

Resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp isolado de leite mastítico

Oxacillin-resistance *Staphylococcus* spp isolated from mastitic milk

RIALA6/1318

Cristiane Matoso DINIZ¹, Roberta Torres de MELO^{1,2*}, Eliane Pereira MENDONÇA^{1,2}, Leticia Ríspoli COELHO^{1,2}, Belchiolina Beatriz FONSECA³, Daise Aparecida ROSSI^{1,2}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Biotecnologia Animal e Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Rua Ceará s/n, Umuarama, Uberlândia, MG, Brasil. Tel: 34 3213-2319. Fax: 34 3218-2380. E-mail: roberta-melo@hotmail.com

²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

Recebido: 26.08.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010.

RESUMO

A mastite ocupa lugar de destaque entre as doenças que acometem o rebanho leiteiro, em virtude de problemas econômicos e de saúde pública. *Staphylococcus* spp são os agentes infecciosos mais envolvidos na etiologia da doença. *Staphylococcus* spp resistentes à oxacilina, isolados de amostras de leite provenientes de animais com histórico de mastite recorrente, foram analisadas utilizando-se os testes de difusão em gel, ágar de triagem, concentração mínima inibitória (CMI) e pesquisa do gene *mecA*. De 134 amostras de leite analisadas, *Staphylococcus* spp foi isolado em 55,22% das amostras (74/134). O teste de difusão em disco demonstrou que a maioria dos isolados apresentaram multiresistência, sendo 51,35% (38/74) resistentes à oxacilina. Esse perfil foi confirmado em paralelo pela CMI e pelo ágar de triagem. A análise molecular demonstrou que 33,78% dos isolados (25/74) possuíam o gene *mecA*, sendo mais frequentemente isolado em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativa, com índices de 48% (12/25) e 32% (8/25), respectivamente, seguido de *S. intermedius* com 16% (4/25) e de *S. hyicus* com 4% (1/25). O presente estudo denota o grave problema associado à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, bem como no meio rural, o que justifica a dificuldade de tratamento e a recorrência da infecção.

Palavras-chave. oxacilina, mastite bovina, *mecA*, *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

Mastitis is of a major concern among the diseases that affect the dairy herd due to the economic problems and public health concerns. *Staphylococcus* spp has been the infectious bacterium and the etiologic agent of this disease. The oxacillin resistance of *Staphylococcus* spp isolated from milk samples of animals with a history of recurrent mastitis was investigated. This study was performed by means of gel diffusion test, agar screening, minimum inhibitory concentration (MIC), and the *mecA* gene searching. Of 134 milk samples, *Staphylococcus* spp was isolated from 55.22% samples (74/134). By means of disk diffusion test, the majority of the isolates showed multiresistance, and 51.35% (38/74) were resistant to oxacillin. This profile was confirmed in parallel by CMI and the agar screening. By molecular analysis 33.78% of isolates (25/74) revealed the *mecA* gene, being frequently isolated from *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* at rates of 48% (12/25) and 32% (8/25), respectively, and followed by *S. intermedius* in 16% (4 / 25) and *S. hyicus* in 4% (1/25). The serious problem associated with oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* was found this study, including in rural environment and these findings justify the treatment difficulty and the recurrence of infection.

Key words. oxacillin, bovine mastitis, *mecA*, *Staphylococcus* spp.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças do rebanho leiteiro que comprometem a qualidade do leite, a mastite ocupa lugar de destaque por possuir importância econômica em saúde pública. Apesar de ser a doença mais importante em termos econômicos para a indústria leiteira, é difícil de ser controlada¹.

A etiologia da mastite pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa, destacando-se como agentes infecciosos as bactérias do gênero *Staphylococcus*².

Staphylococcus aureus possui vários fatores de virulência que contribuem para a sua persistência no tecido mamário, como produção de toxinas extracelulares e enzimas³⁻⁴. Eles se aderem às células endoteliais por meio de receptores de adesinas e são fagocitados por essas. O ambiente intracelular os protege dos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como dos efeitos dos antibióticos. Estes fatores podem aumentar a sobrevivência bacteriana contribuindo para o desenvolvimento de infecção persistente ou recorrente⁵.

Staphylococcus aureus isolados de leite mastítico bovino também apresentam características de virulência e resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença⁶. De acordo com Fagundes e Oliveira⁷, *S. aureus* é a bactéria causadora de mastite de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos. A resistência à oxacilina é um sério problema de saúde pública na área urbana e que também pode estar sendo disseminado no meio rural. Está relacionada a vários fatores como a presença do gene *mecA*, que torna os micro-organismos intrinsecamente resistentes também a outros antimicrobianos⁸.

A resistência à oxacilina é mediada pela produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) que diminui a afinidade e, assim a susceptibilidade à ação de compostos antimicrobianos betalactâmicos. A resistência aos betalactâmicos resistentes às betalactamases é mediada pelo gene *mecA*, que codifica a produção de uma PBP anômala - PBP2a ou PBP2⁹. O teste laboratorial para detectar resistência para esta droga pode ser realizado com disco de 1 µg de oxacilina¹⁰.

A importância de *S. aureus* metilicina ou oxacilina resistente aumentou a partir da década de 80, sendo considerado, atualmente, o maior problema clínico e epidemiológico em infecções hospitalares¹¹. Segundo Chambers¹², a metilicina foi preterida para uso em testes

laboratoriais de resistência porque a oxacilina é mais estável ao armazenamento e melhor para identificar as cepas heterorresistentes, embora mantenha-se o termo MRSA (*Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes) por razões históricas.

Considerando a importância do leite na economia, na alimentação humana e na possibilidade de veiculação de bactérias multiresistentes, objetivou-se com este trabalho a avaliação da resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp isolados de amostras de leite provenientes de animais de oito propriedades rurais com histórico de mastite recorrente, utilizando os testes da difusão em gel, ágar de triagem, concentração mínima inibitória (CMI) e a presença do gene *mecA*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram consideradas, para o estudo, propriedades do município de Uberlândia – MG, Brasil, onde havia relatos de mastite recorrente. Os animais analisados apresentaram recidiva em duas ou mais lactações consecutivas, mesmo quando submetidos à antibioticoterapia. Nos rebanhos estudados, o sistema de criação era semi-intensivo, com os animais ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia.

Nas oito propriedades rurais foram selecionadas para estudo 140 vacas leiteiras que se enquadravam dentro do critério adotado, ou seja, histórico de mastite em duas ou mais lactações. Na fazenda, imediatamente antes da ordenha, os animais foram submetidos ao teste da caneca telada e ao Califórnia Mastitis Test (CMT) e o leite dos animais positivos foi classificado como proveniente de mastite clínica e subclínica, respectivamente¹³.

Os animais positivos ao teste foram segregados, tiveram as tetas submetidas à lavagem com água e sabão e secagem com papel toalha estéril e, então, foi coletada amostra de leite para o cultivo microbiológico por ordenha manual em tubo de ensaio estéril.

Para isolamento e identificação dos *Staphylococcus* spp, o leite foi semeado com auxílio de *swab* na superfície de placas de Petri contendo o ágar seletivo e o diferencial, o manitol salgado (DIFCO®) e as placas incubadas a 37°C por 24 a 48 horas¹⁴. Colônias puras foram cultivadas em ágar AN (Ágar Nutriente - DIFCO®) e caldo BHI (Brain Heart Infusion - DIFCO®) por 24 horas, a 37°C e identificados como *Staphylococcus* spp, por meio da coloração diferencial de Gram¹⁵ e produção de catalase¹⁶.

Os espécimes identificados como *Staphylococcus* foram diferenciados em *Staphylococcus* coagulase positiva

ou negativa por meio do teste da coagulase em tubo¹⁷⁻¹⁸. Para diferenciar as espécies coagulase positiva *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* foram utilizados os testes: produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de β -galactosidase¹⁹⁻²⁰.

Todas as amostras identificadas como *Staphylococcus* spp foram submetidas à avaliação frente a antimicrobianos, utilizando o teste de difusão em ágar, conforme o protocolo recomendado pelo NCCLS¹⁰. Foram testados os seguintes antimicrobianos para os espécimes identificados como *Staphylococcus* spp: oxacilina 5 μ g, ampicilina 10 μ g, cefalotina 30 μ g, clindamicina 2 μ g, cloranfenicol 30 μ g, eritromicina 15 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, penicilina G 10U.I., rifampicina 5 μ g, sulfa-trimetropim 25 μ g e tetraciclina 30 μ g. Foi utilizada como controle a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Em paralelo, todos os espécimes de *Staphylococcus* spp previamente isolados e identificados foram também submetidos ao cultivo em meio de triagem (*screem*) para detecção de amostras resistentes à oxacilina. Os procedimentos foram realizados de acordo com protocolo da NCCLS²¹.

Staphylococcus spp que formaram colônias no ágar de triagem foram submetidos em paralelo às provas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em ágar e e-test (AB Biodisk) para a oxacilina.

A determinação da CIM de oxacilina foi realizada de acordo com técnica do NCCLS²¹, que recomenda o uso do ágar Muller Hinton (MH) (DIFCO®) e inóculos padronizados frente a diferentes concentrações do antibiótico. Em paralelo, a CIM foi realizada também com o uso do e-test (AB Biodisk), de acordo com recomendações do NCCLS²¹. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para *Staphylococcus* coagulase positiva e por 48 horas para os espécimes de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Os espécimes que apresentaram resistência à oxacilina em algum dos testes utilizados foram selecionadas para o teste de detecção do gene *mecA*, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A extração do DNA genômico foi feito por lise térmica. Um mililitro de uma cultura pura cultivada em caldo BHI (DIFCO®) por 18 a 24 horas foi centrifugada a 5000 rpm por 4 minutos e o sobrenadante desprezado. O material foi lavado três vezes com tampão TE (Tris EDTA, pH 8,0) e, posteriormente, ressuspenso em 100 μ L de tampão TE e aquecido a 95°C por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado por 20 segundos a 5000 rpm e o sobrenadante preservado para o teste.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN, modelo DU-640B) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm (nanômetros), sendo a relação 260/280 calculada.

Os *primers* utilizados para a análise foram os descritos na Tabela 1. O volume final para a reação de amplificação foi de 20 μ L, composto por 30ng do DNA, 2 μ L de tampão 10X (KCl 50mM, Tris-HCL (200 mM, pH 8,4), 0,6 μ L de cloreto de magnésio (4,0 mM), 0,4 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de *primer* (25 ng), 0,4 μ L de Taq DNA polimerase (10U/ μ L) e água estéril (Milli-Q) para totalizar o volume da reação. Como controle foram utilizados os mesmos reagentes, exceto o DNA alvo, que foi substituído por água ultrapura.

Tabela 1: *Primers* utilizados na identificação genotípica da resistência a oxacilina em *Staphylococcus*²²

Gene	Primers	Sequência 5' à 3'	Peso molecular (pb)
<i>mecA</i>	<i>mecA1282</i>	AAAATCGATGGTAAAGGGTTGGC	533
	<i>mecA1793</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	

A reação de amplificação em termociclador (MJ Research®) obedeceu às seguintes condições: 94°C (2 minutos), 94°C (1 minuto), 40°C (2 minutos), 72°C (2 minutos), seguidos de 39 ciclos, a partir do aquecimento a 94°C, finalizando com aquecimento a 72°C (5 minutos) e manutenção a 5°C, até o momento de serem submetidas à eletroforese.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%²³, utilizando como marcador de peso molecular o 1kb *ladder* (GIBCO). Os fragmentos de DNA foram visualizados pela incidência de luz UV (ultravioleta) e analisados em fotodocumentador.

As análises dos dados foram realizadas através de estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 140 animais selecionados para estudo (histórico de mastite recorrente), somente 4,28% (6/140) foram negativos no teste da caneca telada e no CMT, comprovando a endemicidade e recorrência da doença na população estudada, sendo consideradas, então, 134 amostras.

Nestas amostras, após cultivo em ágar manitol salgado (DIFCO®), houve positividade de 59,70% (80/134). Nas demais, 40,29% (54/134), não houve isolamento, estando

de acordo com Freitas et al⁶, que não conseguiram identificar o agente etiológico em 36,70% das amostras positivas pelo CMT ou caneca de fundo escuro. A causa da não identificação do agente etiológico nestes casos é provavelmente devido à presença de um processo inflamatório de etiologia não bacteriana ou bactérias de outros gêneros²⁴.

O uso do ágar de triagem contendo 4% de NaCl e 6µg de oxacilina tem sido utilizado como um dos métodos de confirmação para a resistência à oxacilina em provas de difusão²¹. Neste estudo, 38 espécimes demonstraram resistência na prova de difusão, já no ágar de triagem houve resistência para 28 isolados. O teste de triagem denotou eficiência de 73,68% na confirmação dos resultados encontrados na prova de difusão.

Entre os isolados resistentes a oxacilina, a multirresistência foi o padrão comumente observado,

com a maioria das amostras resistentes a sete, dos onze antibióticos testados. As amostras de *Staphylococcus* spp sensíveis à oxacilina mostraram resistência à penicilina (83,33%), ampicilina (80,55%) e rifampicina (22,22%).

O ágar de triagem demonstrou que é uma ferramenta útil na identificação de *Staphylococcus* resistentes à oxacilina e concorda com os resultados obtidos por Sadoyama²⁵ e Ribas²⁶. Porém, este método não deve ser a única forma de diagnóstico para estes espécimes, já que, quando comparado à CIM em duas ocasiões, este teste não foi capaz de demonstrar o crescimento dos micro-organismos resistentes. Os testes CIM e e-test (AB Biodisk) demonstraram 100% de concordância em todas as espécies de *Staphylococcus* analisadas (Tabela 2).

Tabela 2. Resistência a oxacilina observada nos testes de difusão em discos, ágar de triagem e CIM de 38 espécimes de *Staphylococcus* isolados de mastites recorrentes em oito propriedades rurais

Espécimes isolados	Difusão em disco	Ágar de triagem	CIM ¹ e e-test (≥4µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12	13
<i>Staphylococcus intermedius</i>	7	6	6
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	0	1
SCN	16	10	10
Total	38	28	30

¹Método da incorporação do antibiótico em ágar

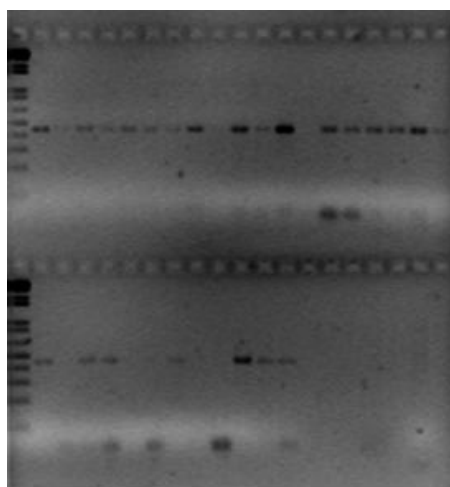


Figura 1. Amplificação do fragmento de 533pb correspondente ao gene *mecA* em 25 espécimes de estafilococos com resistência a oxacilina isolados de mastites recorrentes de oito propriedades rurais da região de Uberlândia-MG, Brasil

A análise molecular demonstrou que dos 30 espécimes de *Staphylococcus* spp previamente identificados como resistentes à oxacilina pelo teste de difusão com disco e confirmada pela CIM, 25 demonstraram possuir o gene *mecA* (Figura 1). Estas amostras representam 33,78% (25/74) de todos os estafilococos isolados. Este resultado é superior ao observado por Lee⁴, que encontrou 3,56% (15/421) cepas MRSA, em estudos realizados com amostras de outras espécies de animais. A Tabela 3 demonstra a presença do gene *mecA*, entre as diferentes espécies de estafilococos e o tipo de mastite.

O gene *mecA* foi mais frequentemente isolado em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN), com índices de 48% e 32%, respectivamente. Esses dados reforçam sua importância epidemiológica e significância na mastite, pois estas estirpes tendem a dificultar o tratamento, mesmo quando são agentes etiológicos secundários, aumentando a tendência

à cronificação da enfermidade e possibilidades de disseminação entre os animais.

A CIM determinada nos testes de incorporação do antimicrobiano em ágar e no e-test (AB Biodisk) mostraram concordância na identificação de espécimes de estafilococos resistentes a oxacilina (Tabela 4). Porém, em cinco destas amostras com CMI > 256µg/mL, o gene *mecA* não foi detectado, provavelmente este fato ocorreu devido a perda do gene. van Griethuysen et al²⁷ realizaram um estudo onde ficou demonstrado a perda do gene *mecA* em amostras mantidas em armazenamento sob congelamento. Neste estudo, os isolados foram mantidos nesta condição até o momento da análise molecular. Este resultado indica que, apesar da alta especificidade, e desta técnica ser considerada definitiva para comprovação da presença do gene, a sensibilidade da mesma pode variar com a forma e tempo de conservação das amostras.

Tabela 3. Distribuição do gene *mecA* em 25 isolados de estafilococos de mastite bovina clínica e subclínica de oito propriedades rurais de Uberlândia-MG com resistência a oxacilina (CMI≥4µg) nos testes de incorporação em ágar e e-test (AB Biodisk)

Espécie Isolada	Mastite clínica		Mastite subclínica	
	Único agente n (%)	Associado n (%)	Único agente N (%)	Associado n (%)
<i>S. aureus</i>	7 (28%)	1 (4%)	3 (12%)	1 (4%)
<i>S. intermedius</i>	0 (0%)	0 (0%)	3 (12%)	1 (4%)
<i>S. hyicus</i>	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SCNs	2 (8%)	3 (12%)	3 (12%)	0 (0%)
Total	10 (40%)	4 (16%)	9 (36%)	2 (8%)

Tabela 4. Comparação entre diferentes testes na detecção de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* isolados de mastite em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG

Técnicas	Resistente N=30	Suscetível N=44	Sensibilidade	Especificidade
e-Test	30	44	100	100
CIM (incorporação em ágar)	30	44	100	100
Ágar de Triagem	28	44	93,33	100
Difusão com disco	30	36	100	81,8
gene <i>mecA</i>	25	44	83,33	100

CMI = concentração mínima inibitória ≥4µg

O teste de difusão em discos é considerado muito sensível, mas não específico para determinar a resistência à oxacilina em bactérias do gênero *Staphylococcus*. Apesar de este teste ter sido capaz de detectar os *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, em oito ocasiões a resistência não foi confirmada pela CIM. Estes números reforçam a necessidade de testes complementares como a CIM e a presença do gene *mecA* para a confirmação da resistência à oxacilina²⁸⁻²⁹⁻³⁰.

CONCLUSÃO

Os resultados comprovaram a alta incidência de *Staphylococcus* spp como agentes etiológicos de mastites recorrentes nos rebanhos estudados e a importância deste micro-organismo nesta enfermidade.

O teste de difusão com disco (antibiograma) realizado para os espécimes do gênero *Staphylococcus* demonstrou um alto nível de resistência aos antimicrobianos testados e, entre estes, a multiresistência foi o padrão comumente observado.

A resistência à oxacilina pela detecção do gene *mecA* foi confirmada em 33,78% (25/74) dos isolados.

A técnica de difusão em discos é adequada para triagem de estafilococos resistentes à oxacilina. Para confirmação destas características devem ser utilizados testes de maior especificidade como a CMI e a detecção do gene *mecA*.

Os resultados evidenciaram presença e possibilidade de veiculação de espécimes multirresistentes por meio do leite mastítico, reforçando a importância epidemiológica da mastite na produção e saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Pyorala, S. New strategies to prevent mastitis. *Rep Domest Anim*. 2002; 37(4):211-6.
2. Cunha AP, Silva LBG da, Pinheiro Júnior JW, Silva DR da, Oliveira AA da, Silva KPC da et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq Inst Biol*. 2006; 73(1):17-21.
3. Santos FGB, Mota RA, Silveira-Filho VM, Souza HM, Oliveira MBM, Johner JM et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Rev Napgama*. 2003; 6(1):19-23.
4. Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Microbiol*. 2003; 69(11):6489-94.
5. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl J Med*. 1998; 339(8):520-32.
6. Freitas MFL, Pinheiro Júnior JW, Stamford TLM, Rabelo SS de A, Silva DR da, Silveira Filho VM da et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq Inst Biol*. 2005; 72(2):171-7.
7. Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Cien Rural*. 2004; 34(4):1315-20.
8. Carvalho CE, Berezin EM. Monitoramento microbiológico seqüencial de secreção traqueal de pacientes intubados em UTI pediátrica. *J Pediatr*. 2004; 81(1):23-9.
9. Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in *Staphylococci*: epidemiology, molecular mechanisms and Clinical relevance. *Infect Dis Clin North Am*. 1997; 11(4): 813-49.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A6, Villanova, PA, 2003.
11. Peresi JTM, Almeida IAZC de, Cardiga EA, Marques DF, Carnicel FA, Hoffmann FL. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(2):112-7.
12. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*. 2001; 7(2): 178-82.
13. Ribeiro MER, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M, Stumpf JRW, Gomes JF et al. Relação entre mastites clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *R Bras Agrobiologia*. 2003; 9(3):287-90.
14. Koneman EM, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Junior NC. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro (BR): Médsi; 2001.
15. Tortora GJ, Funke BR, Christine L. Microbiologia. 6ª ed. Porto Alegre (BR): Artmed; 2002.
16. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ª ed. São Paulo(BR): Varela; 2007.
17. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2ª ed. São Paulo (BR): Varela; 2001.
18. Hirsh DC, Zee YC. Microbiologia veterinária. Rio de Janeiro (BR): Guanabara Koogan; 2003.
19. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al. Manual of clinical microbiology. 6ª ed. Washington: American Society for Microbiology; 1995. p. 282-98.
20. Brito MAVP, Campos GMM de, Brito JRF. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Cien Rural*. 2002; 32(1):79-82.
21. National Committee for Clinical Laboratory Performance Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4, Villanova, PA, 2000.

22. Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-pegler M, Gottlieb T, Bradbury R et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(5):793-801.
23. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª ed. New York (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
24. Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Viani FC, Mascolli R, Oliveira PJ. Mastite bovina: CMT *versus* microbiológico. *Hora Vet*. 1996; 15(89):53-4.
25. Sadoyama, G. Aspectos epidemiológicos de infecções relacionadas a cateteres vasculares centrais em pacientes cirúrgicos internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia [dissertação de mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2003.
26. Ribas, RM. Infecções Hospitalares em pacientes idosos: Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares associados a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp [dissertação de mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2003.
27. van Griethuysen A, van Loo I, van Belkum A, Vandenbroucke-Grauls C, Wannet W, van Keulen P. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1361-65.
28. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, Sayed S el et al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative Staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(2):752-4.
29. Brito MAVP, Brito JRF, Silva MAS, Carmo RA. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001; 53(5):531-7.
30. Lee JH, Jeong Jae-Myung, Park Youn-Ho, Choi Sung-Sun, Kim Yong-Hwan, Chae Joon-Seok et al. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)- Screen Latex Agglutination Test for Detection of MRSA of Animal Origin. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2780-2.