



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* NA MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA.

**BRUNA FERNANDA ROSSI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos.

*Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU-SP  
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
—Júlio de Mesquita Filho  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE  
*Staphylococcus aureus* NA MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA.

**BRUNA FERNANDA ROSSI**

**VERA LÚCIA MORES RALL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos.

*Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU-SP  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rossi, Bruna Fernanda.

Caracterização molecular e fenotípica de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina subclínica / Bruna Fernanda Rossi.  
- Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 21201021

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Bovino - Doenças. 3. Mastite.  
4. Genes. 5. Tipagem molecular. 6. *Staphylococcus aureus*  
Resistente à Meticilina.

Palavras-chave: MLST; PFGE; *S.aureus*; mastite; mecA.

*Dedico esse trabalho aos meus pais Vera e José Eduardo e a toda minha família e amigos  
que estiveram presentes nessa etapa da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Meus sinceros agradecimentos...*

*À Deus pelo dom da vida, por sempre me dar força e coragem para enfrentar os desafios e seguir em frente e pelas pessoas essenciais que Ele colocou em meu caminho;*

*Aos meus pais Vera e José Eduardo que são os alicerces da minha vida, por toda dedicação, apoio, incentivo e amor incondicional. Sem vocês eu não teria chegado até aqui e nem sonharia em ir mais além;*

*Aos meus familiares, em especial aos meus padrinhos Regina e João e à minha prima Lucila por sempre estarem ao meu lado;*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia Mores Rall por me receber em seu laboratório, por acreditar em mim e por todos os ensinamentos durante esses anos;*

*Às minhas amigas de laboratório Ivana, Stéfani e em especial à Erika pela companhia do dia à dia, pela amizade e por me passar seus conhecimentos;*

*Aos meus amigos de Jaú por todos os momentos compartilhados;*

*As minhas amigas de Botucatu, que se tornaram irmãs de coração, por todo companheirismo, por todas as histórias vividas e por deixarem meus dias mais alegres;*

*À minha amiga Gabriela, por todo apoio e incentivo, por muitas vezes guardar seus problemas para me ajudar com os meus e por sempre estar presente nas fases mais importantes da minha vida;*

*Aos servidores do Departamento de Microbiologia e Imunologia;*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida;*

*E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão de mais essa etapa em minha vida.*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
Mastite Bovina.....	12
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.2.1. Fatores de Virulência de <i>S. aureus</i> .....	14
1.2.2. Resistência aos Antimicrobianos .....	17
1.2.3. Caracterização Molecular.....	18
1.2.3.1. Grupo Agr.....	18
1.2.3.2 Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) .....	19
1.2.3.3 <i>Mult Locus Sequence Typing</i> (MLST) .....	20
1.2.3.4 <i>spa</i> - Typing .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	33
<b>RESUMO</b> .....	35
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	36
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
Coleta das Amostras de Leite.....	38
Isolamento e Identificação de <i>S. aureus</i> , a Partir das Amostras de Leite de Vacas com Mastite Subclínica .....	38
Reações de PCR para Detecção dos Genes de Identificação e de Virulência.....	39
Teste de Disco-difusão e Genes de Resistência.....	40
Caracterização Molecular por <i>agr</i> typing, <i>SCCmec</i> , MLST e <i>spa</i> -typing .....	41
Pulsed Field Gel de Eletroforese (PFGE).....	44
<b>RESULTADOS</b> .....	45
Coletas de Leite e Confirmação da Espécie <i>S. aureus</i> .....	45
Detecção dos Genes de Virulência .....	46
Teste Disco – Difusão .....	46
Genes de Resistência aos Antimicrobianos.....	47

Tipagem Molecular pelo Sistema <i>agr</i> .....	48
Tipagem Molecular por PFGE, <i>spa</i> -Typing e MLST .....	49
<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa dos genes de identificação e de fatores de virulência em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica.....39

**Tabela 2:** Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos, em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica .....40

**Tabela 3:** Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa de genes de caracterização molecular, em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica .....42

**Tabela 4:** Relação dos meses de coleta, quantidade de vacas em lactação, reações positivas ao CMT, indicando mastite subclínica e presença de *S. aureus* nas amostras.....45

**Tabela 5:** Teste de sensibilidade das cepas de *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica, aos 12 antimicrobianos testados .....46

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *mecA* em *S. aureus*. .....47
- Figura 2:** Gel de eletroforese das PCR para detecção dos genes *agrI* e *agrIII* na mesma cepa .....48
- Figura 3:** PFGE de *S. aureus* isolados no mesmo animal em diferentes meses .....49
- Figura 4:** PFGE de *S. aureus* isolados de animais diferentes no mesmo mês .....50

## RESUMO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária geralmente causada por infecção bacteriana, levando a grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, à desvalorização do animal e ao aumento no uso de medicamentos. Um dos principais responsáveis pela mastite bovina é o *Staphylococcus aureus* e a presença constante desse micro-organismo pode ocasionar a seleção de cepas resistentes. Vários genes estão envolvidos com a produção de fatores de virulência como as hemolisinas, leucotoxinas (toxina de Panton Valentine) e os superantígenos (enterotoxinas e toxina da Síndrome do Choque Tóxico). Assim, o objetivo do estudo foi caracterizar molecularmente e identificar o potencial de virulência e a resistência a antimicrobianos de cepas de *S. aureus*, isoladas de vacas com mastite subclínica, de uma fazenda, no período de 12 meses. Além disso, foi verificada a persistência de colonização da cepa nos animais, ao longo desse tempo. Foram analisadas 665 amostras de leite de vacas com mastite subclínica e 116 (17,4%) foram positivas para a presença de *S. aureus*. Os genes que codificam as enterotoxinas clássicas foram observados em 28 (24,1%) das cepas, enquanto o gene da Toxina Panton-Valentine (*pvl*) foi encontrado em frequência bem menor, de 3,4% (4 cepas) e o *tsst* (síndrome do choque tóxico) foi encontrado em 54 isolados (46,6%). Foram encontradas 9 (7,8%) cepas metilina resistente (MRSA), das quais 4 (44,4%) apresentaram o gene *mecA* e pertenciam ao SCC*mec* tipo I, enquanto o gene *mecC* não foi encontrado nas demais cepas MRSA. Em relação à tipagem molecular pelo grupo *agr*, 68 (58,6%) isolados não foram classificados em nenhum dos 4 grupos existentes e o grupo *agrI* foi o mais encontrado. Pela técnica de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE), observou-se a persistência de colonização de um mesmo clone em um animal, ao longo de 9 meses. Essa cepa foi classificada como ST 711, pela técnica de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST). A presença de vários clones infectando diferentes animais, ou cepas de um mesmo clone colonizando vários animais, demonstraram práticas higiênicas inadequadas e a presença, nesses clones, de genes que codificam fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos, dificultam o controle da mastite. O conhecimento dessas características moleculares, é essencial para o entendimento da circulação desses clones e de suas implicações na saúde pública e animal.

Palavras- chave: *S.aureus*, mastite, *mecA*, PFGE, MLST

## ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the mammary gland usually caused by bacterial infection, leading high economic losses in dairy cattle due to reduced production of milk, devaluation of the animals and treatment costs. One of the main responsible for bovine mastitis is *Staphylococcus aureus* and its constant presence can select resistant isolates. Several genes seem to be involved with the production of virulence factors such as hemolysin, leukotoxins (toxin Pantone Valentine) and superantigens as the toxin Pantone Valentine and (enterotoxin and toxin Toxic Shock Syndrome). Thus, the aim of the study was to characterize molecularly and identify the virulence potential and resistance to antimicrobials of *S. aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis in a single farm in 12 months. Furthermore, the persistence of colonization of the strain was observed in the animals during that time. Were analyzed 665 samples of milk from cows with subclinical mastitis and 116 (17.4%) were positive for the presence of *S. aureus*. The genes encoding the classical enterotoxins were observed in 28 (24.1%) of the strains, while toxin gene Pantone-Valentine (*pvl*) was found at much lower frequency, 3.4% (4 strains). The *tsst* gene (toxic shock syndrome) was found in 54 isolates (46.5%). Were found 9 (7.8%) methicillin resistant strains (MRSA), of which 4 showed the *mecA* gene and belonged to *Sccmec* type I, while the *mecC* has not yet been researched. In relation to molecular typing by *agr* group, 68 (58.6%) isolates did not belong to either group and *agrI* was the most frequent. Electrophoresis pulsed field gel (PFGE) revealed persistent colonization of the same clone in the same animal over 9 months. This strain was classified as ST 711, by *Multi Locus Sequence Typing* (MLST). The presence of several different clones that infecting different animals, or strains the same clone colonizing several animals, demonstrated inadequate hygiene practice and the presence of these genes in clones that encode of virulence factors and drugs resistance hinder the control of mastitis. Knowledge of these molecular characteristics is essential to understanding the current clones and their implications for animal health.

Key- words: *S.aureus*, mastitis, *mecA*, PFGE, MLST

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Mastite Bovina

Segundo o IBGE (2015), em 2014, o Brasil produziu 35,17 bilhões de litros de leite, representando um aumento de 2,7% em relação ao ano anterior e ocupando a quinta posição no ranking mundial de produção. Porém, a mastite é uma doença que afeta os rebanhos brasileiros e representa um desafio para os produtores e para as indústrias de laticínio (OLIVEIRA et al., 2009; REIS et al., 2003)

A mastite é considerada uma das doenças que mais causam prejuízos às propriedades leiteiras, devido à redução na produção de leite pelos quartos mamários, à desvalorização, descarte ou morte precoce do animal, perda do leite descartado e gastos com medicamentos e veterinários (PERES NETO; ZAPPA, 2011). A mastite é uma infecção da glândula mamária geralmente causada por bactérias (MELCHIOR et al., 2006) e pode ocorrer na forma clínica ou subclínica. No primeiro caso, observa-se alterações macroscópicas caracterizadas por mudanças físicas no úbere e na glândula mamária e grumos no leite (RIBEIRO; FURLONG, 2007; COSER et al., 2012). Já na mastite subclínica, não são observadas alterações visíveis na glândula mamária, no úbere ou no leite. Ocorrem mudanças na composição do leite, como alterações nas concentrações de gordura, minerais, proteínas, enzimas e lactose. Além disso, pelo aumento da permeabilidade vascular e com a passagem de substâncias do sangue para o leite, também pode-se detectar sódio, cloro e imunoglobulinas (CUNHA et al., 2008).

Os casos subclínicos, são facilmente disseminados no rebanho, oferecendo ao produtor uma falsa impressão de tranquilidade em relação à ocorrência de mastite (BUENO et al., 2002). Nesse caso, a doença é somente detectada por testes como o California Mastitis Test (CMT) e pela contagem de células somáticas (CCS) (CULLOR, 1993). O CMT é um teste rápido, realizado no momento da ordenha, onde se utiliza um kit disponível comercialmente (SCHALM; NOORLANDER, 1957), composto por um reagente que, ao entrar em contato com o leite, em quantidades iguais, rompe a membrana dos leucócitos liberando o material genético, formando um gel. Com isso, a reação do CMT é classificada como negativa, quando não há formação de gel; uma cruz, quando a formação do gel é fraca; duas cruzes, quando a formação é moderada e três, quando a formação é forte (RODRIGUES, 2008). Já a CCS é realizada em laboratório, sendo que, o método mais atual,

realiza a contagem das células através da citometria de fluxo. A quantidade máxima permitida no leite é de 200.000 células por ml (BORNE et al., 2011)

A mastite subclínica, pode tornar-se crônica, uma vez que, sem o aparecimento de sinais clínicos e sem a realização dos testes necessários, a bactéria pode permanecer no hospedeiro por meses, o que acaba sendo responsável por 30% dos casos crônicos na mastite bovina (HALASA et al., 2007).

A mastite ainda pode ser denominada epidemiologicamente, sendo considerada como ambiental quando o patógeno encontra-se presente no ambiente, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. Já quando a contaminação ocorre de animal para animal ou entre homem e animal, a mastite é denominada como contagiosa (PEDRINI; MARGATHO, 2003), sendo os principais patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Triüperella pyogenes*, *Mycoplasma* spp (LANGONI, 2013)

Entre os principais patógenos, *S. aureus* é uma das espécies mais comumente encontradas em casos de mastites clínicas, subclínicas e crônicas (VASUDEVAN et al., 2003; CLUTTERBUCK et al., 2007), sendo responsável por um terço dos casos clínicos e subclínicos (BOTREL et al., 2010), além disso, ainda está relacionado com baixas taxas de cura da doença (KATHOLM et al., 2012). Essa bactéria pode ser isolada a partir da superfície do corpo animal, dos equipamentos utilizados durante o processo da ordenha e das mãos dos ordenhadores, representando importantes mecanismos de transmissão (BENIĆ et al., 2012). No Brasil, são vários os relatos de casos de mastite causada por *S. aureus* desde Langenegger et al.(1970) e Harrop et al. (1975), que avaliaram amostras de leites no Rio de Janeiro e em Pernambuco e observaram maior ocorrência de *S. aureus* (53,1 e 59,3%, respectivamente), até dados mais recentes como os de Mendonça et al. (2012) com 36,2% de positividade no Rio de Janeiro, Oliveira et al. (2011), com 16,7% no Pará, Rall et al. (2014), com 17,5% no estado de São Paulo.

## **1.2. *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e que se agrupam em formato de cachos de uva. Apresentam a enzima coagulase, fazendo parte do grupo denominado estafilococos coagulase positiva (ECP) (BERGEY'S, 1994; TRABULSI et al., 2008). O gênero *Staphylococcus* é composto por 52 espécies e 29 subespécies, sendo pertencente à família Staphylococcaceae, (DSMZ, 2015).

Essa espécie é considerada a mais virulenta do gênero e sua patogenicidade está relacionada a uma combinação de fatores de virulência como produção de toxinas, capacidade invasiva e resistência a antimicrobianos (ARGUDIN et al., 2010).

Além disso, sobrevivem em uma ampla faixa de condições físicas e químicas, como temperatura que, por serem mesófilos, apresentam temperatura ótima de multiplicação entre 30° e 37°, mas, conseguem crescer entre 7°C e 47,8°C e também em condições mais extremas de pH (4,2 – 9,3) e salinidade (até 15% de NaCl) (LE LOIR et al., 2003). Apesar de estar envolvido em surtos de intoxicação alimentar, podendo causar sintomas como náuseas, vômitos severos com ou sem diarreia e tendo os primeiros sintomas começando a aparecer entre 2 a 8 horas após a ingestão (BALABAN; RASOOLY, 2000), o *S. aureus* é um organismo comensal da pele e membranas mucosas dos seres humanos, estimando que sua presença persistente seja de 20-30% e a colonização intermitente de 60% (KLUYTMANS et al., 2005).

### **1.2.1. Fatores de Virulência de *S. aureus***

Vários fatores de virulência podem contribuir para as diferentes formas de patogenicidade dessa bactéria, sendo divididos em grupos, como toxinas, enzimas, fatores de adesão e de invasão e superantígenos (DINGES et al., 2000; PEACOCK et al., 2002). As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são proteínas extracelulares, de baixo peso molecular (de 22 a 28 Kda) e apresentam cinco tipos sorológicos clássicos, que foram identificados e classificados de SEA a SEE (BERGDOLL; ROBBINS, 1973). Depois, outras toxinas foram descritas e seus genes sequenciados, sendo denominadas como SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIS, SEIT, SEIU, SEIV e SEIX (SEO et al., 2007; WILSON et al., 2011). Essas novas enterotoxinas têm sido designadas como membros

da família das enterotoxinas estafilocócicas baseadas na sequência de similaridade com as enterotoxinas clássicas. O Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos de *Staphylococcus* (INCSSN) recomendou que somente superantígenos que induzam emese por administração oral em experiências utilizando primatas sejam chamadas de enterotoxinas, enquanto outras toxinas relacionadas, mas que não causam emese nesse modelo experimental sejam designadas como —enterotoxinas estafilocócica semelhante à superantígeno [staphylococcal enterotoxin-like (Sel) superantigens] (LINA et al., 2004). Baseando-se nas recomendações do INCSSN, as toxinas SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU, SEV e SEX deveriam ser renomeadas como SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIS, SEIT, SEIU, SEIV e SEIX, respectivamente (OMOE et al., 2005). Com exceção de SEG, SEH e SEI, que já apresentaram atividade emética (SU e WONG, 1995; MUNSON et al., 1998), o envolvimento das outras SEI em surtos de origem alimentar ainda não está totalmente esclarecido.

As SE clássicas são responsáveis por 95% dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica e apenas 5%, devem-se aos novos tipos (JAY et al., 2005). Os genes *seg* e *sei* foram encontradas em alta frequência (28,5% e 21%, respectivamente) em um estudo com leite de vacas mastíticas (KOT, et al., 2016), que por já apresentarem atividade emética comprovada, conferem riscos à população consumidora. Entre as SEs clássicas, SEA é considerada como a principal envolvida em surtos (BALABAN; RASOOLY, 2000), já a SEB é considerada a mais rara, como no estudo realizado por Kot et al. (2016) que encontraram o gene para a produção da toxina em apenas 2,4% dos isolados, porém, em contrapartida, Seyoum et al. (2016) encontraram o gene *seb* em 17,4% dos seus isolados, sendo que, essa toxina é conhecida por apresentar sintomas mais severos quando comparados às outras SEs. A SEC é a mais frequente em isolados de leite, sendo relatada em vários estudos (ARGUDIN et al., 2010; VALIHRACH et al., 2013; CARFORA et al., 2015). A toxina D é conhecida por causar intoxicações alimentares em baixas concentrações, já em relação à toxina E, são poucos os relatos de casos de intoxicação. (PINCHUK et al., 2010)

Os genes que codificam as SEs estão localizados em elementos genéticos móveis como os plasmídeos pIB485 e pF5; os fagos, principalmente os da família Siphoviridae e as ilhas de patogenicidade que estão distribuídas amplamente no DNA ou próximos a elementos do cassete cromossomal estafilocócito (SCC). Essa localização torna-se uma vantagem na evolução desse micro-organismo, pois possibilita a mobilidade do gene, conferindo



vantagens seletivas e contribuindo na sua capacidade de causar doenças. (ARGUDIN et al., 2010).

Outro superantígeno envolvido na virulência do *S. aureus* é a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1). Essa síndrome foi descrita pela primeira vez em 1978 em sete crianças com infecções por *S. aureus* (TODD et al., 1978). Já o primeiro relato da produção da TSST-1, por uma cepa de origem animal, ocorreu quase 10 anos depois (JONES e WIENEKE, 1986). A TSST-1 é um polipeptídeo de cadeia simples com propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas (CARDOSO et al., 2000), estimulando os linfócitos T a liberarem citocinas que provocam o choque (PARRILO et al., 1993), causando sintomas graves e sistêmicos, caracterizados por febre, vômito, diarreia, hipotensão, anormalidades neurológicas além de descamação da pele das mãos e pés (PRAJAPATI; PRAJAPATI, 2010). A síndrome do choque tóxico (TSS), em humanos, pode se manifestar na forma menstrual, que ocorre em mulheres onde, cepas de *S. aureus* produtoras da TSST-1 colonizam a mucosa vaginal e produzem a toxina, que atravessa a barreira da mucosa, ou na forma não-menstrual, onde a TSS, ocorre por infecção do *S. aureus* em qualquer local do organismo (MCCORMICK et al., 2001). O gene responsável pela produção da toxina (*tst*) já foi observado em *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite, como relatado por Takeuchi et al. (1998), Cardoso et al. (2000) e Lim et al. (2004). Em cepas de *S. aureus* provenientes de bovinos, o gene *tst* foi encontrado em um elemento genético móvel e a linhagem ET3-1 foi o isolado fonte da descoberta e caracterização da ilha de patogenicidade SaPIbov1 (FITZGERALD et al., 2001). Quando o gene da TSST-1 está associado ao de enterotoxinas, a cepa pode ter sua patogenicidade aumentada, uma vez que passam a atuar como superantígenos para as células do sistema imune (YOKOMIZO et al., 1995; FERENS et al., 1998). Além disso, essas cepas presentes no leite cru e derivados fornecem riscos para os consumidores e a gravidade dos sintomas pode variar de acordo com as condições físicas de cada pessoa.

A leucocidina Pantón-Valentine (PVL) é uma citotoxina que provoca destruição dos leucócitos e necrose tecidual (GENESTIER et al., 2005). Embora produzida por aproximadamente 5% das cepas de *S. aureus* isolados de casos de mastite, o gene *pvl* é encontrado em grandes porcentagens em isolados que causam infecções cutâneas humanas podendo causar necrose e pneumonias graves (LINA et al., 1999; GILLET et al., 2002). A presença do *pvl* já foi documentada em cepas de *S. aureus* meticilina sensíveis (MSSA) e em meticilina resistentes (MRSA) (BOUBAKER et al., 2004). Na América do Norte, o *pvl* foi

associado, principalmente, a cepas MRSA (VANDENESCH et al., 2003), enquanto no Reino Unido, a associação mais observada ocorreu em cepas MSSA (SHALLCROSS et al., 2013). Bazzi et al. (2015) e Turner et al. (2015) isolaram cepas MSSA com esse gene em pacientes de um hospital. O gene para a produção da toxina também tem sido isolado de cepas provindas de vacas mastíticas, como demonstrou Pájic (2014).

### 1.2.2. Resistência aos Antimicrobianos

O uso de antibióticos é a principal forma de combate às infecções mamárias e, dentre eles, destacam-se os  $\beta$ -lactâmicos que são os mais frequentemente utilizados. Porém, o uso prolongado e repetido pode selecionar cepas resistentes, uma vez que *S. aureus* é capaz de adaptar-se à pressão de seleção e sofrer mutações nos seus genes ou ainda, adquirir genes de resistência de outras espécies (MILLER et al., 1996). São vários os mecanismos que as bactérias desenvolveram para tornarem-se resistentes aos antimicrobianos, como a inativação enzimática ( $\beta$ -lactamases, transferases), mudança na permeabilidade da membrana, mudanças de rotas metabólicas, entre outros (MATHUR; SINGH, 2005).

Na mastite, o tratamento, na maioria dos casos, é feito com administração do antibiótico via intramamária, esperando-se que a concentração do antibiótico atinja um valor no úbere semelhante ou superior à concentração inibitória mínima (CIM) para o patógeno. Mas, o efeito do antimicrobiano pode ser menor uma vez que a CIM é definida em testes *in vitro* e não simulam condições reais encontradas *in vivo* pelo patógeno, diminuindo a eficácia do tratamento (APPARAO et al., 2009). Além disso, o desenvolvimento da resistência antimicrobiana pelos patógenos é uma das principais causas da baixa taxa de cura da mastite (BARKEMA et al., 2009; GAO et al., 2012). São vários os relatos de casos de isolados resistentes a antibióticos na mastite bovina, Wang et al. (2014) observaram resistência em 69% dos isolados, assim como Jagielski et al. (2014), que relataram em 41%.

Geralmente, cerca de 80% das cepas de *S. aureus* são resistentes a penicilina e, dois anos após a descoberta da meticilina (1961), cepas resistentes a esse antibiótico foram encontradas (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008). Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), produzem uma proteína de ligação à penicilina conhecida como PBP2a ou PBP2', que apresenta uma baixa taxa de afinidade para a maioria das penicilinas semi-sintéticas (IWG-SCC, 2009).

O gene responsável pela resistência à metilicina é o *mecA* e está localizado em uma ilha genética móvel, chamada cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), que facilita a mobilidade genética horizontal. O SCC*mec* apresenta quatro principais características: carrega o complexo *mec* que é composto pelo gene *mec*, por genes responsáveis por regular esse gene e as sequências de inserção; carrega o complexo *ccr*, composto pelas variações do gene *ccr* que são responsáveis pela mobilidade do elemento e suas sequências vizinhas; apresentam sequências complementares nas extremidades do cassete cromossômico e por último, na extremidade 3', a sequência se integra a ORF (open reading frame) (KONDO et al., 2007).

Até o momento, foram descritos onze tipos diferentes de SCC*mec* (SCC*mec*I ao XI), baseados nas sequências de nucleotídeos. Cada tipo de SCC*mec* tem uma combinação única entre complexo *mec* e complexo *ccr*. Em MRSA, existem quatro tipos do complexo *mec* e sete do complexo *ccr* (SHORE et al., 2013; IWG – SCC, 2009). Também foram classificados subtipos de SCC*mec*, pois estes apresentam a mesma combinação dos complexos *ccr* e *mec*, porém, variam nas regiões J. O elemento apresenta três regiões J que, apesar de não apresentarem nenhum componente essencial ao cassete, podem carrear determinantes de resistência a outros antimicrobianos (IWG-SCC, 2009).

Em 2011, um novo homólogo do *mecA*, denominado *mecC*, foi identificado em amostras de leite de 15 vacas na Inglaterra e de amostras clínicas humanas no Reino Unido e na Dinamarca (SHORE et al., 2011; GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011). O gene apresenta 69% de homologia com o *mecA* e foi detectado no último SCC*mec*, o tipo XI (ITO et al., 2012). Recentemente, isolados MRSA carreadores do *mecC* foram isolados de leites de vacas, em vários países (LAURENT et al., 2012; UNNERSTAD et al., 2013; GINDONIS et al., 2013). Há também, uma consciência crescente da importância do MRSA em animais e do seu potencial zoonótico (WEESE, 2010).

### **1.2.3. Caracterização Molecular**

#### **1.2.3.1. Grupo Agr**

Em *S. aureus*, um dos sistemas de regulação mais conhecidos é o *accessory gene regulator* (*agr*), responsável por regular vários fatores de virulência (MELAKE et al., 2014),

incluindo hemolisinas, enterotoxinas, enzimas e proteínas de superfície (BOYEN et al., 2009). A atuação do sistema *agr* está associada ao *quorum-sensing*, onde é possível detectar a densidade celular em determinado meio, através da secreção e detecção de moléculas pelas próprias bactérias, possibilitando a comunicação entre elas. O locus *agr* é composto por dois *operons*, um controlado pelo promotor P2 e o outro pelo promotor P3. O *operon* que contém o promotor P2, apresenta 4 genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. Nesse *operon*, ocorre a codificação das proteínas AgrB e AgrD, que juntas, formam um peptídeo-auto-indutor (AIP) e da AgrC, que é uma proteína transmembrânica com receptor para AIP. Já o *operon* comandado pelo promotor P3 contém um gene para o RNAm, chamado de RNAIII, considerado efêtor do sistema *agr*. Quando AIP liga-se a AgrC, ativa a proteína AgrA, que age como indutor dos promotores P2 e P3, ativando os *operons*, assim, o RNAIII funciona como indutor ou repressor da transcrição de genes. Portanto, o resultado final da cascata do locus *agr* é o RNAIII, responsável pelo aumento da transcrição dos genes codificadores dos fatores de virulência (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003).

Esse grupo é classificado em *agrI*, *agrII*, *agrIII* ou *agrIV*, determinados pelo polimorfismo da sequência de aminoácidos dos genes de *agrD* e *agrC* (SHOPSIN et al., 2003).

Alguns estudos apontaram que o grupo *agrI* é prevalente entre os isolados de mastite, os grupos *agrII* e *agrIII* parecem estar mais associados a isolados com resistência a antimicrobianos e o *agrIV* parece estar envolvido com cepas produtoras de esfoliatina, toxina responsável pela síndrome da pele escaldada. (JARRAUD et al., 2000; MOISE-BRODER et al., 2004; VAUTOR et al., 2007).

### **1.2.3.2. Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)**

Nas últimas décadas, a identificação de linhagens bacterianas por métodos de biologia molecular, tomou grande espaço em relação à abordagem fenotípica. Entre essas técnicas, o gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) é uma das mais utilizadas e aceitas entre a comunidade científica, tendo como objetivo, discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie (MAGALHÃES et al., 2005). Nessa técnica, enzimas de restrição digerem o

genoma bacteriano total e, em seguida, é realizada eletroforese em uma cuba com campo pulsátil, discriminando bandas de diferentes pesos moleculares (TENOVER et al., 1997). Essa técnica apresenta algumas restrições, como a identificação do parentesco de cepas somente em contextos epidemiológicos menores. Mas, alguns estudos envolvendo mais ambientes, foram realizados, como o de Kreiswirth et al. (1993) mostraram que a maioria de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados ao redor do mundo possuíam uma origem comum.

#### **1.2.3.3. Multi Locus Sequence Typing (MLST)**

O *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) foi desenvolvido em 1998 (MAIDEN et al., 1998) e, em cepas de *S. aureus*, a técnica começou a ser utilizada no ano 2000 (ENRIGHT et al., 2000). Esse método permite identificar e relacionar cepas isoladas em diversos países, utilizando a comparação entre o polimorfismo das sequências de fragmentos internos de sete genes constitutivos (*housekeeping genes*), imprescindíveis ao metabolismo do microorganismo (MAIDEN et al., 1998). No caso de *S. aureus*, esses genes são: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*. Os dados obtidos por MLST são altamente reprodutíveis e estão disponíveis na base de dados de *S. aureus* MLST (<http://saureus.mlst.net/>). Os perfis alélicos, são chamados de sequências tipo (STs). Quando essas STs diferem em apenas um alelo do ST principal, pode-se dizer que estas pertencem ao mesmo complexo clonal (CC). Essas informações também estão disponíveis na base de dados

#### **1.2.3.4. spa-Typing**

Essa técnica também é utilizada na identificação molecular de *S. aureus*, baseada no sequenciamento do gene da proteína A (*spa*). Esse gene pode sofrer mutações como perdas e ganhos de fragmentos, disponibilizando sequências diferentes que são classificadas como *spa*-type. Essas sequências são colocadas em um software (Ridom Spa Types) que as reconhece e gera o número do *spa*-type pertencentes. Por se tratar de apenas um gene, essa técnica é barata e de rápida e de fácil caracterização das cepas isoladas, mas nem sempre discriminatória (STROMMINGER et al., 2006). Com essas duas técnicas de sequenciamento

(MLST e *spa*- Typing) é possível traçar rotas de dispersão e demonstrar a disseminação global dos clones.

## **2. OBJETIVOS**

Caracterizar molecular e fenotipicamente cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica, em uma propriedade leiteira e verificar a persistências das cepas nos animais ao longo do tempo.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPARAO, M. D.; RUEGG, P. L.; LAGO, A.; GODDEN, S.; BEY, R.; LESLIE, K. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 2589-2597, 2009.

ARGUDIN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1–10, 2000.

BARKEMA, H.W.; GREEN, M.J.; BRADLEY, A.J.; ZADOKS, R.N. Invited review: the role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4717–4729, 2009.

GAO, J.; FERRERI, M.; YU, F.; LIU, X.; CHEN, L.; SU, J.; HAN, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in a single herd in China. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 550–552, 2012.

BAZZI, A. M.; RABAAN, A. A.; FAWARAH, M. M.; AL-TAWFIQ, J. A. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* infections in a Saudi Arabian hospital. **Journal of Infection and Public Health**, v. 8, p. 364-368, 2015.

BENIĆ, M.; HABRUN, B.; KOMPES, G. Clinical and epidemiological aspects of cow mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and its methicillin-resistant strains. **Medical Sciences**, v. 37, p. 113- 122. 2012.

BERGEY'S. M.D. WILLIAMS; S.T. WILKINS, **Manual of Determinative Bacteriology**, 9 ed., Baltimore, p. 1994, 787, 1994.

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

BORNE, B.H.P.V.; VERNOOIJ, J.C.M.; LUPINDO, A.M.; SCHAIK, G.V.; FRANKENA, K.; LAM, T.J.G.M.; NIELEN, M. Relationship between somatic cell count status and subsequent clinical mastitis in Dutch dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 4, p. 265-273., 2011.

BOTREL, M. A.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J. Y.,; CALAVAS, D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 5, p. 479-487,2010.



BOUBAKER, K.; DIEBOLD, P.; BLANC, D. S.; VANDENESCH, F.; PRAZ, G., DUPUIS, G.; TROILLET, N. Panton-Valentine leukocidin and staphylococcal skin infections in schoolchildren. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 121-124, 2004.

BOYEN, F.; EECKHAUT, F.V.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, R.; DUCATELLE, F.; HAESEBROUCK, F. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 187- 195, 2009.

BUENO, V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; COSTA, E.O.; COELHO, K.O.; NEVES, R.B.S. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: Frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.2, p.47-52, 2002.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; DEMELIO, V.; SPINA, D.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. Agr-genotyping and transcriptional analysis of biofilmproducing *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 220–227, 2007.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12-15, 2015.

CARDOSO, H. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 7-10, 2000.

COSER, S.M.; LOPES, M.A; COSTA, G.M. Mastite Bovina: Controle e Prevenção. 2012. Boletim Técnico – Lavras/MG, 93.1-30. <http://www.editora.ufla.br/adm/upload/boletim/Bol93.pdf>. acessado em: dezembro/2015.

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

CULLOR, J. S. Antibiotic residue test for mammary gland secretion. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.9, n.3, p.609-620, 1993.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DEURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p.747–763, 2008.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 16–34, 2000.

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Coleção Alemã de Micro-organismos e Cultura de Células). Em [http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial\\_nomenclature\\_info\\_mm.php?gens=Staphylococcus](http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?gens=Staphylococcus). Acessado: dezembro/ 2015.

ENRIGHT, M. C.; DAY, N. P.; DAVIES, C. E.; PEACOCK, S. J.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1008– 1015, 2000.

FERENS, W. A.; GOFF, W. L.; DAVIS, W. C.; FOX, L. K.; DEOBALD, C.; HAMILTON, M. J.; BOHACH, G. A. Induction of type 2 cytokines by a staphylococcal enterotoxin superantigen. **Journal of Natural Toxins**, v. 7, n. 3, p. 193-213, 1998.

FITZGERALD, J. R., STURDEVANT, D. E., MACKIE, S. M., GILL, S. R., & MUSSER, J. M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 15, p. 8821-8826, 2001.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M.T.; LINDSAY, H.; WEBB, C.R.; BROWN, D.F.; CURRAN, M.D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D.J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S.D.; EDWARDS, G.F.; GIRVAN, E.K.; KEARNS, A.M.; PICHON, B.; HILL, R.L.; LARSEN, A.R.; SKOV, R.L.; PEACOCK, S.J.; MASKELL, D.J.; HOLMES, M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595–603, 2011.

GENESTIER A.L.; MICHALETE M.C.; PRÉVOSET, G.; BELLOT, G.; CHALABREYSSE, L.; PEYROL, S.; THIVOLET, F.; ETIENNE, J.; LINA, G.; VALLETTE, F. M.; VANDENESCH, F.; GENESTIER, L. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 11, p. 3117-3727, 2005.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J. C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIÉMONT, Y.; BROUSSE, N.; FLORET, D.; ETIENNE, J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **The Lancet**, v. 359, p. 753-759, 2002.

GINDONIS, V.; TAPONEN, S.; MYLLYNIEMI, A. L.; PYÖRÄLÄ, S.; NYKÄSENOJA, S.; SALMENLINNA, S.; LINDHOLM, L.; RANTALA, M. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 61, p. 2-8, 2013.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review, **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HARROP, M. H. V.; PEREIRA, L. J. G.; BRITO, J. R. F.; MELLO, A. M. B. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do agreste meridional de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Série Veterinária, v. 10, p. 65-67, 1975.

IBGE. (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E BIOESTATISTICA) 2015. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos\\_201501publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201501publ_completa.pdf). Acessado em: Fevereiro/2016.

IWG-SCC (INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 4961-4967, 2009.

ITO, T.; HIRAMATSU, K.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H.; PERRETEN, V.; HOLDEN, M. T., et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 4997-4999, 2012.

JAGIELSKI, T.; PUACZ, E.; LISOWSKI, A.; SIEDLECKI, P.; DUDZIAK, W.; MIĘDZOBRODZKI, J.; KRUKOWSKI, H. Short communication: Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6122-6128, 2014.

JARRAUD, S; LYON, G.; FIGUEIREDO, A. M. S; GERARD, L.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.;MUIR, T. W.; NOVICK, R. P. Exfoliatin-Producing Strains Define a Fourth *agr* Specificity Group in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6517-6522, 2000.

JAY, M.J.; LOESSNER, J.M.; GOLDEN, A.D. Staphylococcal gastroenteritis. In: Modern Food Microbiology. **Springer Science**, 7th edition, p. 545-560, 2005.

JONES, T. O.; WIENEKE, A. A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Veterinary Record**, v.119, p. 435, 1986.

KATHOLM, J.; BENNEDSGAARD, T.W.; KOSKINEN, M.T.; RATTENBORG, E. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5702-5708, 2012.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J. Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type

assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 264-74, 2007.

KOT, B.; SZWEDA, P.; FRANKOWSKA-MACIEJEWSKA, A.; PIECHOTA, M.; WOLSKA, K. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **The Journal of Dairy Research**, v.83, n.2, p. 228-235, 2016.

KLUYTMANS, J. A. J. W.; WERTHEIM, H. F. L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33 p. 3–8, 2005.

KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R. D.; EISNES, W.; MASLOW, J. N.; MCGEER, M.; LOW, D.E.; NOVICK, R. P. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 259, p. 227, 1993.

LANGENEGGER, J.; COELHO, N. M.; LANGENEGGER, C. H.; CASTRO, R. P. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 437-440, 1970.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 620-626, 2013.

LAURENT, F.; CHARDON, H.; HAENNI, M.; BES, M.; REVERDY, M. E.; MADEC, J. Y.; LAGIER, E.; VANDENESCH, V.; TRISTAN, A. MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.18, n. 9, p. 1465-1467. 2012.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 63–76, 2003.

LIM, S. K.; JOO, Y.; MOON, J.; LEE, A.; NAM, H.; WEE, S.; KOH, H. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 581–584, 2004.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 2334–2336, 2004.

LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F.; BES, M.; PETER, M.O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1128–1132, 1999.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia: uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAIDEN, M.C.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J.E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D.A.; FEAVERS, I.M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B.G. Multi locus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 281-295, 2005.

MCCORMICK, J. K., YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P. M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 77-104, 2001.

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

MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D.A.; ALENCAR, T.A.; COELHO, I.S.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis as a subsidy for the implementation of control measures. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 859-864, 2012.

MELAKE, N.A.; ZAKARIA, A.S.; IBRAHIM, N.H.; SALAMA, M.A., MAHMOUD, A.Z. Prevalence of Agr Specificity Groups among in vitro Biofilm Forming Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Carriers. **International Journal of Microbiological Research**, v. 5, n. 2, p. 76-84, 2014.

MILLER, M.A.; DASCAL, A.; PORTNOY, J.; MENDELSON, J. Development of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after widespread use of nasal mupirocin ointment. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, p.811-813, 1996.

MOISE-BRODER, P. A.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; SCHENTAG, J. J.; FORREST, A.; MOELLERING, R. C. JR. Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1700–1705, 2004.

MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J.; WELCH, R. A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 337-3348, 1998.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin

genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 2, p. 191-198, 2005.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S. D.; SILVA, N. D. S.; MENDONÇA, C. L. D.; SILVEIRA, J. A. S. D.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n. 2, p. 104-110, 2011.

PAJIĆ, M. J.; RAŠIĆ, Z. B.; VELEBIT, B. M.; BOBOŠ, S. F.; MIHAJLOVIĆ-UKROPINA, M. M.; RADINOVIĆ, M. Ž.; GALFI, A. L.; PETKOVIĆ, J. M.; TROJAČANEC, S. I. The prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine and human origin. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 3, p. 205-214, 2014.

PARRILO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1427, 1993.

PEACOCK, S.J.; MOORE, C.E.; JUSTICE, A.; KANTZANOU, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEILL, G.; DAY, N.P. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4987-4996, 2002.

PEDRINI, S. C. B., MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p. 391-395, 2003.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça- SP, ano IX, n.16, 2011.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 2177-2197, 2010.

PRAJAPATI, B. S.; PRAJAPATI, R. B. Toxic shock syndromes. **Pediatric Infectious Disease**, v. 2, n. 1, p. 10-13, 2010.

RALL, V. L. M.; MIRANDA, E. S.; CASTILHO, I. G.; CAMARGO, C. H.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; FERNANDES JÚNIOR, A. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 829-837, 2014.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibiotic therapy for subclinical mastitis control of lactating cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 651- 658, 2003.

RIBEIRO, A.C.C.L.; FURLONG, J. Controle da Mastite. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) EMBRAPA**. 2007.

RODRIGUES, A. C. O. Tese (Doutorado em Agronomia). **Identificação bacteriana a campo da mastite bovina para orientar protocolos de tratamento**. ESALQ/USP, 2008.

SEO, K.S.; LEE, S.U.; PARK, Y.H.; DAVIS, W.C.; FOX, L.K.; BOHACH, G.A. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4+ and CD8+ T cells. **Infection and Immunity**, v.75, p. 260–269, 2007.

SEYOUUM, E. T.; MEKONENE, T. K.; WOLDETSADIK, D. A.; ZEWUDIE, B. M.; GEBREYES, W. A. Enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine milk produced in central Ethiopia. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.10, n.2, p. 138-142, 2016.

SHALLCROSS, L. J.; FRAGASZY, E.; JOHNSON, A. M.; HAYWARD, A. C. (2013). The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 43-54, 2013.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199, 1957.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B.; ALCABES, P.; SAID-SALIM, B.; LINA, G.; MATSUKA, A.; MARTINEZ, J.; KREISWIRTH, B.N. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p. 456-459, 2003.

SHORE, A.C.; DEASY, E.C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; COLEMAN, D.C. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, p. 3765–3773, 2011.

SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: recent advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 350-359, 2013.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WENIGER, T.; HARMSSEN, D.; FRIEDRICH, A.W.; WITTE, W. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing; *Sma*I macrorestriction analysis; and multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2533–2540, 2006.

SONG,M., BAI,Y., XU,J., CARTER,M.Q., SHI, C., SHI, X. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. **International Journal of Food Microbiology**, v. 195, p. 1–8, 2015.

SU, Y.C.; WONG, A.C. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n. 4, p. 1438-1443, 1995.

TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA,Y. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 251–258, 1998.

TENOVER; F.C.; ARBEIT; R.D.; GOERING; R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections, p. A review for healthcare epidemiologists. Molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of America. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, p. 426-39, 1997.

TODD, J.; FISHAUTM; KAPRAL, F.; WELCH, T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci. **The Lancet.**; 312:1116-8, 1978.

TURNER, C. E.; SRISKANDAN, S. PantoneValentine leucocidin expression by *Staphylococcus aureus* exposed to common antibiotics. **Journal of Infection**, v. 71, p. 338-346, 2015.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (1990). **Microbiologia**. São Paulo, Atheneu, 2008. Santos, NSO.

UNNERSTAD, H. E.; BENGTSSON, B.; AF RANTZIEN, M. H.; BORJESSON, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n.6, p. 46, 2013.

VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; DEMNEROVA, K. Production of Staphylococcal enterotoxin C in milk. **International Dairy Journal**, v. 30, p. 103–107, 2013.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M. C.; LINA, G.; NIMMO, G. R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M. E.; ETIENNE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 978-984, 2003.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p.179–185, 2003.

VAUTOR, E.; CARSENTI-DELLAMONICA, H.; SABAH, M.; MANCINI, G.; PÉPIN, M.; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from



dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 197-199, 2007.

WANG, X.; WANG, Y.; GUO, G.; USMAN, T.; HAO, D.; TANG, X.; ZHANG, Y.; YU, Y. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, p. 527—534, 2014.

WEESE, J. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. **ILAR Journal**, v. 51, p. 233–244, 2010.

WILSON, G.J.; SEO, K.S.; CARTWRIGHT, R.A.; CONNELLEY, T.; CHUANG-SMITH, O.N.; MERRIMAN, J.A.; GUINANE, C.M.; PARK, J.W.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M.; MORRISON, Y.I.; FITZGERALD, J.R. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. **Plos Pathogen**, v.7, n.10, p.e1002271, 2011.

YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P. M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1620-1625, 2003.

YOKOMIZO, Y.; MORI, Y.; SHIMOJI, Y.; SHIMIZU, S.; SENTSU, H.; KODAMA, M.; IGARASHI, H. Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, p. 299-305, 1995.

## **CAPÍTULO 1**

Esse trabalho deu origem ao artigo —Caracterização molecular e fenotípica de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina subclínica.

Caracterização molecular e fenotípica de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina subclínica.

Bruna Fernanda Rossi<sup>1</sup>; Erika Carolina Romão Bonsaglia<sup>1</sup>; Vera Lúcia Mores<sup>1</sup>Rall<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Botucatu – SP, Brasil.

**Autor para correspondência:**

Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Botucatu – SP, Brasil.

Caixa – Postal: 510

CEP 18618- 970, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP – Brasil.

Telefone: (14) 3880-0438, Fax: (14) 3811-6240

e-mail: vlmores@ibb.unesp.br

## RESUMO

A mastite é a principal doença que acomete os rebanhos leiteiros e *Staphylococcus aureus* é um dos patógeno mais importantes, devido a vários fatores de virulência e resistência a antimicrobianos. Neste estudo, foram avaliadas 665 amostras de leites de uma única fazenda durante um período de 12 meses, das quais 116 (17,4%) cepas de *S. aureus* foram isoladas. Os genes que codificam as enterotoxinas clássicas foram observados em 24,1% das cepas, enquanto o gene da Toxina Panton-Valentine (*pvl*) foi encontrado em frequência bem menor, de 3,4% e o *tsst* em 46,6%. Foram encontradas 9 cepas MRSA, das quais 4 apresentaram o gene *mecA* e pertenciam ao SCC*mec* tipo I, Em relação à tipagem molecular pelo gene *agr*, o grupo *agrI* foi o mais encontrado, sendo que, em uma cepa, foi observada a presença concomitante dos grupos *agrI* e *agrIII*, fato incomum. Pela técnica de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE), observou-se a persistência de colonização de um mesmo clone em um animal, ao longo de 9 meses e essa cepa foi classificada como sendo ST 711. A presença de genes que codificam vários fatores de virulência e a resistência aos antimicrobianos, além da persistência da colonização dificultam o controle da mastite gerando riscos à população. Por isso, o conhecimento dos *S. aureus* isolados de leites de vacas com mastite subclínica no Brasil é essencial para o entendimento dos clones circulantes e de suas implicações na saúde pública e animal.

Palavras- chave: MRSA, *mecA*, MLST, PFGE, fatores de virulência

## INTRODUÇÃO

A mastite bovina é considerada a doença mais prevalente nos rebanhos leiteiros (KOT et al., 2016), sendo responsável por grandes prejuízos aos produtores (PERES NETO; ZAPPA, 2011). No caso da mastite subclínica, alterações macroscópicas não são observadas, podendo ser facilmente disseminada pelos rebanhos, além da possibilidade de gerar casos crônicos.

*Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais patógenos envolvidos em casos de mastite subclínica (BOTREL et al., 2010), sendo relatado em vários estudos no Brasil, como o de Mendonça et al. (2012), que observaram 36,2% de prevalência no Rio de Janeiro e Rall et al. (2014), com 17,5% no estado de São Paulo.

A capacidade de *S. aureus* em causar mastite parece estar relacionada com vários fatores de virulência, como as enterotoxinas estafilocócicas (SE), principalmente as clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) (RAHIMI; SAFAI, 2010), a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (GUSTAFSON et al., 2015), responsável por gerar sintomas graves e sistêmicos (PRAJAPATI; PRAJAPATI, 2010) e a leucocidina Panton-Valentine (PVL), que é uma citotoxina conhecida por provocar a destruição dos leucócitos e necrose tecidual (GENESTIER et al., 2005).

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana pelos patógenos é uma das principais causas da baixa taxa de cura da mastite (BARKEMA et al., 2009; GAO et al., 2012). Os *S. aureus* são conhecidos mundialmente devido à sua ampla resistência aos antimicrobianos e, cepas *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) são as mais estudadas, uma vez que, os  $\beta$ -lactâmicos são os antimicrobianos mais frequentemente utilizados no caso da doença. O gene responsável por gerar essa resistência está localizado em uma ilha genética móvel conhecida como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), facilitando a mobilidade genética entre as cepas (KONDO et al., 2007). A presença do gene *mecA* e seu homólogo *mecC* são frequentemente relatados em casos de mastite (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011; UNNERSTAD et al., 2013; GINDONIS et al., 2013; LUINI et al., 2015). Cepas MRSA, podem ser classificadas de acordo com o polimorfismo do cassete cromossômico estafilocócico *mec*, variando de SCC*mec* do tipo I ao XI (SHORE et al., 2013).

Métodos de caracterização molecular são essenciais para entender a dispersão das cepas. O Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) é utilizado para discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie (MAGALHÃES et al., 2005), sendo possível

observar a variedade e a prevalência de cepas em contextos epidemiológicos menores. Já o *Spa*-Typing e o *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) podem abranger uma área bem maior, relacionando cepas de diversos locais através da comparação de sequências genômicas de genes específicos. Além disso, as cepas ainda podem ser classificadas de acordo com um sistema responsável por regular vários fatores de virulência, o sistema *agr* (MELAKE et al., 2014)

O objetivo do estudo foi observar a prevalência de *S. aureus* presentes na mastite bovina subclínica em uma única fazenda durante um período de 12 meses, caracterizando fenotipicamente e molecularmente as cepas isoladas e observar a persistência de clones presentes no mesmo animal ao longo do tempo assim como a variação das cepas infectando os diferentes animais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta das Amostras de Leite**

As amostras de leite foram coletadas em 12 meses, em uma propriedade leiteira, na região de Piracicaba/SP. As coletas foram realizadas uma vez por mês, em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu.

A propriedade contava com aproximadamente 250 cabeças. Porém, devido à rotatividade comercial, esse número oscilou durante o período de coleta, sendo que nos últimos meses, o número de vacas em lactação foi em torno de 30 animais. Os animais eram da raça Jersey e, principalmente, da raça holandesa. Na rotina da fazenda, eram realizadas 3 ordenhas por dia (manhã, hora do almoço e período da tarde) e o sistema era mecânico, em forma de “espinha de peixe”, onde cinco vacas eram ordenhadas por vez.

Para a coleta das amostras de leite, eram realizados os testes da ‘caneca do fundo escuro’, para detecção inicial da mastite clínica e o —California Mastitis Test (CMT), para detecção da mastite subclínica, utilizando-se de kit disponível comercialmente (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Se o animal apresentasse reação positiva em pelo menos um dos quatro tetos, as amostras de leite eram coletadas, para realização do exame microbiológico, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Departamento de Microbiologia e Imunologia, IBB- UNESP), onde eram levadas sob refrigeração e processadas em até 24 horas após a coleta.

### **Isolamento e Identificação de *S. aureus*, a Partir das Amostras de Leite de Vacas com Mastite Subclínica**

De cada amostra de leite, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas, pela técnica de espalhamento (*spread*), na superfície de uma placa de ágar Baird-Parker (Oxoid) com 5% de emulsão de gema de ovo e telurito e incubadas a 35°C/48h. Após esse período, colônias características foram triadas com a coloração de Gram e testes de catalase, coagulase e o Dry spot kit (fator *clumping*) (Oxoid). Para confirmação da espécie *S. aureus*, realizou-se a reação de PCR do gene *nuc* espécie-específico (CRL- AR, 2009).

## Reações de PCR para Detecção dos Genes de Identificação e de Virulência

O DNA foi extraído utilizando-se o Kit Minispin (GE Health Care), conforme recomendações do fabricante. Para as reações de PCR, foi utilizada a GoTaq Green Master Mix 2x (Promega), conforme recomendações. Os genes pesquisados, além do gene de identificação da espécie (*nuc*), foram os de produção das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), da leucocidina Panton-Valentine (*pvl*) e da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*tsst*) (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa dos genes de identificação e de fatores de virulência em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Pb	Referência
<i>nuc</i> EU	F: TCAGCAAATGCATCACAAACAG R: CGTAAATGCACTTGCTTCAGG	287	CRL- AR, 2009
<i>lukSPV</i> - <i>lukFPV</i>	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAAGC	443	Lina et al. (1999)
<i>tsst</i>	F: TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT R: TACTAATGAATTTTTTTTATCGTAAGCCCTT		Jarraud et al. (2002)
<i>sea</i>	F: TTGGAAACGGTTAAAACGAA R: GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	Johnson et al. (1991)
<i>seb</i>	F: TCGCATCAAACCTGACAAACG R: GCAGGTACTCTATAAGTGCC	478	Johnson et al. (1991)
<i>sec</i>	F: GACATAAAAGCTAGGAATTT R: AAATCGGATTAACATTATCC	257	Johnson et al. (1991)
<i>sed</i>	F: CTAGTTTGGTAATATCTCCT R: TAATGCTATATCTTATAGGG	317	Johnson et al. (1991)
<i>see</i>	F: AGGTTTTTTTACAGGTCATCC R: CTTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209	Johnson et al. (1991)

Pb: Pares de bases



## Teste de Disco-difusão e Genes de Resistência

O teste de sensibilidade de disco-difusão foi realizado de acordo com Bauer et al. (1966), com interpretação conforme recomendações do CLSI (2012), utilizando discos impregnados com vancomicina (1 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), tobramicina, trimetoprim-sulfametoxazole (1,25/23,75 µg), cefalotina (30 µg) e ciprofloxacina. De acordo com o diâmetro do halo formado pelo antimicrobiano, a amostra foi classificada em sensível, intermediária ou resistente. A cepa de *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle positivo (CLSI, 2012).

As cepas resistentes ou que apresentaram resistência intermediária para os antimicrobianos cefoxitina, oxacilina, tetraciclina, gentamicina, tobramicina, eritromicina ou ciprofloxacina foram submetidas a reações de PCR para verificação da presença do gene que confere resistência a esses antimicrobianos (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos, em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica (continua).

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Pb	Referência
<i>mecA</i>	F: TGCTATCCACCCTCAAACAGG R: ACGTTGTAACCACCCCAAGA	527	Kondo et al. (2007)
<i>mecC</i>	F: GCTCCTAATGCTAATGCA R: GCTCCTAATGCTAATGCA	302	Cuny et al. (2011)
<i>tet (K)</i>	F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	697	Aarestrup et al. (2000)
<i>tet (M)</i>	F: GTTAAATAGTGTTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	576	Aarestrup et al. (2000)
<i>tet (L)</i>	F: CATTGGTCTTATTGGATCG R: ATTACACTTCCGATTTCCGG	456	Aarestrup et al. (2000)
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA R: CACTATCATAACCACTACCG	220	Van Klundert et al. (1993)

Pb: Pares de bases

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos, em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica (continuação).

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' 3')</b>	<b>Pb</b>	<b>Referência</b>
<i>aph(3')-IIIa</i>	F: GCCGATGTGGATTGCGAAAA	292	Van Klundert et al. (1993)
	R: GCTTGATCCCCAGTAAGTCA		
<i>ant(4')</i>	F: GCAAGGACCGACAACATTTC	165	Van Klundert et al. (1993)
	R: TGGCACAGATGGTCATAACC		
<i>erm(A)</i>	F: TCTAAAAAGCATGTAAGAA	645	Sutcliffe et al. (1996)
	R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAG		
<i>erm(B)</i>	F: GAAAAGTACTCAACCAAATA	639	Sutcliffe et al. (1996)
	R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA		
<i>erm(C)</i>	F: TCAAAACATAATATAGATAAA	642	Sutcliffe et al. (1996)
	R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT		
<i>mrsA</i>	F: GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC	399	Wondrack et al. (1996)
	R: ATCATGTGATGTAAACAAAAT		
<i>grl (A)</i>	F: ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT	559	Schmitz et al. (1998)
	R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA		
<i>gyr (A)</i>	A F: AATGAACAAGGTATGACACC	222	Schmitz et al. (1998)
	R: TACGCGCTTCAGTATAACGC		

Pb: Pares de bases

### **Caracterização Molecular por *agr* typing, SCC*mec*, MLST e *spa*-typing**

Todos os isolados de *S. aureus* foram caracterizados molecularmente pela PCR do *locus* do *accessory gene regulator (agr)* (Tabela 3). O clone que permaneceu por mais tempo no mesmo animal foi classificado também pelo *spa*-typing e MLST, onde os sete genes constitutivos de *S. aureus* (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*) foram amplificados por PCR (Tabela 3) e sequenciados. As sequências foram colocadas em um banco de dados, *online* (<http://www.mlst.net/>), para obtenção do perfil alélico e do complexo clonal.

Nas cepas MRSA, a determinação do cassete cromossômico estafilocócico do gene *mec* (SCC*mec*) também foi realizada por PCRs específicos, segundo Kondo et al.(2007) e Zhang et al. (2005) (Tabela 3).

Tabela 3: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa de genes de caracterização molecular, em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica (continua).

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Pb	Referência
<i>agrI</i>	F: GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT R: ATGCACATGGTGCACATGC	440	Shopsin et al. (2003)
<i>agrII</i>	F: GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC R: ATGCACATGGTGCACATGC	572	Shopsin et al. (2003)
<i>agrIII</i>	F: CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC R: ATGCACATGGTGCACATGC	406	Shopsin et al. (2003)
<i>agrIV</i>	F: CGATAATGCCGTAATACCCG R: ATGCACATGGTGCACATGC	588	Shopsin et al. (2003)
<i>spa</i>	F: TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC R: CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	Variável	www.ridom.com
<i>arcC</i>	F: TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC R: AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456	Enright et al. (2000)
<i>aroE</i>	F: ATCGGAAATCCTATTTACATTC R: GGTGTTGTATTAATAACGATATC	456	Enright et al. (2000)
<i>glpF</i>	F: CTAGGAACTGCAATCTTAATCC R: TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465	Enright et al. (2000)
<i>gmk</i>	F: ATCGTTTTATCGGGACCATC R: TCATTA ACTACAACGTAATCGTA	429	Enright et al. (2000)
<i>pta</i>	F: GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG R: GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474	Enright et al. (2000)
<i>tpi</i>	F: TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA R: TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402	Enright et al. (2000)
<i>yqiL</i>	F: CAGCATA CAGGACACCTATTGGC R: CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516	Enright et al. (2000)
<i>ccrA1-ccrB</i>	F: AACCTATATCATCAATCAGTACGT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	695	Kondo et al. (2007)

Pb: Pares de bases.

Tabela 3: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para a pesquisa de genes de caracterização molecular, em cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica (continuação).

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Pb	Referência
<i>ccrA2-ccrB</i>	F: TAAAGGCATCAATGCACAAACACT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	937	Kondo et al. (2007)
<i>ccrA3-ccrB</i>	F: AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	1791	Kondo et al. (2007)
<i>ccrC</i>	F: CACTTAATCCATGTACACAG R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA	336	Witte et al. (2007)
<i>mecA-mecIF</i>	F: CATAACTTCCCATTCTGCAGATG R: ATATACCAAACCCGACA ACTACA	1963	Kondo et al. (2007)
<i>mecA-IS1272</i>	F: ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG R: ATATACCAAACCCGACA ACTACA	2827	Kondo et al. (2007)
<i>mecA-IS431</i>	F: TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT R: ATATACCAAACCCGACA ACTACA	804	Kondo et al. (2007)
SCC <i>mec</i> I	F: GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG R: GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	613	Zhang et al. (2005)
SCC <i>mec</i> II	F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398	Zhang et al. (2005)
SCC <i>mec</i> III	F: CCATATTGTGTACGATGCG R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	280	Zhang et al. (2005)
SCC <i>mec</i> IVa	F: GCCTTATTCGAAGAAACCG R: CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776	Zhang et al. (2005)
SCC <i>mec</i> IVb	F: TCTGGAATTA CTTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC	493	Zhang et al. (2005)
SCC <i>mec</i> IVc	F: ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200	Zhang et al. (2005)
SCC <i>mec</i> IVd	F: CTCAA AATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881	Zhang et al. (2005)
SCC <i>mec</i> V	F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325	Zhang et al. (2005)

Pb: Pares de bases.

## **Pulsed Field Gel de Eletroforese (PFGE)**

A metodologia utilizada foi a do Pulsenet (CDC, 2016). Cada cepa foi incubada em caldo BHI a 35°/24 horas para a confecção dos *plugues*, em agarose *low melting* e lisostafina (100µg/mL). Após incubação overnight a 37°C, uma porção de, aproximadamente, 2 milímetros de cada *plague* foi cortada para a digestão com a enzima de restrição SmaI Fast (Thermo Scientific), durante 6 minutos. Após esse tempo, as porções dos *plugues* foram distribuídas em gel de agarose *low melting* 1% para a corrida no Chef Mapper com os parâmetros de: pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 40 segundos, voltagem de 6V/cm e ângulo de 120°, no total de 21 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado com SYBR Safe (Invitrogen) e analisado e fotografado em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha Esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

## RESULTADOS

### Coletas de Leite e Confirmação da Espécie *S. aureus*

As 12 coletas ocorreram entre dezembro de 2013 e abril de 2015, com a análise de 665 amostras de leites de vacas com mastite subclínica com o isolamento de *S. aureus* em 116 (17,4%). A confirmação da espécie ocorreu pela reação de PCR, na pesquisa do gene *nuc*, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Relação dos meses de coleta, quantidade de vacas em lactação, reações positivas ao CMT, indicando mastite subclínica e presença de *S. aureus* nas amostras.

Mês/ano	Vacas em lactação	Amostras de leite CMT +	Presença de <i>S. aureus</i> N (%)
Dezembro/2013	123	65	6 (9,2)
Fevereiro/2014	125	68	5 (7,3)
Abril/2014	99	57	4 (7)
Julho/2014	89	72	14 (19,4)
Agosto/2014	89	80	20 (25)
Setembro/2014	86	75	17 (22,7)
Novembro/2014	69	65	23 (35,4)
Dezembro/2014	37	38	9 (23,7)
Janeiro/2015	35	32	6 (18,8)
Fevereiro/2015	32	32	4 (12,5)
Março/2015	37	48	6 (12,5)
Abril/2015	37	33	2 (6,1)

CMT+: California Mastitis Test positiva; N: número de cepas.

### Detecção dos Genes de Virulência

O gene *pvl* foi detectado em 4 (3,4%) das 116 cepas de *S. aureus*. Em 28 (24,1%) isolados foram encontrados, pelo menos, um gene que codifica para a produção das enterotoxinas. O gene *sec* foi o mais prevalente, ocorrendo em 27 (23,3%) cepas e *sea* e *see* em 4,3% (5/116). Os genes *seb* e *sed* não foram observados. Quatro cepas em especial se mostraram com grande potencial enterotoxigênico, pois apresentaram genes para 3 das 5 SEs testadas. Em relação ao *tsst*, a frequência desse gene foi bem maior, ocorrendo em 54 (46,6%) cepas.

### Teste Disco – Difusão

Foi avaliada a sensibilidade das cepas a 12 antimicrobianos e, pela Tabela 5, pode-se observar que 86 (74,1%) das 116 cepas foram sensíveis a todos eles. Não foram observadas cepas resistentes ou com resistência intermediária à vancomicina.

As demais cepas apresentaram resistência ou resistência intermediária a, pelo menos, um dos antimicrobianos testados.

Tabela 5: Teste de sensibilidade das cepas de *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica, aos 12 antimicrobianos testados.

Antimicrobianos	Resistência N (%)	Resistência Intermediária N (%)	Sensibilidade N (%)
Oxacilina	9(7,8)	-	107 (92,2)
Cefoxitina	5(4,3)	-	111 (95,7)
Tetraciclina	14(12,1)	-	102 (87,9)
Tobramicina	-	6 (5,2)	110 (94,8)
Gentamicina	1(0,9)	3 (2,6)	112 (96,5)
Eritromicina	5 (4,3)	1 (0,9)	110 (94,8)
Ciprofloxacina	1 (0,9)	-	115 (99,1)
Estreptomicina	13(11,2)	2 (1,7)	101 (87,1)
Cefalotina	1(0,9)	-	115 (99,1)
Vancomicina	-	-	116 (100)
Trimetropina	2 (1,7)	-	114 (98,3)
Clindamicina	7(6,0)	3 (2,6)	106 (90,4)

N: número de cepas.

## Genes de Resistência aos Antimicrobianos

Os genes que conferem resistência a algumas das drogas estudadas como oxacilina e cefoxitina, tetraciclina, eritromicina, tobramicina, gentamicina e ciprofloxacina já são conhecidos e foram pesquisados. Entre as 6 cepas resistentes ou intermediárias para eritromicina, todas apresentaram o gene *mrsA*, 3 delas também apresentaram simultaneamente o gene *ermA* e uma, o gene *ermC*, sendo que o *ermB* não foi encontrado. Em relação à tetraciclina, 12 das 14 cepas apresentaram o gene *tet(K)*, das quais 9 apresentaram também o gene *tet(M)*, sendo que o *tet(L)* não foi encontrado. Nas outras duas cepas resistentes não foi observado nenhum dos genes pesquisados. A única cepa resistente a ciprofloxacina apresentou os dois genes (*gri(A)* e *gyr(A)*).

Em relação às 4 cepas resistentes à gentamicina, o gene *aph(3')* não esteve presente em nenhuma e apenas 2 das 4 apresentaram o *aac(6')*. O único gene pesquisado para tobramicina não foi detectado em nenhuma das 6 cepas classificadas com resistência intermediária.

O gene *mecA*, principal responsável por conferir a resistência a  $\beta$ -lactâmicos, foi encontrado em 4 das 9 cepas MRSA (Figura 1). Em relação ao homólogo *mecC*, o gene não foi encontrado em nenhuma das demais cepas MRSA.

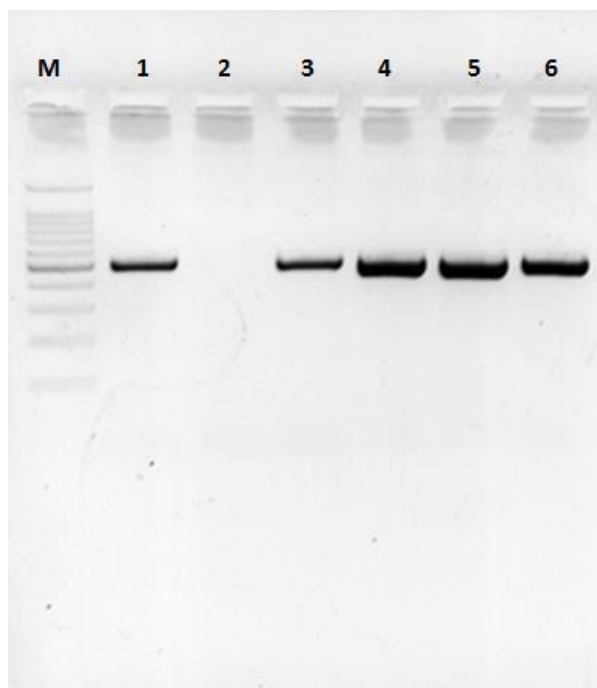


Figura 1: Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *mecA* em *S. aureus*: Poço 1: ATCC29213(527 pb); Poço 2: controle negativo; Poços 3 - 6: cepas positivas.



As 4 cepas que apresentaram o gene *mecA* foram classificadas como sendo SCC*mec* do tipo I, pois apresentaram o complexo *mec* do tipo B e o complexo *ccr* do tipo I e, segundo a International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC, 2009), cepas com essas características são classificadas como SCC*mec* I.

### Tipagem Molecular pelo Sistema *agr*

O grupo *agrI* foi o mais encontrado, ocorrendo em 25 cepas (21,6%), seguido do *agrIII* em 13 (11,2%) e do *agrII* em 11 (9,5%). Não foram encontradas cepas do grupo *agrIV*. A maioria das cepas 68 (58,6%) não foi classificada em nenhum dos grupos. Em um isolado, foi detectada a presença simultânea dos *agr I* e III (Figura 2).

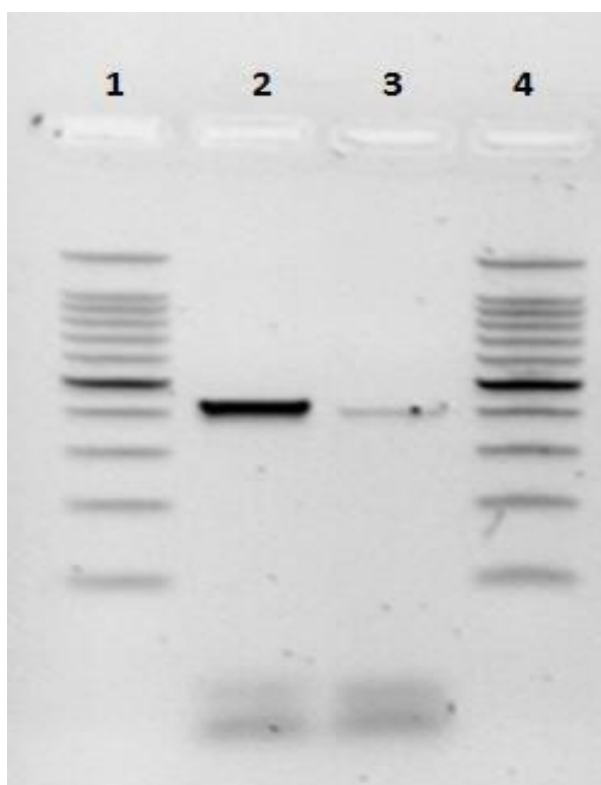


Figura. 2. Gel de eletroforese das PCR para detecção dos genes *agrI* e *agrIII* na mesma cepa. Poço 1: 100 bp DNA ladder; Poço 2:*agrI* (440pb); Poço 3: *agrIII* (406pb); Poço 4: 100 bp DNA ladder.

### Tipagem Molecular por PFGE, *spa*-Typing e MLST

O PFGE foi realizado em 9 cepas que foram isoladas do mesmo animal em 9 coletas diferentes. Através dessa técnica, foi possível observar que os 9 isolados apresentaram o mesmo perfil, demonstrando a persistência desse clone em um hospedeiro, ao longo do tempo (Figura 3). Uma cepa foi escolhida para realização das técnicas de *spa*-Typing e MLST. A sequência do gene da proteína A não foi reconhecida pelo software Ridom Spa Types, sugerindo que seria um possível novo tipo ainda não classificado. Sendo assim, tanto as sequências *Forward* e *Reverse* foram enviadas ao site para verificação da suposta nova sequência. Em relação do MLST, as sequências dos 7 genes foram reconhecidas pelo site ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) e cepa foi classificada como sendo ST 711, pertencendo com complexo clonal 133.

Um segundo PFGE foi realizado, analisando-se os isolados de vários animais no mesmo mês (Figura 4), e foi possível observar cepas de um mesmo clone isoladas em animais diferentes, assim como outros clones, colonizando outros animais.

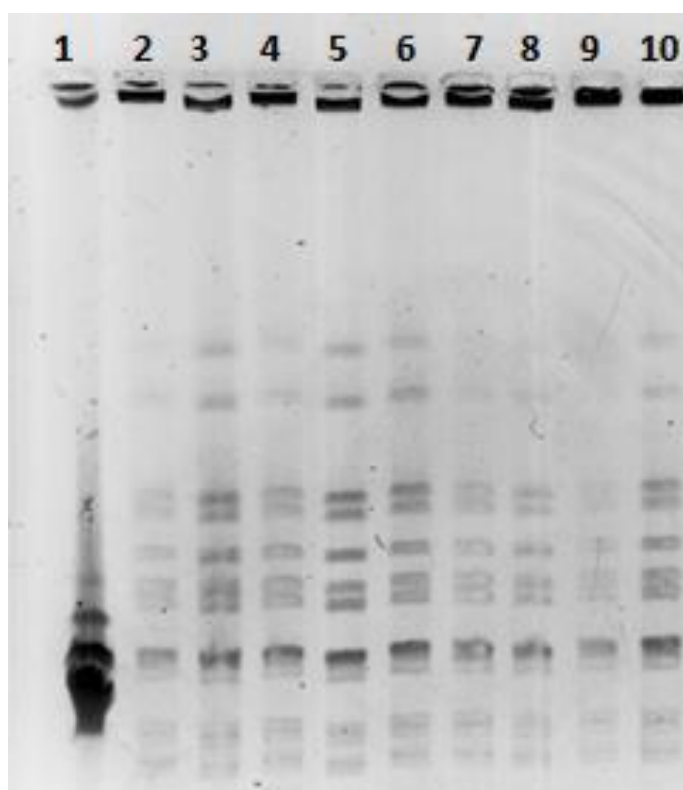


Figura 3: PFGE. Poço 1: Lambda ladder; Poços 2 – 10: cepas de *S. aureus*, isolados do mesmo animal, em 9 coletas diferentes.

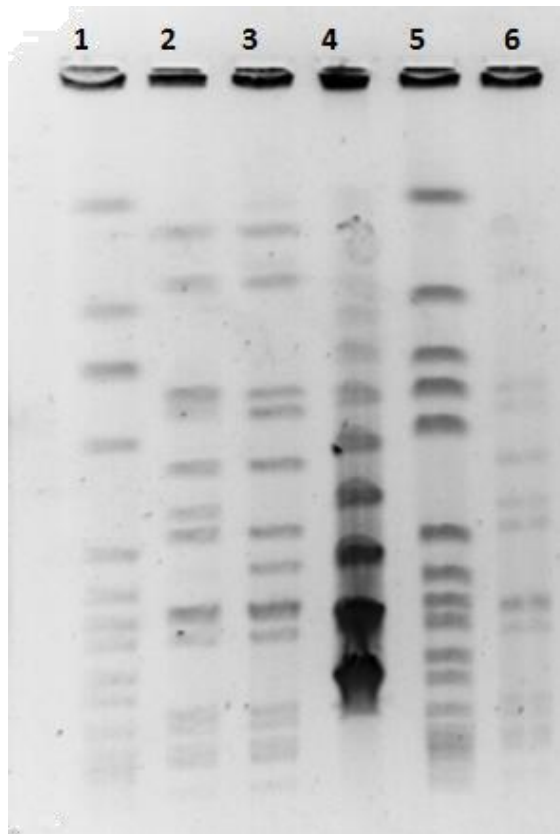


Figura 4. PFGE: Poços 1- 3 e 5- 6: *S. aureus*, isolados de vacas diferentes no mesmo mês; Poço 4: Lambda ladder.

## DISCUSSÃO

*S. aureus* é um dos principais patógenos causadores de mastite bovina, principalmente as subclínicas e crônicas, devido a vários fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos.

Entre as 665 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, 116 (17,4%) foram positivas para *S. aureus*. Alguns estudos encontraram valores similares, como Ghorbanpour et al. (2007), com 25% de positividade e essa incidência parece variar bastante, pois Atyabi et al. (2006) isolaram apenas 2,9% e Abera et al. (2010) encontraram 44,5%. Valores medianos foram observados Ebrahimi et al. (2009) e Havaei et al. (2015), com 8,16% e 12%, respectivamente. Essa variação deve-se aos diferentes locais de estudo, manejo e cuidado dos animais.

Segundo os resultados, 24,1% das cepas apresentaram, pelo menos, um gene para produção de enterotoxinas. Rahimi (2010), avaliando *S. aureus* provenientes de mastite bovina subclínica, observou que 31,9% de cepas apresentaram capacidade enterotoxigenica. Além disso, Carfora et al. (2015) mostraram que 28,6% de seus isolados de leite e derivados carregavam o gene *sec* o que condiz com os dados do presente estudo, de 23,3%. A toxina A é a mais envolvida em intoxicações alimentares por *S. aureus* e mesmo estando presente em baixa positividade (4%), é preocupante uma vez que são termorresistentes. Hata et al. (2008) ao avaliarem cepas provindas de leite, também não encontraram o gene *sea*. Porém, Boynukara et al. (2008) observaram a presença desse gene em 23,6% das amostras e nenhum isolado com a presença do gene *sec*. Esses resultados variáveis podem ser devido as diferenças genotípicas, já relatadas em diferentes regiões e países.

Observou-se que 75,9% (88/116) das cepas não apresentaram nenhum dos genes que codificam SEs. Lim et al. (2004) também encontraram 77,7% das cepas de *S. aureus* negativas para os genes *sea-see* na Coréia e Da Silva et al. (2005), no Brasil, detectaram apenas 9,4% de amostras positivas para estes genes.

Song et al. (2015) descreveram que a presença de genes enterotoxigenicos pode estar relacionada com a tipagem molecular por *agr*, pois as cepas pertencentes aos grupos *agrII* e *agrIV* apresentaram um elevado número desses genes, quando comparadas às cepas pertencentes ao *agrI* e *agrIII*. Essa relação não se apresentou tão clara no presente trabalho, pois apenas 11 cepas (9,5%) foram pertencentes ao grupo *agrII* e nenhuma apresentou genes SEs e não houve cepas pertencentes ao grupo *agrIV*. Pode-se especular sobre o fato de que 88

(75,9%) cepas não apresentaram genes para SEs e 68 (58,6%) não foram classificadas em nenhum dos 4 grupos já descritos. Neste estudo, o grupo *agrI* foi o mais frequente, ocorrendo em 21,6% (25/116) das cepas e o *agrIV* não foi detectado. Takeuchi et al. (2001) também avaliaram *S. aureus* provenientes de leite mastítico e encontraram a prevalência do grupo I em 43,4% e também não encontraram o grupo *agrIV*. Bardiau et al. (2014) observaram o *agrI* em 25,8%, valores próximos ao observado no presente estudo e o *agrIV* ocorreu em apenas 0,4%. Segundo alguns autores, cepas *agrI*, isoladas de bovinos, apresentam maior capacidade de persistência na glandula mamária e maior internalização em células epiteliais *in vitro* (BUZZOLA et al. 2007; MELCHIOR et al. 2009). Em uma cepa, houve a presença concomitante de dois grupos, *agrI* e *agrIII*.

Outros fatores como a presença dos genes *tsst* e *pvl* aumentam o potencial de virulência das cepas. O *tsst* foi observado em 46,5% das cepas, Cardoso et al. (2000) relataram ter encontrado o gene em 47% dos isolados de leite de vacas mastíticas e Nader Filho et al. (2007) encontram um valor menor, de 37,5%, enquanto Sá et al. (2004) não encontraram o gene em vacas com mastite subclínica na região de Botucatu. Vitale et al. (2015), avaliando *S. aureus* provenientes de leite cru e queijos, observaram a presença do gene em 42%, ocorrendo-se sozinho ou combinado com outros genes que codificavam para enterotoxinas. Alguns estudos mostraram que o *tsst* pode estar relacionado com a presença de enterotoxinas, como o de Collery et al. (2008), onde 33,5% dos isolados apresentaram o gene *tsst*, com a presença de, pelo menos, um gene para enterotoxina. Já no presente estudo, em apenas 13% houve o aparecimento concomitante do gene *tsst* com algum gene que codifica SEs.

O gene *pvl* foi encontrado em apenas 3,4% (4/116) das cepas, Pajic et al. (2014) também encontraram baixa positividade em cepas isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica (6,7%) e alta, em cepas isoladas de seres humanos (63,6%). Já Xing et al. (2016) detectaram o gene em 29,5% de *S. aureus* isolados de leite de cabra. Esse gene parece representar um risco para os seres humanos e animais, pois estão associados com graves infecções (JARRAUD et al., 2002; FRANCIS et al., 2005). Alguns trabalhos associaram a presença do *pvl* com cepas MSSA ou MRSA. No presente trabalho, apenas uma cepa foi MRSA – *pvl* positiva, as outras 3 foram MSSA - *pvl* positiva, Sudagidan e Aydin (2010)

também observaram a prevalência de cepas MSSA- *plv*, em cepas de *S.aureus*, isoladas de em alimentos.

Além desses fatores de virulência, o aumento no número de cepas resistentes aos antimicrobianos em rebanhos é preocupante, pois a persistência da bactéria facilita a contaminação dos outros animais e a consequente disseminação da doença. Porém, mesmo com a multirresistência relatada, o uso de antibióticos ainda é a principal terapia no controle da mastite e com isso, testes de susceptibilidade são importantes no direcionamento do melhor tratamento (MORONI et al., 2006). Neste estudo, foram encontradas 9 cepas (7,8%) MRSA. Vanderhaeghen et al. (2010) relataram a presença de cepas MRSA em 9,3% dos isolados de casos de mastite clínica e subclínica em vacas belgas e Wang et al. (2015) detectaram MRSA em 15,5% das vacas na China. Entre as 9 cepas MRSA isoladas neste trabalho, 4 apresentaram o gene *mecA*. Moon et al. (2007) avaliaram 835 cepas e encontraram 21 MRSA e destas, 13 tinham o *mecA*. Kamal et al. (2013), analisaram amostras de leite cru e produtos lácteos e encontraram *mecA* em 5,2% dos isolados, resultado próximo ao encontrado previamente por Normanno et al. (2007) de 3,75%. Já Jamali et al. (2014) observaram 5 (11,6%) MRSA em 43 isolados e todos apresentaram o *mecA*. Embora a prevalência desse gene tenha sido baixa, existe o risco de contaminação zoonótica, seja pelo contato direto com esses animais como pelo consumo de leite e produtos lácteos não pasteurizados (CARUSO, et al. 2016). Em relação ao homólogo *mecC*, esse gene não foi encontrado em nenhuma das demais cepas MRSA. A prevalência do *mecA* é relatada também por Luini et al. (2015) que todas as cepas MRSA encontradas, apresentaram o *mecA*. Porém, a presença de MRSA *mecC* em bovinos leiteiros é considerado um fator de risco, uma vez que, há chances de transmissão direta ou indireta dessas novas cepas para humanos (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011). Ainda sobre as cepas MRSA, 88,9% (8/9) apresentaram resistência a pelo menos, mais uma droga, sendo que, a mais frequente foi a resistência simultânea a tetraciclina (66,7%). Mas, também foi observada a resistência concomitante com clindamicina e estreptomicina. Vanderhaeghen et al., (2010) encontraram 11 cepas MRSA em vacas mastíticas na Bélgica e destas, todas apresentaram resistência simultânea a tetraciclina.

As 4 cepas MRSA *mecA* positivas foram classificadas como sendo SCC*mec* tipo I. Já Havaei et al. (2015) encontraram a prevalência ao SCC*mec* tipo IV e Kreausukon et al. (2012) do tipo V, em tanques de rebanhos leiteiros. Os cassetes dos tipos I, IV e V são responsáveis por codificarem exclusivamente resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (DEURENBERG et al., 2007). Além disso, cepas MRSA podem ser divididas em clones envolvidos

principalmente em ambientes hospitalares (H-MRSA) que geralmente pertencem ao SCCmec do tipo I, II ou III (ITO, et al., 2004) ou circulantes na própria comunidade (C-MRSA), geralmente tipo IV ou V (SANTOS et al., 2007). Porém, como mostrado neste estudo, essas cepas circulam, chegando a infectar diversos hospedeiros, além disso, os diferentes locais de estudo mostram a grande diversidade genética das cepas infectando os mesmos tipos de ambientes.

A maior parte das cepas (74,1%) foi sensível a todos os antibióticos, sendo que nenhuma delas foi resistente à vancomicina e 6 apresentaram apenas resistência intermediária à tobramicina. Entre as drogas analisadas, 12,1% das cepas foram resistentes à tetraciclina e 11,2% à estreptomicina, seguidos da oxacilina (7,8%) e cefoxitina (4,3%) e eritromicina (4,3%). Silva et al. (2013) avaliaram cepas *S. aureus* de vacas com mastite no estado de São Paulo e encontraram 50% das cepas resistentes à estreptomicina e apenas 3,5% resistentes à tetraciclina. Já Jamali et al. (2015) encontraram valores superiores de resistência a tetraciclina (56,1%) e oxacilina (16,2%) e valores similares a cefoxitina (5,5%) e Antonios et al. (2015) avaliaram isolados de tanques de leite bovino e encontraram 81% de cepas sensíveis.

Utilizando-se a técnica de PFGE, foi possível observar que, 9 cepas isoladas em 9 meses diferentes, no mesmo animal, foram classificadas como indistinguíveis, pois segundo Tenover et al. (1995), uma linhagem é considerada geneticamente indistinguível a outra quando ambas apresentam o mesmo número de bandas com, aparentemente, o mesmo tamanho e a interpretação epidemiológica desse resultado é que os isolados são representantes do mesmo clone. Além disso, para que a técnica tenha poder discriminatório relevante é necessário um mínimo de 10 fragmentos de bandas em cada amostra (MAGALHÃES, et al., 2005), conferindo validade aos resultados obtidos no presente estudo. Essa cepa foi classificada como sendo ST 711, pertencente ao complexo clonal 133. Zakour et al. (2008), encontraram esse mesmo ST em caso de mastite clínica em caprino. Vários STs são relatados em casos de mastite bovina, como Rabello et al. (2007), avaliaram vários rebanhos no sudoeste do Brasil em diferentes anos e encontraram 11 STs em 62 *S. aureus*, Snel et al. (2015) classificaram seus isolados como ST 126,. Oliveira et al. (2015) observaram 15 fazendas no estado da Paraíba- BR, e também encontrou uma variedade de 11 STs e mais 4 sequências novas.

Na análise, em relação às cepas isoladas dos diferentes animais no mesmo mês, foi possível observar a presença do mesmo clone infectando animais diferentes e a presença de cepas classificadas como intimamente relacionadas, pois apresentaram mudança em um único

evento genético (TENOVER, et al., 1995). Neste caso, parece ter ocorrido deleção de um fragmento de DNA. Além de outras cepas correlacionadas entre si e diferente das demais.



## CONCLUSÃO

A presença de vários fatores de virulência e a resistência às drogas, além da persistência da colonização, dificultam o controle da mastite por *S. aureus* e geram riscos para os consumidores, uma vez que na maioria das vezes, o leite vindo de vacas com mastite subclínica, é misturado ao leite das vacas saudáveis, o que pode causar problemas de saúde pública. Além disso, o conhecimento das características moleculares de *S. aureus* isolados de leites de vacas com mastite subclínica no Brasil é essencial para o entendimento dos clones circulantes e de suas implicações na saúde pública e animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 37, n. 2, p. 127-137, 2000.

ABERA, M.; DEMIE, B.; ARAGA, W. K.; REGASSA, F.; REGASSA, A. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 2, p. 29-34, 2010.

ANTONIOS, Z.; THEOFILOS, P.; IOANNIS, M.; GEORGIOS, S.; GEORGIOS, V.; EVRIDIKI, B.; LOUKIA, E.; KYRIAKI, M.; ATHANASIOS, A.; VASILIKI, L. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk from Greek traditional ovine farms. **Small Ruminant Research**, v. 125, p. 120-126, 2015.

ATYABI, N.; VODJGANI, M.; GHARAGOZLOO, F.; BAHONAR, A. Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Tehran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 7, n. 3, p. 76-79, 2006.

BARDIAU, M.; DETILLEUX, J.; FARNIR, F.; MAINIL, J. G.; OTE, I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 169, p. 74-79, 2014.

BARHEMA, H.W.; GREEN, M.J.; BRADLEY, A.J.; ZADOKS, R.N. Invited review: the role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4717-4729, 2009.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BOTREL, M. A.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J. Y.; CALAVAS, D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 5, p. 479-487, 2010.

BOYNUKARA, B., GULHAN, T., ALISARLI, M., GURTURK, K., SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 209-211, 2008.

BUZZOLA, F.R.; ALVAREZ, L.P.; TUCHSCHERR, L.P.; BARBAGELATA, M.S.; LATTAR, S.M.; CALVINHO, L.; SORDELLI, D.O. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 886 – 891, 2007.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; DEMELIO, V.; SPINA, D.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. Agr-genotyping and transcriptional analysis of biofilmproducing *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 220–227, 2007.

CARDOSO, H. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 7-10, 2000.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12-15, 2015.

CARUSO, M.; LATORRE, L.; SANTAGADA, G.; FRACCALVIERI, R.; MICCOLUPO, A.; SOTTILI, R.; PALAZZO, L.; PARISI, A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 26-31, 2016.

COLLERY, M.M.; SMYTH, D.S.; TWOHIG, J.M.; SHORE, A.C.; COLEMAN, D.C.; SMYTH, C.J. Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 348-358, 2008.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). Oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): Laboratory Protocol for Molecular Typing of *S. aureus* by Pulsedfield Gel Electrophoresis (PFGE). [http://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar\\_mras\\_PFGE\\_s\\_aureus.pdf](http://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar_mras_PFGE_s_aureus.pdf). Acessado em: 20/06/2016.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. M02-A11, 2012

CRL-AR (Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance Multiplex PCR for the detection of the *mecA* gene and the identification of *Staphylococcus aureus*). National Food Institute. Technical University of Denmark. Copenhagen, 2009.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMINGER, B.; WITTE, W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. **Plos One Journal**, V, 6, n. 9, p. 24360, 2011

DA SILVA, E. R.; DO CARMO, L. S.; DA SILVA, N. Detection of enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.

DEURENBERG, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A. W.; BRUGGEMAN, C. A.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 222-235, 2007.

EBRAHIMI, A.; AKHAVANTAHARI, M. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 10 p. 273-277, 2009.

ENRIGHT, M.C.; DAY, N.P.; DAVIES, C.E.; PEACOCK, S.J.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.1008-1015, 2000.

FRANCIS, J.S.; DOHERTY, M.C.; LOPATIN, U.; JOHNSTON, C.P.; SINHA, G.; ROSS, T.; CAI, M.; HANSEL, N.N.; PERL, T.; TICEHURST, J. R.; CARROLL, K.; THOMAS, D.L.; NUERMBERGER, E.; BARTLETT, J. G. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 100–107, 2005.

GAO, J.; FERRERI, M.; YU, F.; LIU, X.; CHEN, L.; SU, J.; HAN, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in a single herd in China. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 550–552, 2012.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M.T.; LINDSAY, H.; WEBB, C.R.; BROWN, D.F.; CURRAN, M.D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D.J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S.D.; EDWARDS, G.F.; GIRVAN, E.K.; KEARNS, A.M.; PICHON, B.; HILL, R.L.; LARSEN, A.R.; SKOV, R.L.; PEACOCK, S.J.; MASKELL, D.J.; HOLMES, M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595–603, 2011.

GENESTIER A.L.; MICHALETE M.C.; PRÉVOSET, G.; BELLOT, G.; CHALABREYSSE, L.; PEYROL, S.; THIVOLET, F.; ETIENNE, J.; LINA, G.; VALLETTE, F. M.; VANDENESCH, F.; GENESTIER, L. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 11, p. 3117-3127, 2005.

GHORBANPOUR, M.; SEYFIABAD, S.M.; MOTAMEDI, H.; JAMSHIDIAN, M.; GOURANINEZHAD, S. Comparison of PCR and bacterial culture methods for diagnosis of dairy cattle's subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Veterinary Research** v. 62, n. 4, p. 87-91, 2007.

GINDONIS, V.; TAPONEN, S.; MYLLYNIEMI, A. L.; PYÖRÄLÄ, S.; NYKÄSENOJA, S.; SALMENLINNA, S.; LINDHOLM, L.; RANTALA, M. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 61, p. 2-8, 2013.

GUSTAFSON, J. E.; MUTHAIYAN, A.; DUPRE, J. M.; RICKE, S. C. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. **Food Control**, p. 1-14, 2015.

HATA, E., KATSUDA, K., KOBAYASHI, H., NISHIMORI, K., UCHIDA, I., HIGASHIDE, M., ISHIKAWA, E.; SASAKI, T.; EGUCHI, M. Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from humans and bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 564-569, 2008.

HAVAEI, S. A.; ASSADBEIGI, B.; ESFAHANI, B. N.; HOSEINI, N. S.; REZAEI, N.; HAVAEI, S. R. Detection of *mecA* and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in MRSA strains. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 161-167, 2015.

ITO, T.; MA, X. X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2637-2651, 2004.

IWG-SCC (INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 4961-4967, 2009.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2226-2230, 2014.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 45, p. 383-388, 2015.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. **Infecton and Immunity**, v. 70, p. 631–641, 2002.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 426-430, 1991.

KAMAL, R. M.; BAYOUMI, M. A.; EL AAL, S. F. A. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 49-53, 2013.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J. Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 264-74, 2007.

KOT, B., SZWEDA, P., FRANKOWSKA-MACIEJEWSKA, A., PIECHOTA, M., WOLSKA, K. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **The Journal of Dairy Research**, v.83, n.2, p. 228-235, 2016.

KREASUKON, K.; FETSCH, A.; KRAUSHAAR, B.; ALT, K.; MÜLLER, K.; KRÖMKER, V.; ZESSIN, K. H.; KASBORER, A.; TENHAGEN, B. A. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4382-4388, 2012.

LIM, S. K.; JOO, Y.; MOON, J.; LEE, A.; NAM, H.; WEE, S.; KOH, H. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 581–584, 2004.

LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F.; BES, M.; PETER, M.O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1128–1132, 1999.

LUINI, M.; CREMONESI, P.; MAGRO, G.; BIANCHINI, V.; MINOZZI, G.; CASTIGLIONI, B.; PICCININI, R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 3, p. 270-274, 2015.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia: uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MELAKE, N.A.; ZAKARIA, A.S.; IBRAHIM, N.H.; SALAMA, M.A., MAHMOUD, A.Z. Prevalence of Agr Specificity Groups among in vitro Biofilm Forming Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Carriers. **International Journal of Microbiological Research**, v. 5, n. 2, p. 76-84, 2014.

MELCHIOR, M.B.; OSCH, M.H.J.; GRAAT,R.M.; DUIJKEREN,E.; MEVIUS,D.J.; NIELEN, M.; GAASTRA,W.; FINK-GREMMELS, J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin resistance in Agr-type II strains. **Vetinary Microbiology**., v. 137, p. 83–89, 2009.

MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D.A.; ALENCAR, T.A.; COELHO, I.S.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis as a subsidy for the implementation of control measures. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 859-864, 2012.

MOON, J. S.; LEE, A.R.; KANG, H.M.; LEE, E.S.; KIM, M.N.; PAIK, Y. H., PARK, Y.H.; JOO, Y.S.; KOO, H. C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p. 1176-1185, 2007.

MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; VILLA, R.; BOETTCHER, P.; CARLI, S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2973–2976, 2006.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. v. 59, n. 5, p. 1316-1318, 2007.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A.L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 219-222, 2007.

OLIVEIRA, C. J. B.; TIAO, N.; SOUSA, F. G. C.; MOURA, J. F. P.; SANTOS FILHO, L.; GEBREYES, W. A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and Identification of Novel Sequence Types. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, p. 97-105, 2015.

PAJÍĆ, M. J.; RAŠIĆ, Z. B.; VELEBIT, B. M.; BOBOŠ, S. F.; MIHAJLOVIĆ-UKROPINA, M. M.; RADINOVIĆ, M. Ž.; GALFI, A. L.; PETKOVIĆ, J. M.; TROJAČANEC, S. I. The prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine and human origin. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 3, p. 205-214, 2014.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça- SP, ano IX, n.16, 2011.

PRAJAPATI, B. S.; PRAJAPATI, R. B. Toxic shock syndromes. **Pediatric Infectious Disease**, v. 2, n. 1, p. 10-13, 2010.

RABELLO, R. F.; MOREIRA, B. M.; LOPES, R. M.; TEIXEIRA, L. M.; RILEY, L. W.; CASTRO, A. C. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 1505-1511, 2007.

RAHIMI, E.; SAFAI, H. G. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 393-394, 2010.

RALL, V. L. M.; MIRANDA, E. S.; CASTILHO, I. G.,; CAMARGO, C. H.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; FERNANDES JÚNIOR, A. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 829-837, 2014.

SÁ, M.E.P.D.; CUNHA, M.D.L.R.D.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importance of *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis: presence of enterotoxins, shock syndrome toxin and relationship with somatic cell count. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 321-326, 2004.

SANTOS, A. L. D.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. D.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F., RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 130,199, 1957.

SCHMITZ, F.J.; STEIERT, M.; TICHY, H.V.; HOFMANN, B.; VERHOEF, J.; HEINZ, H.P.; KÖHRER, K.; JONES, M.E. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. **Journal of Medical Microbiology**, v 47, p. 341-351, 1998.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B.; ALCABES, P.; SAID-SALIM, B.; LINA,G.; MATSUKA, A.; MARTINEZ,J.; KREISWIRTH, B.N. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p. 456-459, 2003.



SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: recent advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 350-359, 2013.

SILVA, N.C.C.; GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; BUDRI, P.E.; GÓMEZ-SANZ, E.; BENITO, D.; LANGONI, H.; RALL, V.L.M.; TORRES, C. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6856-6862, 2013.

SNEL, G. G.; MONECKE, S.; EHRICHT, R.; PICCININI, R. Molecular characteristics of *bap*-positive *Staphylococcus aureus* strains from dairy cow mastitis. **Journal of Dairy Research**, v. 82, n. 3, p. 312-316, 2015.

SONG, M., BAI, Y., XU, J., CARTER, M. Q., SHI, C., SHI, X. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. **International Journal of Food Microbiology**, v. 195, p. 1–8, 2015.

SUDAGIDAN, M.; AYDIN, A. Virulence properties of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* food isolates encoding Panton–Valentine Leukocidin gene. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 287-291, 2010.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 2562-2566, 1996

TAKEUCHI, S.; MAEDA, T.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA, Y. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 267-274, 2001.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, 1995.

UNNERSTAD, H. E.; BENGTSSON, B.; AF RANTZIEN, M. H.; BORJESSON, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n.6, p. 46, 2013.

VAN DE KLUNDERT, F.A.J.M.; RAATS, J.M.H.; BLOEMENDAL, H. Intermediate filaments: regulation of gene expression and assembly. **European Journal Biochemistry**, v. 214, p. 351-366, 1993.

VANDERHAEGHEN, W.; CERPENTIER, T.; ADRIAENSEN, C.; VICCA, J.; HERMANS, K.; BUTAYE, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 166–171, 2010.

VITALE, M.; SCATASSA, M.L.; CARDAMONE, C.; OLIVERI, G.; PIRAINO, C.; ALDUINA, R.; NAPOLI, C. Staphylococcal food poisoning case and molecular analysis of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food in Sicily, Italy. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 1, p. 21-23, 2015.

WANG, D.; WANG, Z.; YAN, Z.; WU, J.; ALI, T.; LI, J.; YANLI, L. V.; HAN, B. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p. 9-16, 2015.

WITTE W., STROMMENGER B., STANEK C., CUNY C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 255-8, 2007.

WONDRACK, L.; MASSA, S.; YANG, B.; SUTCLIFFE, J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 992- 998, 1996.

XING, X.; ZHANG, Y.; WU, Q.; WANG, X.; GE, W.; WU, C. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. **Food Control**, v. 59, p. 644-650, 2016.

ZAKOUR, N. L. B.; STURDEVANT, D. E.; EVEN, S.; GUINANE, C. M.; BARBEY, C.; ALVES, P. D.; COCHET, M. F.; GAUTIER, M.; OTTO, M.; FITZGERALD, J. R.; LE LOIR, Y. Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 19, p. 6302-6317, 2008.

ZHANG, K.; MCCLURE, J.A.; ELSAYED, S.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 43, p. 5026-33, 2005.