

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/01/2018.



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^a Dr^a 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

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	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
2. OBJETIVOS	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 1	33
RESUMO	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	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
RESULTADOS	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
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	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 subclínica40

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 subclínica42

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 testados46

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 cepa48
- Figura 3:** PFGE de *S. aureus* isolados no mesmo animal em diferentes meses49
- Figura 4:** PFGE de *S. aureus* isolados de animais diferentes no mesmo mês50

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 Panton Valentine) and superantigens as the toxin Panton 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 Panton-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*, *Trüperella 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* metilicina sensíveis (MSSA) e em metilicina 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 β -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 (β -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 micro-organismo (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.

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. 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. 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 Pantone-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.