

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE GRANJAS E FRIGORÍFICOS DE SUÍNOS

Guido Carlos Iselda Hermans Masson¹, Guadalupe Sampaio Ferreira¹, Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho¹

¹ UNESP Jaboticabal
Correspondência: Guido Masson: guidomasson@gmail.com

RESUMO: Microrganismos da espécie *S. aureus* são responsabilizados por diversos problemas clínicos em suinocultura e humanos. Estudos epidemiológicos comprovam o potencial deste microrganismo em adquirir resistência a antibióticos. Atualmente, estirpes resistentes a meticilina conhecida pela sigla MRSA derivada do inglês (Meticilin Resistant *Staphylococcus aureus*), 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 colheram-se 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* para confirmação do gene da coagulase, *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 quatro amostras isoladas de funcionários das granjas. Nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*. Em relação aos genes *icaA* e *icaD*, observou-se predominância 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-chave: antibiograma; biofilmes; MRSA; suínos; *staphylococcus*; resistência

ANTIBIOTIC RESISTANT PROFILE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM PIGS FARMS AND SLAUGHTERHOUSES

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* are involved in a wide range of clinical problems to swine industry as well as in humans. Epidemiological researches prove its potential to acquire resistance to antibiotics. Nowadays, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are responsible for nosocomial infections and many studies are done because MRSA are spread to extra-hospital environment and frequently isolated from domestic animals including pigs. The aim of this study was to determine the presence of *S. aureus* at swine farms and identify the *mecA*, *icaA* and *icaD* genes and the resistant profile to antibiotics. Overall, 458 swabs were taken from five pig farms and two slaughterhouses. All the samples were placed on Braid - Parker and blood agar followed 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 evaluate methicillin-resistant as well as the virulence genes *icaA* and *icaD* that can determine slime production. Antibiogram were done to evaluate the response to 11 antibiotics. All pig farms and slaughterhouse were positive and 81 (79%) samples were *S. aureus* positive including four isolates from pig employees. The *mecA* gene was not detected. The *icaD* gene was most frequent and 41% were positive to both genes. The antibiogram shows a lot of samples penicillin and tetracycline resistant. Most of the samples were multiresistant.

Key Words: antibiogram; MRSA; pig; resistant; slime; *staphylococcus*

INTRODUÇÃO

Microorganismos do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positiva e que fermentam glicose com produção de ácido. Atualmente, o gênero é composto por aproximadamente 27 espécies, algumas frequentemente encontradas na pele e nas mucosas nasais de humanos e animais (Baker *et al.*, 2008). São bactérias patogênicas que podem causar infecções cutâneas, infecções oportunistas e até mesmo septicemias fatais (Murray *et al.*, 1998).

Um dos aspectos a ser levado em consideração na epidemiologia de *S. aureus* é sua multiresistência a antimicrobianos. Neste aspecto, atualmente, a maior preocupação envolve *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e outros β -lactâmicos. Os MRSA são microrganismos emergentes e mundialmente disseminados, responsáveis por inúmeras infecções nosocomiais (Mangeny *et al.*, 2002; Caddick *et al.*, 2006) e é um dos microrganismos mais estudados visto a sua importância em Saúde Pública e distribuição mundial, inclusive no Brasil, onde o MRSA foi isolado recentemente em um hospital em Porto Alegre (Machado *et al.*, 2007).

A incidência de animais domésticos portadores e infectados com MRSA tem sido descrita com frequência em vários países e espécies animais (Busscher *et al.*, 2006; Weese *et al.*, 2006; Juhász-Kaszanyitzky *et al.*, 2007; Walther *et al.*, 2008), inclusive em suínos e indivíduos que trabalham com a espécie (Armand-Lefevre *et al.*, 2005; Huijsdens *et al.*, 2006; Sergio *et al.*, 2007).

Bagcil *et al.* (2007) relataram que, o *Staphylococcus aureus* presente na mucosa nasal pode ser transmitido entre

animais e humanos. Utilizando-se da técnica de Pulse Field em Gel de Agarose (PFGE), Huijsdens *et al.* (2006) observaram que *S. aureus* isolados de suínos e humanos em uma granja na Holanda mostraram-se geneticamente idênticas.

Outro aspecto relevante na epidemiologia de *S. aureus* é sua capacidade de se aderir às 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 a todas as espécies de microrganismos, pois fornece proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (Gilbert *et al.*, 2003).

A capacidade do *S. aureus* 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* (Mc Kenney *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).

Com base nestas informações realizou-se estudo para a avaliação da presença de *S. aureus* em suínos em diferentes fases do ciclo de produção com o objetivo de avaliar a presença dos genes *mecA*, *icaA* e *icaD* bem como, o perfil de resistência a antimicrobianos das estirpes isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem: O cálculo do número de amostras coletadas por cada granja e fase do ciclo de produção foi realizado tomando como base na 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 suabes nasais de suínos de cinco granjas de ciclo completo e de dois frigoríficos um com serviço de inspeção Estadual e outro com serviço de inspeção Federal.

As amostras originárias das granjas foram coletadas de animais em diferentes fases do ciclo de produção (PL – porcas lactantes, LL - leitões lactentes, LC- leitões de creche, SC – suíno em crescimento, ST – suíno em terminação). 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 de cada setor, 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. 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 antes da higienização. As amostras nasais foram colhidas, conforme já descrito anteriormente, ou seja, introdução do suabe na narina e leve fricção na mucosa nasal.

Nos frigoríficos 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.

Todas as amostras foram transportadas ao Laboratório em tubos estéreis contendo 5 mL de caldo Mueller Hinton Oxoid (CM0405) acrescidos com

7% cloreto de sódio (NaCl) dentro de caixa isotérmicas.

Isolamento Bacteriológico: 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) (Holmberg, 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 metilina.

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

Extração do 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.

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 1 e os ciclos de amplificação na Tabela 2.

Tabela 1. 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, 2012.

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

pb – Pares de Base

Tabela 2. Etapas para amplificação dos genes *mecA*, *coa*, *icaA* e *icaD*. Jaboticabal, 2012.

Etapas	<i>mecA</i>	<i>Coa</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
Desnaturação	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	10 min. a 72	10 min. a 72	10 min. a 72

*Para estas três etapas foram realizados 30 ciclos

A PCR para identificação de espécies foi realizada conforme (Sasaki *et al.*, 2010), porém individualmente para cada um dos primers testados. 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.

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).

Antibiograma: 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 Müller-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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 458 amostras colhidas nas cinco granjas e nos dois frigoríficos, 103 (22,5%) isolados foram classificados como *Staphylococcus* spp. coagulase positivos. Destas, 45 foram 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 3). As amostras restantes (n = 58) foram isoladas a partir das amostragens realizadas nos frigoríficos, durante o processo de abate (Tabela 4).

Tabela 3. 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, 2012.

	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.

Tabela 4. 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 na região noroeste de São Paulo, Jaboticabal 2012.

	Cavidade	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

Tais resultados revelam que as prevalências de *Staphylococcus* spp. nas granjas e nos frigoríficos foram muito próximas, variando entre 10% e 12% respectivamente e demonstraram a importância do *S. aureus* para a suinocultura. Entretanto, maiores incidências podem ser encontradas e estão relacionadas a fatores que favorecem a presença do agente no ambiente como o status sanitário a

idade dos animais além de fatores geográficos (Khanna *et al.*, 2008).

Não houve crescimento de colônias bacterianas semeadas em ágar cromogênico – “Oxacilin Resistant *Staphylococcus aureus*” (ORSA) suplementado oxacilina.

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* (Tabela 5) e também positivas para o gene da coagulase (*coa*) que apresentou três tamanhos de fragmentos após amplificação (Figura 1) com 600 pb (2 amostras), 750 pb (16 amostras) e 850 pb (63 amostras). 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).

Tabela 5. Amostras amplificadas após PCR utilizando primer espécie específico para *S. aureus* a partir de microrganismos isolados da cavidade nasal de suínos, cavidade nasal e mãos de funcionários de suinocultura, Jaboticabal, 2012.

	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.

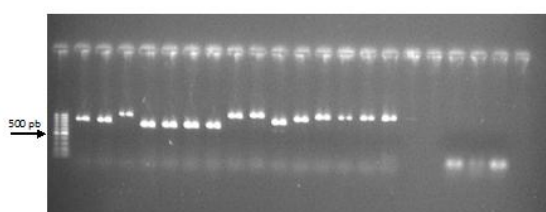


Figura 1. Amostras de *Staphylococcus aureus* positivas para o gene *coa* após avaliação molecular. Foram observados três padrões de amplificação 600 pb, 750 pb e 850 pb. Jaboticabal, 2012.

Nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*, que expressa, resistência

para meticilina confirmando o resultado encontrado na bacteriologia. 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 Corrêia 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.*, 2009) 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 (Gomez-Sanz *et al.*, 2010), 36% nos Estados Unidos (Smith, 2009) e 26% no Canadá (Khanna *et al.*, 2008).

As análises moleculares revelaram ainda que dentre os *S. aureus* isolados 38 (47%) foram positivas para o gene *icaA* e 62 (76,5%) para o gene *icaD*. Trinta e três (41%) das amostras foram positivas para ambos os genes.

Os dados da figura 2 demonstram que 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 Lima *et al.* (2004) comprovando que nestes pontos também existe risco de contaminação das carcaças e à saúde pública.

Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos

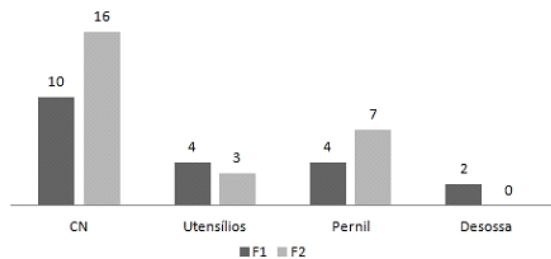


Figura 2. Representação gráfica do número de *Staphylococcus aureus* isolados na linha de abate de suínos. Amostras colhidas em dois frigoríficos (F1 e F2) na região noroeste do Estado de São Paulo. Utensílios (Facas, chairas e ganchos utilizados pelos magarefes ao longo da linha de abate).

Os resultados do teste de resistência a antimicrobianos estão descritos na Tabela 6 e ilustrados graficamente nas Figuras 3 e 4. 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 3). Os maiores índices de resistência foram encontrados para penicilina, tetraciclina e clindamicina (Figura 4).

Tabela 6: Principais fases do ciclo de produção de suínos onde se observou resistência a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus* spp isolados de suínos, Jaboticabal 2012.

	PL	LL	LC	SC	ST	Func.	Frig.
Rifamicina			X	X	X		X
Clindamicina	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 na maternidade (lactante); LL: leitão lactente; LC: leitão em creche; SC: suíno em crescimento; ST: suíno em terminação; Func.: funcionário granja; Frig.: Frigorífico.

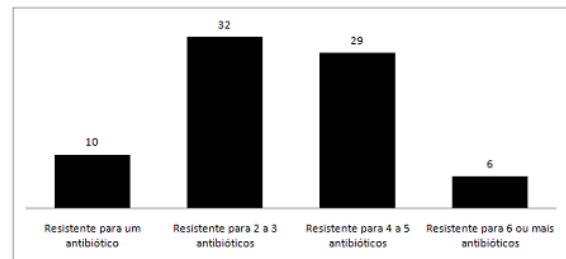


Figura 3. Perfil de resistência múltipla de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados ao longo da cadeia produtiva de suínos para estudo epidemiológico longitudinal realizado em Jaboticabal – SP em 2011.

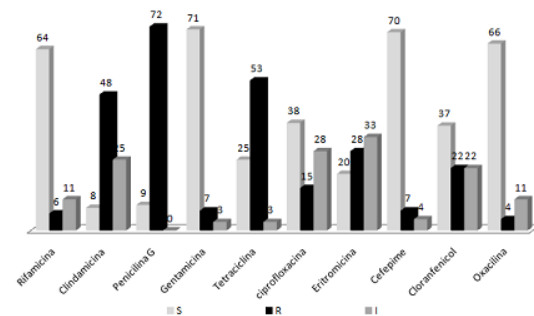


Figura 4. Perfil de resistência a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de suínos ao longo de sua cadeia produtiva para estudo epidemiológico longitudinal onde, S = sensível, I indeterminado, R = resistente. Jaboticabal – SP em 2011.

Não foram encontrados *S. aureus* resistentes a vancomicina, entretanto, um isolado, a partir de uma porca de maternidade da granja 4 apresentou resultado inconclusivo. 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.

Estes quatro isolados apresentaram-se, fenotipicamente, resistentes a oxacilina, porém negativas para o gene *mecA* que expressa a resistência à meticilina. 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, 1991) uma vez que, *S. aureus* produzem outras beta-lactamases fenotipicamente indistinguíveis (Turutoglu *et al.*, 2006).

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 inconclusivo.

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 ser 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 6 resume as principais fases do ciclo de produção onde ocorreu resistência aos antimicrobianos testados.

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 ou antibióticos (multirresistentes) foi predominante e os princípios ativos que 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%, no Reino Unido 32% (Aarestrup *et al.*, 2008) e na Turquia observou-se 100% de resistência para penicilina (Turutoglu *et al.*, 2006).

A capacidade do gênero *Staphylococcus* spp. em 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 carregando 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, onde pode ocorrer a ingestão de subdoses seja por deficiência no preparo da ração (mistura) ou a 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 (Turutoglu *et al.*, 2006; Menegotto & 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, norfloxacina, lincomicina e vancomicina. Para Ampicilina, ceftiofur, gentamicina, doxicilina, florfenicol, penicilina e estreptomicina observou-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 a 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 a penicilina, 45% a eritromicina e 17,5% para tetraciclina. No Brasil, fora do ambiente hospitalar, MRSA apresentou 100% de resistência a penicilina, e 66% a eritromicina (Megotto & 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 a 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.

CONCLUSÃO

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.

AGRADECIMENTO

A FAPESP pelo Financiamento do projeto (proc. 2008/53919-3).

Ao CNPq pela concessão de bolsa. Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini

NOTAS INFORMATIVAS

Este trabalho foi avaliado 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 nº 008064 – 08.

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.
- 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**. v.39, n.6, p.2151-2156, 2001.
- ARMAND-LEFEVRE, L. RUIMY, R.; ANDREMONTE, A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. **Emerging Infectious Disease**. v.11, n.5, p.711-714, 2005.
- AUBRY – DAMON, H.; GRENET, K.; SALL-NDIAYE, P. *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.; ISHIHARA, K.; OZAWA, M. *et al.* Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in Japan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.36, p.352-354, 2010.
- BAGCIGIL, F. A.; MOODLEY, A.; BAPTISTE, K. K. *et al.* Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin – and erythromycin-resistant *staphylococci* in the nasal cavity of domestic animals. **Veterinary Microbiology**. v.121,n. 3-4, p.307-315, 2007.
- BAKER, S. R.; MASSON, G. C. I. H.; OLIVEIRA, L. G. *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.
- 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.; KLEES, S.; STUHRENBERG, B *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a fresh meat pork production chain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.74, n.1, p. 126 – 129, 2011.
- BOLANO, A.; STINCHI, S. PREZIOSO, R. *et al.* Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.1, 221-224, 2001.
- BUSSCHER, J. F.; VAN DUIJKEREN, E.; VAN OLDRUITENBORG-OOSTERBANN, S. The prevalence of methicillin-resistant *staphylococci* in healthy horses in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**. v.113, n. 5, p. 131-136, 2006.
- CADDICK, J. M.; HILTON, A. C.; ARMSTRONG, R. A. *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**. v.65,n.1, p. 87-95, 2006.
- COELHO, S.; M.; O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I. A. *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.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F. *et al.* The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**. v. 67, n.10, p.5427-5433, 1999.
- CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J. *et al.* Bap a *staphylococcus aureus* surface involved in biofilm formation. **Journal Bacteriology**. v.183, n. 9, p. 2888-2896, 2001.
- CUI, S.; LI, J.; HU, C. *et al.* Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** London, v. 64, n.5, p. 680 – 683, 2009.
- FLACH, J.; KARNOPP, C. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores

- de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.
- GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. *et al.* Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 584-553, 1980.
- GERKE, C.; KRAFT, A.; SUBMUTH, R. *et al.* Characterization of N-acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* – polysaccharide intercellular adhesion. **Journal Biological Chemistry**. v. 273, n. 29, p.18586-18596, 1998.
- GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 51, n.4, p. 245-248, 2003.
- GOH, S. H.; BYRNE, S. K.; ZHANG, J. L. *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus* on the basis of coagulase gene polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington , v.30, p. 1642-1645, 1992.
- GÓMEZ-SANZ, E.; Torres, C.; Lozano, C. *et al.* Detection molecular characterization, 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.; ECONOU, V.; SAKKAS, H. *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.
- HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Vet. Scand.**, v. 45, p.1-144, 1973 (Supplement).
- HUIJSDENS, X. W.; VAN DIJKE, B.; SPALBURG, E. *et al.* Community-acquired MRSA and pig-farming. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.5, n. 1, p.26, 2006.
- JORGENSEN, J. H. Mechanisms of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 33, p. 991- 994, 1991.
- JUHÁSZ-KASZANYITZKY, JÁNOSI, S.; SOMOGYI, P. *et al.* MRSA Transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.4, p.630-632, 2007.
- KADLEC, K.; POMBA, C. F.; COUTO, N. *et al.* Small plasmids carrying *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.
- KHANNA, T.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C. *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>.
- LEE, J. H. Methicilin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n.11, p. 6489 – 6494, 2003.
- LIM, S. K.; NAM H. M.; JANG, G. C.; *et al.* The first detection of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* ST 398 in pigs in Korea. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam , (2011), doi: 10.1016/j.vetmic.2011.08.011.
- LIMA, E. S.; PINTO, P. S.; SANTOS, J. L. *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.
- 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, M. P. A. B.; REITER, K.C.; PAIVA, R. M. *et al.* Distribution of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from hospital patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v.56, p.1328-1333, 2007.
- MANGENEY, N.; DROLLEE, K.; CLOITRE, V. *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. **Journal of Hospital Infection**. v.51, p.262-268, 2002.
- McKENNEY, D.; HUBNER, J.; MULLER, E. *et al.* The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide adhesion. **Infection and Immunity**. 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.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *et al.* **Microbiologia Médica**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998. v.1, p. 604, 1998.
- NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 21th Informational Supplement 2010, 21 (1): 168p.
- NEELA, V.; ZAFRUL, A. M.; MARIANA, N. S. *et al.* Prevalence of ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs and handlers in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 4138-4140, 2009.
- NEELING, A. J.; BROEK, M. J. M.; SPALBURG, E. C.; *et al.* High prevalence of methicillin 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>>.
- NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**. v. 120, p. 292-299, 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.; CHIRINOTREJO, 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.; KATARIA, A. K.; SHARMA, R. *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.
- SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y. *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.
- SCHLEGELOVA, J.; VLKOVA, H.; BABAK, V. *et al.* Resistance to erythromycin of *Staphylococcus* spp. Isolates from the food chain. **Veterinarni medicina**, Praga, v.53, n. 6, p.307-314, 2008.
- SERGIO, D. M.; KOH, T. K.; HSU, L. *et al.* Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. **Journal of Medical Microbiology**. V. 56, p.1107-1109, 2007.
- SILVA, W. P.; Silva, J. A.; Macedo, M. R. 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 murrh buffalo. **Buffalo Bulletin**, Bangkok, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2010.
- SMITH, T. C. 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.

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

TUROTOGLU, H.; ERCELIK, 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 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, n.5, p.383-
389, 2008.

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

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.

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

WEESE, J. S.; CALDWELL, F.; KREISWIRTH,
B. N. *et al.* An outbreak of methicillin-resistant
Staphylococcus aureus skin infections resulting
from horse to human transmission in a
veterinary hospital. **Veterinary Microbiology**.
v.114, n. 1-2, p.160-164, 2006.