273 p.18586-18596, 1998.

GIBBS, S. G. et al. Airborne antibiotic resistant and non resistant bacteria and fungi recovered from two swine herd confined animal feeding operations. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, Philadelphia, v. 1 p.699-706, 2004.

GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 51, p. 245-248, 2003.

GOH, S. H. et al. Molecular typing of *Staphylococcus* on the basis of coagulase gene polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington , v.30, p. 1642-1645, 1992.

GOMES, M. J.P. **Gênero *Staphylococcus* spp.** Disponível em: < <http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/Staphylo201102.pdf>>. Acesso em: 09 de out. 2011.

GÓMEZ-SANZ, E. et al. Detection molecular characterizatón, and clonal diversity of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont , v. 7, p. 1269 -1277, 2010.

GOUSIA, P. et al. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v.8, n.1, 2011, doi:10.1089/fpd.2010.0577.

HERMANS, K.; DEVRIESE, L.; A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus*. In: GYLES, C. L.; et al. (ed.) **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4^o ed. Iowa: Wiley - Blackwell, 2010. cap. 5, p. 75 – 89.

HOLLBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Kobenhavn, v. 45, p.1-144, 1973 (Supplement).

HUIJSDENS, X. W. et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.5:26 2006.

JACKSON, P. G. G.; COCKCROFT, P.D. Diseases of the skin In: _____. **Handbook of Pig Medicine**. Cambridge: Saunders Elsevier, 2007. cap. 6, p. 117 – 132.

JORGENSEN, J. H. et al. Mechanisms of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 33, p. 991- 994, 1991.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, et al. MRSA Transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.13, n.4, p.630-632, 2007.

KADLEC, K. et al. Small plasmids carryng *vga(A)* or *vga(C)* genes mediate resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from swine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.65, p. 2692-2698, 2010. doi:10.1093/jac/dkq365.

KATSUMI, M. et al. Bacterial isolation from slaughtered pigs associated with endocarditis, especially the isolation of *Streptococcus suis*. **The Journal of veterinary medical science**, Tokyo, v. 59, n. 1, p. 75 – 78, 1997.

KHANNA, T.; et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 128, p.298-303, 2008. Disponível em: <[http://dx. doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.006)>.

LEE, J. H. Methicilin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major foof animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n11, p. 6489 – 6494, 2003.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45 p. 999-1007, 2001.

LIM , S. K. et al. The first detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST 398 in pigs in Korea. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam , (2011), doi: 10.1016/j.vetmic.2011.08.011.

LIMA, E., S., C., et al. Isolamento de *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio as sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n.4, 2004.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation, Nova Iorque, v.111, n. 9, p. 1265-1273, 2003. doi:10.1172/JCI200318535.

LUTHJE, P. & SCHWARS, S. Antimicrobial resistant of coagulase-negative *staphylococci* from subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.57, p. 966-969, 2006.

MACHADO, A. B., M. et al. Distribution of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (SCCmec) types I ,II, III and IV in coagulase-negative *staphylococci* from hospital patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.56, p.1328-1333, 2007.

MANGENEY, N. et al. Comparative pulse-field gel electrophoresis typing of gentamicin -resistant and – susceptible methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in France between 1991 and 1998. Changes in antibiotic susceptibility. **The Journal of Hospital Infection**, London, v.51, p.262-268, 2002.

MANRIQUE, E. I.; GALVÃO. L. L. Racionalização e controle de antimicrobianos. In: RODRIGUES, E. A. C. et al. (ed.) **Infecções Hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, p.117-130, 1997.

McKENNEY, D. et al. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide adhesion. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66 p.4711-4720, 1998.

MENEGOTTO, F. R. & PICOLI S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, Rio Janeiro, v. 39, n. 2, 2007.

MENIN, A. et al. Diagnóstico de infecção urinária em fêmeas suínas produtivas em granjas comerciais no sul do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n.1, p. 199 -206, 2008.

MERLINO, J. et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney Australia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.49, p.793-801, 2002.

MOMBACH, A. B. et al. Distribution of *Staphylococcal* cassette chromosome mec (SCCmec) types I , II III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.56, p.1328-1333, 2007.

MOTTIN, V. D.; FISCH, E.; CARDOSO, M. Avaliação microbiológica de embutidos cozidos de carne suína, fatiados e comercializados no município de Porto Alegre, RS. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES), 13, 2007, Florianópolis, Brasil. **Anais...** p. 298-300.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998. v.1, 604p.

NEELA, V. et al. Prevalence of ST9 methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs and handlers in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 4138-4140, 2009.

NEELING, A. J. et al. High prevalence of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, p. 366-372, 2007. Disponível em: <[http:// dx.doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.027](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.027)>.

NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 120, p. 292-299, 2007.

O'SULLIVAN, T.; et al. Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.75 p.106–111, 2011.

OVERESCH, G.; et al. The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland. **BMG Veterinary Research**, London, v. 7, n.30 , 2011. Disponível em: [doi:10.1186/1746-6148-7-30](https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-30)

PALERMO-NETO, J. O problema do uso inadequado de antibióticos na produção de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, supl. 35, p. S1 – S8, 2007.

PALERMO-NETO, J. **Uso de antimicrobianos em suinocultura e desenvolvimento de resistência bacteriana: uma análise de risco** Disponível em: <http://www.porkworld.com.br/artigos/post/uso-de-antimicrobianos-em-suinocultura-e-desenvolvimento-de-resistencia-bacteriana-uma-analise-de-risco>. Acesso em: 16 nov. 2011.

RUBIN, E.; J.; KATHERINE, R.B.; CHIRINO-TREJO, M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from various animals. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 52, p.153-157, 2011.

SANJIV, K. et al. Epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphism of coa gene. **Veterinarski Arhiv**, Zagreb, v. 78, n. 1, p. 91-38, 2008.

SANTOS, B.M.O.; DARINI A.L.C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores sãos relacionados de uma creche de hospital universitário. **Medicina Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v.35, p. 160-172, 2002.

SASAKI, T. et al. Multiplex –PCR method for species identification of coagulase – positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, London, v.48, n. 3, p. 765 – 769, 2010.

SCHLEGLOVA, J.; et al. Resistance to erythromycin of staphylococcus spp. Isolates from the food chain. **Veterinarni medicina**, Praga, v.53, n. 6, p.307-314, 2008.

SCOTFIELD, A. M.; CLEGG, F.; G.; LAMMING, G.; E. Embryonic mortality and uterine infection in the pig. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.36, p.353-361, 1974.

SCOTT, D. W. Porcine: bacterial skin diseases. In: _____. **Color Atlas of Farm Animal Dermatology**. Iowa: Blackwell, 2007. cap 4.1, p. 196 – 206.

SEGUIN, J. C. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in veterinary teaching hospital: Potential human-to-animal transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, London, v.37, n.5, p.1459-1463, 1999.

SERGIO, D. M. et al. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, p.1107-1109, 2007.

SILVA, W. P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, suppl. 1, p. 125-127, 2003.

SINDHU, N.; SHARMA, A.; JAIN, V.K. Coagulase gene based molecular detection of *Staphylococcus aureus* directly from mastitic milk samples of murrah buffalo. **Buffalo Bulletin**, Bangkok , v. 29, n, 1, p. 52-59, 2010.

SMITH, T. C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in mild western U.S. swine and swine workers. **Plos One**, São Francisco, v4 , n. 1, e4258.1-e4258.4, 2009.

SOBESTIANSKY, J.; et al. **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: Art 3, 1999 p. 12 – 16, 19 -20, 35 -39.

SOCORRO, E. et al. Isolamento de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n. 4, p. 185-190, 2004.

SPECHA, C.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Microbiological contamination of pig carcasses at different stages of slaughter in two European Union - approved

abattoirs. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.69, n.11, p. 2568 – 2575, 2006.

TIEMERSMA, E. W. et al. Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.10, p. 1627-1634, 2004.

TAYLOR, D. J. *Staphylococci*. In:_____. **Pig Diseases**. 5. ed. Cambridge: Burlington Press, 1989, p. 171

TAYLOR, D. J. Miscellaneous bacterial infections. In: STRAW, E. B.; D'ALLAIRE, S. MENGELING, W. L. (ed.) **Diseases of Swine**. 8. ed Iowa: Iowa State University, 1999. cap. 44, p. 613 – 642.

TENHAGEM, B. A. et al. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. **Veterinary Record**, London, v. 165, n. 20, p. 589 – 593, 2009.

TURUTOGLU, H.; ERCELİK, S.; OZTURK, D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 50, p. 41-45, 2006.

VAN CLEEF, B. A. G. L.; et al. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 138, p. 756 – 763, 2010.

van der WOLF, P.; J.; ROTHKAMP, A.; BROENS, E.; M. *Staphylococci* and MRSA isolated from pigs with clinical symptoms. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS 20., Durban. **Proceedings**...Durban: IPVS Annals, 2008. P.166.

van DUIJKEREN, E. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 126 p.383-389, 2008.

VASUDEVAN, P. et al. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 92 p. 179-185, 2003.

VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinaria**, Porto Alegre, v. 37, supl. 1, p. S147 – S150, 2009.

VOSS, A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.11, n.12, 2005.

WALKER, J, R. et al. Epidemiological characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the North West of England by protein A (*spa*) and coagulase (*coa*) gene polymorphisms. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, 121, 507 – 514, 1998.

WALTHER, B. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at university hospital during routine microbiological examinations. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.127, p.171-1178, 2008.

WEESE, J. S. et al. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.114, p.160-164, 2006a.

WEESE, J.S. et al. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.115, p.148-155, 2006b.

WEESE, J. S.; et al. *Clostridium difficile* and methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter - age pigs. **BMG Veterinary Research**, London, v.7 n .41, 2011. Disponível em : doi:10.1186/1746-6148-7-41.

WEGENER, H.; C. & SKOV-JENSEN, E.; W. A longitudinal study of *Staphylococcus hyicus* colonization of vagina of gilts and transmission to piglets. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 109, p.433-444, 1992.

WHO – World Health Organization. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 27 de Nov. 2011.

WIKIPÉDIA. **Staphylococcus**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus>>. Acesso em: 09 de out. 2011.