

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADAS EM AMBIENTE DE ORDENHA E NO LEITE
BUBALINO**

**Lucas José Luduverio Pizauro
Médico Veterinário**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADAS EM AMBIENTE DE ORDENHA E NO LEITE
BUBALINO**

Lucas José Luduverio Pizauro

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Àvila

Coorientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área de Medicina Veterinária
Preventiva**

2017

Pizauro, Lucas José Luduverio
P695 Caracterização de estirpes de staphylococcus spp isoladas
em ambiente de ordenha e no leite bubalino / Lucas José
Luduverio Pizauro. -- Jaboticabal, 2017
VII, 58 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Luiz Francisco Zafalon

Coorientador: Fernando Antonio de Ávila

Coorientador: Oswaldo Durival Rossi Junior

Banca examinadora: Mauricio de Alvarenga Mudadu,
Luciano Menezes Ferreira, Hélio Jose Montassier, Marita
Vedovelli Cardozo

Bibliografia

1. alinhamento genômico. 2. *buballus bubalis*. 3 genes
de virulência. 4. MALDI-TOF MS. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:637.12

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp. ISOLADAS
EM AMBIENTE DE ORDENHA E NO LEITE BUBALINO

AUTOR: LUCAS JOSÉ LUDUVÉRIO PIZAURO
ORIENTADOR: LUIZ FRANCISCO ZAFALON
COORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA
COORIENTADOR: OSWALDO DURIVAL ROSSI JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



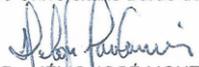
Pesquisador Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON
EMBRAPA / São Carlos, SP



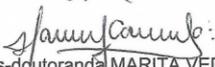
Pesquisador Dr. MAURICIO DE ALVARENGA MUDADU
Bioinformática / EMBRAPA - Campinas, SP



Prof. Dr. LUCIANO MENÉZES FERREIRA
Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto, SP



Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS JOSÉ LUDUVERIO PIZAURO - Nascido em 22 de fevereiro de 1985 na cidade de Ribeirão Preto - SP, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal em fevereiro de 2006, concluindo-o em dezembro de 2010. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP de julho de 2009 a junho de 2010 (Processo 2009/05211-4) tendo desenvolvido o trabalho intitulado “Avaliação clínica, perfil bioquímico sérico e hemogasometria de bezerros bubalinos experimentalmente infectados por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin”. Obteve o título de Mestre em Clínica Médica Veterinária no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, em fevereiro de 2013, sob orientação do prof. Dr. José Jurandir Fagliari e coorientação do prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal, como bolsista da FAPESP (Processo 2011/03514-0). Ingressou no Doutorado, no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de atuação Medicina Veterinária Preventiva em março de 2013, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon e co-orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior e do Prof. Dr. Fernando Antônio de Àvila. Realizou estágio sanduiche na *University of Guelph* sob orientação da Dra. Janet Isabel MacInnes, pelo programa PDSE processo 99999.010456/2014-07 durante o período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **João** e **Neuza**, por todo apoio, incentivo e paciência durante minha vida, e por serem o alicerce para o meu desenvolvimento.

Aos meus irmãos, **André** e **Rodrigo**, pelo convívio que nos torna mais unidos como família.

E à minha noiva **Camila**, pela paciência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon**, pela orientação, amizade e confiança.

A CAPES pela concessão das Bolsas de Doutorado e do estágio sanduiche realizado em Guelph bem como pelo auxílio financeiro concedido.

Aos professores, **Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior e Dr. Fernando Antônio de Ávila**, pela co-orientação, colaboração e ensinamentos.

A Dra. Janet I. MacInnes , pela co-orientação, colaboração e ensinamentos.

Aos funcionários dos Laboratórios de Apoio à Pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, de Patologia Veterinária e aos funcionários do departamento de *Pathobiology* da *University of Guelph*, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto de pesquisa

À proprietária **Cristiana Simão Seixas**, que permitiu a utilização dos animais no estudo, e aos funcionários da fazenda e todos aqueles, que ajudaram na colheita das amostras.

Aos meus **colegas de laboratório e de disciplinas**, pela ajuda, compreensão e incentivos.

A **todas as pessoas** que contribuíram de alguma maneira com este projeto.

Aos membros da banca de qualificação (**Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon, Profa. Dra Karina Paes Burger, Prof. Dr. Tiago Balbuena Dra. Marita Vedovelli Cardoso e Dr. Silas Eto**) pelas sugestões e alterações valiosas que contribuíram para melhorar a qualidade da presente tese.

SUMÁRIO

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Bubalinocultura, produção de leite e derivados	3
2.2 Microbiologia do leite bubalino	4
2.3 Mastite em bubalinos	4
2.4 Fatores de virulência dos estafilococos	5
2.5 Resistência dos SCN aos antimicrobianos.....	7
2.6 Identificação das espécies do gênero <i>Staphylococcus</i>	7
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivo geral:	9
3.2 Objetivos específicos:	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Caracterização da propriedade rural e do rebanho.....	10
4.2 Seleção dos animais	10
4.3 Colheita das amostras	10
4.4 Contagem de células somáticas (CCS) das amostras de leite bubalino	11
4.5 Cultivo e identificação dos microrganismos isolados do leite bubalino.....	11
4.6 Avaliação da Identificação dos isolados de SCN pela técnica de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser em Tempo de Voo	12
4.7 Extração do DNA dos SCN.	12
4.8 PCR em tempo real de genes de virulência dos SCN	13
4.9 Confeções de iniciadores para identificação das espécies dos SCN e sequenciamento dos produtos de PCR obtidos	15
4.10 Sequenciamento e montagem do genoma de <i>Staphylococcus agnetis</i> e <i>Staphylococcus hyicus</i>	15
4.11 Comparação de genomas com <i>CCT-View</i> e <i>Progressive Mauve</i>	16
4.12 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17

5.1 Identificação prévia de casos de mastite bubalina	17
5.2 Identificação dos isolados pela Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser em tempo de voo (MALDI-TOF)	18
5.3 Identificação dos estafilococos por RT-PCR.....	21
5.4 Comparação de genomas entre o <i>S. agnetis</i> e o <i>S. hyicus</i>	27
5.5 Sequenciamento de DNA genômico do <i>S. agnetis</i> e do <i>S. hyicus</i>	30
5.6 Espécies de SCN confirmados por meio da biologia molecular.....	32
5.7 Frequência de genes de virulência dos SCN isolados	34
5.8 Susceptibilidade dos SCN aos antimicrobianos	36
6 CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp ISOLADAS EM AMBIENTE DE ORDENHA E NO LEITE BUBALINO

RESUMO – Tendo em vista a importância e o crescente interesse na produção de leite de búfala e seus derivados e da ocorrência de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) como patógenos da mastite tanto em bovinos como em bubalinos. O presente estudo objetivou avaliar genes de virulência, a resistência a antimicrobianos, bem como metodologias para correta identificação destes SCN em ambiente de ordenha e no leite de bubalinos. Foram colhidas 320 amostras de leite de quartos mamários de 80 búfalas escolhidas aleatoriamente, 20 amostras de narinas e 20 amostras da boca dos bezerros bubalinos, 16 amostras das mãos dos ordenhadores e 64 amostras de insufladores das teteiras, coletadas durante a ordenha. Vinte e sete cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa foram positivas para o gene *eno*, 10 para o gene *ebps*, 10 para o gene *fnbA*. Em relação aos genes relacionados com a produção de enterotoxinas, apenas uma cepa foi positiva para o gene *sea*, uma para o gene *see* e para os genes relacionados a resistência antimicrobiana, uma cepa foi positiva para o gene *mecA*. A identificação das espécies isoladas foi realizada utilizando-se a metodologia de MALDI-TOF MS e confirmada por iniciadores espécie-específico desenhados neste estudo, exceto para *S. agnetis* o qual foi erroneamente identificado como *S. hyiucs* por espectrofotometria de massa. Neste trabalho a identificação destas duas espécies foi confirmada por sequenciamento genômico de um isolado representativo. Foram observadas quatro amostras resistentes à clindamicina, nove à vancomicina, uma ao cloranfenicol, sete à rifampicina, quatro a cefepime, sete à oxacilina, 17 à penicilina, 13 à eritromicina, 15 ao cotrimoxazole e três à tetraciclina. Resistência a dois ou mais princípios ativos antimicrobianos simultaneamente foi observada em 21 isolados. Os principais SCN isolados foram os *S. chromogenes*, *S. agnetis* e *S. epidermidis*. A detecção de genes relacionados à adesão e à produção de enterotoxinas e toxinas do choque tóxico tornam estas cepas um risco potencial à saúde pública. A técnica de MALDI-TOF MS permite o diagnóstico rápido e preciso para algumas espécies de SCN, entanto o método deve ser utilizado com precaução ao avaliar amostras veterinárias. Os iniciadores desenhados para o gene *cydB* neste estudo podem ser utilizados para PCR convencional ou em tempo real.

Palavras-chaves: alinhamento, *Buballus bubalis*, genômica, genes de virulência, MALDI-TOF MS

CHARACTERIZATION OF *Staphylococcus spp* STRAINS ISOLATED FROM BUFFALO MILK AND ENVIRONMENT

ABSTRACT – Due to the importance and the growing interest in buffalo milk production and its derivate and the concurrency of coagulase negative staphylococci as major mastitis pathogens both in cattle and in buffalo. This study aimed to search for virulence genes, antimicrobial resistance, and to evaluate methodologies for the identification of these microorganisms in samples of buffalo milk and from milking environment. For this, a total of 320 milk samples were collected from mammary quarters of 80 randomly selected buffaloes, 20 samples from nostrils and 20 samples from buffalo calves 'mouths, 16 samples from milking hands and 64 samples from liners were collected at the time of milking. Twenty-seven strains of coagulase negative staphylococci were positive for the *eno* gene, ten for *ebpS* gene, ten for the *fnbA*. Regarding genes related to enterotoxins production. Only one strain was positive for the *sea* and *see* gene and one for the *mecA* gene. The identification of the isolates was correctly done by MALDI-TOF MS and subsequently confirmed by species specific primers, except for *S. agnetes* that was wrongly identified as *S. hyiucs*. This identification was confirmed by genomic sequencing of a representative isolate from each species. There were four strains resistant to clindamycin, nine to vancomycin, one to chloramphenicol, seven to rifanpicina, four to cefepime, seven to oxacillin, 17 to penicillin, 13 to erythromycin, 15 to cotrimoxazole and three to tetracycline. Furthermore, resistance to two or more antibiotics were observed in 21 isolates. The present study results may contribute to incidence prevention and control of mastitis in buffalo, caused by coagulase negative *Staphylococcus*. The main SCN species isolated were *S. chromogenes*, *S. agnetis* and *S. epidermidis.*, the detection of genes related to adhesion and the production of enterotoxins make these strains a potential public health risk. The MALDI-TOF MS technique allows rapid and accurate diagnosis for some SCN, but the method should be used with caution when evaluating veterinary samples. The primers designed for the c and B gene in this study can be used for conventional or real-time PCR.

Key-words: alignment, *Buballus bubalis*, genomic, MALDI-TOF MS, virulence genes,

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fatores de virulência dos estafilococos.	6
Tabela 2. - Iniciadores utilizados para investigação de genes codificadores de fatores de virulência em <i>Staphylococcus</i> spp isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha.	14
Tabela 3. Médias e desvios padrão da CCS (células/mL) no leite de búfalas durante a lactação em relação aos respectivos resultados da intensidade da reação ao teste CMT.	17
Tabela 4. Gêneros e espécies dos microrganismos isolados de amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha, identificados pela técnica de MALDI-TOF MS com escores logarítmicos superior a 1,99.	19
Tabela 5. Sequências de nucleotídeos e tamanho do produto gerado do gene <i>cydB</i> pelos Iniciadores desenhados e utilizados neste estudo para identificação dos SCN por PCR em tempo real.	24
Tabela 6. Frequência de isolamentos das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (SCN) corretamente identificadas por meio de iniciadores espécie específicos e PCR em tempo real de acordo com o local de coleta da amostra.	33
Tabela 7. Frequência de genes de virulência, detectados por PCR em tempo real, de acordo com a espécie de SCN identificada em leite bubalino e ambiente de ordenha.	35
Tabela 8. Frequência da detecção dos genes de virulência das cepas de SCN, identificada em leite bubalino e ambiente de ordenha, detectados por PCR em tempo real, de acordo com a origem.	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Alinhamento das sequências do gene *cydB* dos SCN, a linha continua representa a sequência de nucleotídeos presentes no gene, espaços representam gaps (inserções para que nucleotídeos semelhantes possam ser alinhados), e a conservação dos nucleotídeos entre as espécies são representadas por barras abaixo do alinhamento.....21
- Figura 2.** Dendrograma representativo do gene *cydB*, das espécies de SCN, gerado pela análise de Neighbor Joining e pela correção de Juker Cantor no programa CLC Sequence View 7, as espécies foram separadas de acordo com sua semelhança em grupo, espécies demonstrada por colchetes apresentariam semelhanças acima de 95%.23
- Figura 3.** Curvas sigmóides representativas das reação de amplificação dos iniciadores. Reações positivas fora aquelas que possuem leituras acima do valor de *ct* e entre os ciclos 10 a 25.25
- Figura 4.** Curvas de Melting demonstrando os diferentes padrões de dissociação obtidos das amostras na PCR em tempo real. Resultados positivos são aquelas cuja curva apresenta mesmo comportamento que o resultado positivo, neste caso as curvas em vermelho.25
- Figura 5.** Representação do resultado da procura do produto sequenciado da PCR em tempo real do gene da citocromo oxidase do *S. agnetis* no banco de dados genômicos.26
- Figura 6.** Perfil cromatográfico do sequenciamento dos produtos de PCR em tempo real.27
- Figura 7.** Gráfico representando a comparação entre as regiões codificadoras CDS vs CDS (A) do *S. agnetis* e o *S. hyicus* . As regiões em vermelho apresentam semelhança >95%. A representação circular entre composição de nucleotídeos DNA vs DNA (B), as regiões em azul representam semelhanças de 82% a 88%.29
- Figura 8.** Representação gráfica de genomas linearizados de *S. agnetis* obtidos neste estudo e a cepa *S. agnetis* 970 no GenBank. Blocos com a mesma coloração representam regiões homólogas entre os genomas, Regiões divergentes ou ausentes

estão representadas por falhas de coloração ou pela ausência de bloco no outro genoma correspondente (setas).....30

Figura 9. Representação gráfica de genomas linearizados de *S. hyicus* obtidos neste estudo e a cepa *S. hyicus* ATCC 12249 no GenBank. Blocos com a mesma coloração representam regiões homologas entre os genomas, Regiões divergentes ou ausentes estão representadas por falhas de coloração ou pela ausência de bloco no outro genoma correspondente (setas).....31

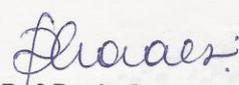
Figura 10. Resistência dos SCN isolados de amostras de leite bubalino frente aos princípios ativos antimicrobianos.....37

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 02663/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Detecção de fator de virulência em *Staphylococcus coagulase negativo* e *Streptococcus agalactiae* provenientes de amostras de leite bubalino**", sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Luiz Francisco Zafalon está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

1 INTRODUÇÃO

O interesse pela criação de bubalinos no Brasil tem crescido muito, movido principalmente pelo interesse na produção de leite e produtos lácteos dessa espécie animal (MADELLA-OLIVEIRA et al., 2005), aliados a sua maior rusticidade e capacidade de adaptação para sobreviver a ambientes nos quais os bovinos teriam mais dificuldade. Entretanto, os bubalinos assim como os bovinos e caprinos são susceptíveis à mastite, enfermidade que acarreta perdas econômicas relevantes e é causada principalmente por microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp.

O processo de identificação dos *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) é um processo lento e a organização do gênero foi realizada nos anos 1970 e 1980, com subsequente introdução de novas espécies e subespécies (DEVRIESE; DE KEYSER, 1980; WATTS; NICKERSON, 1986). Os testes atuais são baseados em testes bioquímicos caros e imprecisos (MEUGNIER et al., 2000; THORBERG; BRÄNDSTRÖM, 2000). Neste quesito, as técnicas moleculares, embora sejam pouco utilizadas como padrões para a identificação das espécies de estafilococos (BRITTEN, 2012) são mais vantajosas por proporcionarem rapidez e especificidade na identificação dos microrganismos.

Outra técnica utilizada para a identificação das espécies é a Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser. Baseada na diferença do perfil proteico dos microrganismos (BIZZINI; GREUB, 2010; BENAGLI et al., 2011; TOMAZI et al., 2014), o qual vem sendo utilizada em medicina humana para diagnóstico microbiológico, por ser considerada um método alternativo fácil, rápido e específico (SPANU et al., 2011; MATSUDA et al., 2012). Entretanto, poucos são os estudos que avaliaram sua eficácia (BARREIRO et al., 2010; TOMAZI et al., 2014) em microrganismos isolados de animais.

Os SCN podem produzir enterotoxinas (RAPINI; CERQUEIRA; CARMO, 2005) que são resistentes à proteólise enzimática, resistentes ao tratamento térmico e não perdem atividade biológica (CUNHA; CALSOLARI, 2007), tornando-se um risco para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública (SIMEÃO DO CARMO et al., 2002). Além disso, SCN tendem a ser mais resistentes aos antimicrobianos que *S. aureus* e facilmente desenvolvem multirresistência (LUCHEIS, 2011).

Portanto, este estudo tem como objetivo caracterizar SCN isolados em ambiente de ordenha e de leite bubalino, principalmente quanto ao uso de técnicas para a identificação das espécies, presença de genes de virulência e a resistência a antimicrobianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bubalinocultura, produção de leite e derivados

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é uma espécie originária da Ásia, que se difundiu para praticamente todos os continentes (RODRIGUES et al., 2008). Os primeiros animais foram introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, devido mais pelo seu exotismo do que pelas suas qualidades zootécnicas (BERNARDES, 2007). Quatro raças de búfalo doméstico são encontradas e oficialmente reconhecidas no Brasil: Jafarabadi (corte e leite), Murrah (mais eficiente na produção de leite), Mediterrâneo (com característica de animal de dupla aptidão, com tendência leiteira) e Carabao, raramente usada para a produção de leite (MEDEIROS et al., 2011).

A produção de leite de búfala ocupa o segundo lugar em importância, depois do leite de vaca, seguido pelo de cabra e o de ovelha (GISELE DELA RICCI et al., 2012). O leite bubalino é superior ao leite bovino em sua constituição, sendo mais concentrado, com valores de lipídeos, proteínas, lactose, sólidos totais e minerais que superam consideravelmente os do leite de vaca (MADELLA-OLIVEIRA et al., 2005). Porém, a produtividade de leite bubalino no Brasil é baixa, geralmente, 6 litros/animal em lactação (270 dias), isto devido à falta de suplementação alimentar e ao lento processo de seleção dos animais (BASTIANETTO, 2005).

A bubalinocultura cresceu muito no Brasil devido ao interesse pela produção leiteira para elaboração de derivados lácteos (BUZI et al., 2009). Existem pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite no Brasil, que transformam anualmente 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados (ANDRADE et al., 2011). O leite de búfala apresenta teores de sólidos que superam consideravelmente os do leite da fêmea bovina. Dessa forma, seu aproveitamento na indústria de lácteos é superior, superando o rendimento do leite bovino em mais de 40% (ANDRADE et al., 2011). Os derivados, do leite de búfala, em especial a mozzarella e a ricota, são procurados não só por seu sabor característico, mas também por suas qualidades nutricionais (TEIXEIRA; BASTIANETTO; OLIVEIRA, 2005).

2.2 Microbiologia do leite bubalino

As características microbiológicas do leite de búfala ainda são pouco conhecidas. O hábito dos bubalinos de imergir em lagos a procura de conforto térmico e para se livrar de ectoparasitas (TEIXEIRA; BASTIANETTO; OLIVEIRA, 2005) pode resultar em contaminação futura do leite. Alguns autores relataram a alta presença de organismos mesófilos no leite de búfala *in natura* (CUNHA NETO et al., 2005). Segundo estes autores, a presença de microrganismos mesófilos no leite de búfala *in natura* varia de acordo com a estação do ano. Uma alta contagem de microrganismos resulta em risco potencial para a saúde pública (GISELE DELA RICCI et al., 2012).

A presença de microrganismos no úbere pode ocasionar a mastite, caracterizada pela inflamação da glândula mamária (NETO; ZAPPA, 2011). Autores observaram que os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* representaram 73,6% dos isolamentos bacteriano obtidos de rebanhos bubalinos pertencentes a 133 vilas, em três meses de coleta, no distrito de Faisalabad, da província de Punjab no Paquistão (ALI et al., 2008). Langoni et al. (2001) observaram que a associação mais frequente no isolamento microbiológico em amostras de leite bubalino no município de Sarapui, Estado de São Paulo, era de *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae* (40,0%), enquanto que Medeiros et al. (2011) encontram 21,8% de frequência de isolamentos de SCN em leite de búfalas proveniente de rebanhos nos estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia e Ceará, com contagem de células somáticas (CCS) acima de 400.000 células/mL.

2.3 Mastite em bubalinos

Apesar da rusticidade do búfalo, esses animais apresentam os mesmos problemas sanitários dos bovinos, dentre eles a mastite (SOLLECITO; LOPES; LEITE, 2011). Esta enfermidade caracteriza-se por uma inflamação da glândula mamária que pode apresentar-se na forma subclínica, sem causar alterações visíveis no úbere e no leite, entretanto com a presença do patógeno dentro da glândula mamária. A CCS é usada para avaliar o número de leucócitos e células epiteliais que são eliminadas no leite durante a lactação. Pode ser elevada pela introdução e multiplicação de

microrganismos patogênicos (MEDEIROS et al., 2011). Entretanto o padrão de CCS para bubalinos é diferente do de bovinos e, dessa forma, valores baixos de CCS em bubalinos não indica necessariamente ausência de infecção intramamária (CARVALHO et al., 2007). Além disso, particularidades como: maior concentração de pigmentos de melanina, canal do teto mais espesso, camada muscular com maiores tónus, um diâmetro menor do lúmen do canal do teto (UPPAL et al., 1994), tipo de células e grau de atividade celular intramamária (DELLA LIBERA et al., 2004), maior atividade da enzima lactoperoxidase e maior concentração de lactoferrina no leite (KAPRONEZAI, 2004) contribuem para reduzir a frequência de infecções intramamárias em búfalo.

Diversas espécies de SNC são associadas a bovinos (VANDERHAEGHEN et al., 2014) e também a bubalinos (CUNHA et al., 2006a; MEDEIROS et al., 2013). Estas espécies podem estar relacionadas ao ambiente e/ou ao hospedeiro. As espécies frequentemente encontradas no ambiente são *Staphylococcus equorum* e o *Staphylococcus fleurettii* (DE VISSCHER et al., 2014), por outro lado o SNC mais adaptado para sobreviver no úbere é o *Staphylococcus chromogenes* (FRY et al., 2014). Este é considerado um dos principais causadores de infecções intramamárias (PARK et al., 2011), ocasionando leve a moderado aumento na contagem de células somáticas (TOMAZI et al., 2015). É importante salientar que nem todas as espécies de estafilococos coagulase negativa exibem o mesmo grau de patogenicidade (SUPRÉ et al., 2011). Alguns autores sugerem que vacas com infecções por SCN apresentaram maior produção de leite do que vacas não infectadas, sugerindo que vacas infectadas com SCN seriam menos susceptíveis a infecções naturais por agentes maiores de mastite (SCHUKKEN et al., 2009; PARADIS et al., 2010; PIEPERS et al., 2013) sugerindo um status de “defensor” da glândula mamária.

2.4 Fatores de virulência dos estafilococos

Três grupos de fatores de virulência estão envolvidos nas infecções estafilocócicas: proteínas secretadas (superantígenos, citotoxinas e enzimas), proteínas ligadas à superfície (adesinas) e proteínas de parede celular (cápsula e ácidos teicóicos) (VANDERHAEGHEN et al., 2014). Estes fatores de virulência

exercem diferentes funções na patogênese bacteriana: adesão aos tecidos do hospedeiro, como por exemplo a proteína expressa pelo gene *fib* (proteína ligada a fibrinogênio) e as proteínas ligadas à fibronectina pelos genes *fnbA/fnbB*; invasão e/ou inibição dos mecanismos de defesa do hospedeiro, como por exemplo a produção de hemolisina pelo gene *hla*, estafiloquinase e leucotoxinas; degradação dos tecidos do hospedeiro, como por exemplo lipases, proteases, hialuronidases e proteínas sequestradoras de ferro (ATANASOVA et al., 2011). As enterotoxinas, toxina do choque tóxico e toxinas esfoliativas são consideradas uma classe especial de superantígenos que exercem diversas funções no organismo hospedeiro, incluindo a de imunossupressão (SEO et al., 2007).

Outro fator de importância nas infecções estafilocócicas é a habilidade dos microrganismos de produzir biofilme. Estudos demonstram que células bacterianas organizadas em biofilme tornaram-se 10 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes microbianos (HØIBY et al., 2010; SHAFABI; VAFAI, 2010; ANTUNES et al., 2011; COSTA et al., 2014). A formação de biofilme também está associada ao estabelecimento e manutenção dos SCN causando infecções intramamárias persistentes (CLUTTERBUCK et al., 2007). Os genes envolvidos na formação de biofilme estão, nos estafilococos, localizados no loci *ica* (*icaADBC*) (OLIVEIRA et al., 2006). Outros genes também associados são: *aap* codificando uma proteína associada à acumulação, *bap* codificando uma proteína associada ao biofilme, *embp* codificando uma proteína ligada a matriz extracelular, *spa* codificando a proteína A, *fnbB* codificando proteínas A e B ligadoras de fibrinogênio, entre outras (VANDERHAEGHEN et al., 2014).

Tabela 1. Principais fatores de virulência dos estafilococos.

Gene	Proteína	Função
<i>eno</i>	proteína ligadora de laminina	Adesina específica para a laminina
<i>fib</i>	Fator de agregação plaquetária B	Adesina específica para o fibrinogênio
<i>fnbpA</i>	Proteína A de ligação à fibronectina	Adesina específica para a fibronectina
<i>fnbpB</i>	Proteína B de ligação à fibronectina	Adesina específica para a fibronectina
<i>cna</i>	Adesão ao colágeno	Adesina específica para o colágeno

Continuação		
<i>ebps</i>	Proteína ligadora à elastina	Adesina específica para a elastina
<i>sea, seb sec sed see, seg, seh, sei e sej...seq</i>	Enterotoxina A, B, C, D, E, G, H, I e J...Q	Exotoxinas com atividade superantígeno
<i>Tsst</i>	Toxina de choque tóxico	Exotoxinas com atividade superantígeno
<i>eta e etb</i>	Toxina esfoliativa A e B	Exotoxinas com atividade superantígeno
<i>mecA</i>	Proteína PBP2A	Baixa afinidade pelos β -Lactâmicos

Adaptado de (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009; PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)

2.5 Resistência dos SCN aos antimicrobianos

As bactérias podem adquirir resistência aos antimicrobianos por meio da produção de enzimas que degradam e/ou acarretam modificação dos sítios dos antibióticos e mudanças na permeabilidade da parede celular (VERRAES et al., 2013). Os SCN são considerados reservatórios para genes de resistência antimicrobiana, principalmente por ocorrerem seleções quando os antibióticos administrados terapeuticamente atingem baixas concentrações na pele (PERRETEN et al., 1998). Neste sentido, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. caprae*, *S. sciuri* e *S. capitis* resistentes a antibióticos foram encontrados na pele dos animais e podem contaminar o leite e a carne, sendo inclusive isolados em alimentos fermentados fabricados a partir destas matérias primas (PAMUK; EKER; YILDIRIM, 2010). Estes genes de resistência podem ser transferidos entre os estafilococos de origem animal para estafilococos que causam infecções em humanos (PAMUK; EKER; YILDIRIM, 2010) por transferência lateral de genes, ou por meio de elementos móveis como plasmídeos, fagos ou transposons (MALACHOWA; DELEO, 2010).

2.6 Identificação das espécies do gênero *Staphylococcus*

Estudos sugerem que métodos de rotina para a identificação de *Staphylococcus* spp possuem baixa capacidade de detecção devido a possibilidade de expressão divergente de características fenotípicas de isolados pertencentes a

mesma espécie e também a interpretação subjetiva dos testes (GERAGHTY et al., 2013). Além disso, faltam informações publicadas a respeito da eficiência do uso de kits comerciais para a identificação rotineira de estafilococos (GERAGHTY et al., 2013), contribuindo para necessidade do uso de técnicas moleculares para a correta identificação.

Dessa forma, a análise das sequências dos RNA ribossomal 16S (16S-rRNA) tem sido utilizada para a avaliação taxonômica e filogenética, sendo considerado método de referência para a identificação bacteriana (LANGE et al., 2011). Ensaio moleculares de alguns genes conservados, como por exemplo *gsp60*, 16S, *femA*, *tuf*, *gap*, *soda*, *rpoB* foram utilizados para identificação (GHEBREMEDHIN et al., 2008) de *Staphylococcus* spp. Entretanto, até o presente momento faltam métodos para rápida identificação das diferentes espécies de SCN disponíveis (BLAIOTTA et al., 2010).

A identificação por sequenciamento de diversos genes é, atualmente, o método mais preciso e com uma grande base de dados de referência, sendo considerada como método padrão ouro. Tradicionalmente o alvo padrão de sequenciamento de DNA em bactérias é o gene 16S-rRNA. Estudos recentes confirmaram que o sequenciamento do gene *tuf* é um método preciso para a identificação das espécies de SCN (GHEBREMEDHIN et al., 2008). Blaiotta et al. (2010) revelaram diversidade entre os estafilococos coagulase positivo (SCP) baseado na sequência parcial do gene *kat* para diferenciação dos SCP *S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudomedius*, *S. schleiferi* subsp. *Coagulans*. De forma semelhante, Sasaki et al. (2010) utilizando PCR-multiplex para o gene da termonuclease (*nuc*) conseguiram identificar com sucesso estas mesmas espécies.

Até o presente momento, poucos estudos caracterizam os SCN advindos de bubalinos, com o uso de técnicas de biologia molecular associada à espectrofotometria de massa e ao sequenciamento genômico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Caracterizar os SCN advindos de bubalinos, com o uso de técnicas de biologia molecular associada à espectrofotometria de massa e ao sequenciamento genômico

.

3.2 Objetivos específicos:

- Investigar a presença dos SCN em amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha;

- Caracterizar os isolados de SCN em relação à presença de genes produtores de enterotoxinas, adesinas e resistência a meticilina;

- Avaliar o uso das técnicas de MALDI-TOF MS, PCR em tempo real e sequenciamento na identificação de SCN obtidos de amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha.

- Determinar o perfil de resistência dos SCN isolados de amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha, frente a diversos antimicrobianos disponíveis comercialmente e amplamente utilizados na terapia da mastite bubalina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da propriedade rural e do rebanho

Foram colhidas 320 amostras de leite de quartos mamários de 80 búfalas escolhidas aleatoriamente durante o período de novembro de 2013 a Abril de 2014, 20 amostras de narinas e 20 amostras da boca dos bezerros bubalinos, 16 amostras das mãos dos ordenhadores e 64 amostras de insufladores das teteiras, coletadas durante a ordenha. A propriedade rural a qual as coletas foram realizadas estava localizada no município de Analândia, Estado de São Paulo. O rebanho era constituído por, aproximadamente, 300 animais da raça Murrah, mantidos em regime extensivo de criação e suplementados com polpa cítrica. Cerca de 100 búfalas encontravam-se no período de lactação e eram ordenhadas uma vez ao dia, pela manhã. A ordenha era realizada em sala tipo "tandem", utilizando-se ordenhadeira mecânica com bezerro ao pé.

4.2 Seleção dos animais

Durante o estudo, todos os quartos mamários analisados foram submetidos aos exames de inspeção visual e palpação (RADOSTITS et al., 2007) para a detecção de mastite clínica. Após a estimulação da descida do leite pelo bezerro foi realizada a prova da caneca telada de fundo escuro e o *California Mastitis Test* – CMT (SCHALM; NOORLANDER, 1957) para a detecção de possíveis casos de mastite subclínica. Os resultados do CMT foram classificados de acordo com a intensidade da reação (viscosidade da solução) em: negativo (-), de intensidade leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

4.3 Colheita das amostras

Antes da colheita das amostras de leite para os exames microbiológicos foi realizada antissepsia dos quartos mamários com algodão embebido em álcool 70%. Amostras de 10 mL de leite foram colhidas por meio de ordenha manual de cada

quarto mamário, em tubos tipo Falcon de 15mL esterilizados. Foram coletadas amostras das narinas esquerda e direita, bem como da cavidade bucal dos bezerros bubalinos, por meio de suabes estéreis. Para as coletas de amostras das mãos dos ordenhadores foram seguidas as recomendações de Bresolin; Dall’Stella; Fontoura-da-Silva (2005). Suabes foram friccionados por meio de movimentos circulares na palma de cada uma das mãos e espaços interdigitais dos funcionários antes a lavagem de suas mãos com detergente neutro, com posterior secagem com papel toalha. A coleta de amostras dos insufladores foi realizada segundo McDonald et al.(1993), com modificações, antes da ordenha, por meio da fricção dos suabes em movimentos circulares na porção final de cada um dos insufladores (quatro por cada conjunto de ordenha), em todos os conjuntos de ordenha. Após a coleta, todas as amostras foram acondicionadas e transportadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável até o laboratório para efetivação das análises. Para a contagem de células somáticas (CCS) foram colhidas amostras de 60 mL de leite de cada quarto mamário, em frascos plásticos estéreis contendo bronopol como conservante.

4.4 Contagem de células somáticas (CCS) das amostras de leite bubalino

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada no Laboratório de Fisiologia da Lactação “Lair Antônio de Souza” (LAFLA), da Clínica do Leite, no Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP/Piracicaba, SP, por meio do método de citometria de fluxo em contador automático¹.

4.5 Cultivo e identificação dos microrganismos isolados do leite bubalino

Uma alíquota de 10µL das amostras de leite de cada quarto mamário foi semeada em ágar sangue ovino desfibrinado a 5%, mantidos a 37°C, em condições de aerobiose, com leituras diárias durante 72 horas. Os microrganismos foram identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo no Laboratório de Higiene de Alimentos, do Departamento de Medicina Veterinária

¹ Somacount 300, Bentley Instruments Incorporated, Minnesota, EUA

Preventiva e Reprodução Animal da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal (QUINN et al., 2005).

4.6 Avaliação da Identificação dos isolados de SCN pela técnica de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser em Tempo de Voo

A identificação dos SCN foi realizada utilizando-se a técnica de Espectrofotometria de Massa Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser em Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) por meio de espectrofotômetro (Bruker Daltonics Inc, Billerica, MA, USA) no *Animal Health Laboratory* da *University of Guelph*.

Para isso, colônias puras dos SCN com crescimento em Agar sangue ovino 5% por 24 horas foram transferidas para poços em placa metálica (Microflex LT, Bruker Daltonics/BD, Alemanha, EUA) com 96 poços por meio de de alças descartáveis. Em seguida foram adicionadas 0,5 μ L de Matrix constituída de ácido α -ciano-4hidroxicinâmico (CHCA) e secadas em ar por 1 a 2 min a 24-27°C. Lâmina de aço foi então inserida no equipamento (Bruker Daltonics Inc, Billerica, MA, USA). O espectro de massa gerado foi analisado e comparado com o banco de dados de referência do programa *Biotype* 3.0, sendo caracterizados ao nível de espécies com valores de *logscore* (LS) superiores a 1,99 e ao nível de gênero com valores inferiores a 1,90

4.7 Extração do DNA dos SCN.

Para a extração de DNA, cada colônia de SCN isolada foi repicada em tubos contendo caldo BHI, com posterior incubação a 37°C por 18 horas, em estufa. Utilizou-se o protocolo de Kuramae-Izioka, (1997) para as extrações de DNA. Para isso, 1,0 mL do cultivo bacteriano foi transferido para tubos *ependorf* de 2,0 mL. Os tubos foram centrifugados a 13.400 x g, por 2 minutos e, o *pellet* de células, ressuspendido em 700 μ L de tampão de extração [Tris-HCl 160 mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0, NaCl 20 mM e SDS 0,5% (p/v)], homogeneizados e, mantidos em banho-maria a 65°C, por 40 minutos, período em que eram agitados a cada 15 minutos. Acrescentou-se 300 μ L de acetato de potássio 5 M, homogeneizado e incubado em banho de gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 15 minutos. Após 30 minutos de

incubação, as amostras foram retiradas do gelo e foram acrescentados 650 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico, na concentração de 24:1. A solução foi misturada por inversão durante dois minutos e novamente centrifugada a 13.400 x g, por 10 minutos à 10°C. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos tubos. Em seguida, o DNA foi precipitado por adição de 1000µL de etanol absoluto gelado. A solução foi misturada e mantida em freezer à -20°C *overnight* para a precipitação do DNA em etanol. Os tubos foram centrifugados à 13.400 x g, por 17 minutos, à 10°C. Descartada a fase líquida, o *pellet* foi lavado com 1000 µL de etanol 70% (v/v). Realizada uma segunda centrifugação à 13.400 x g por 10 minutos à 10°C, a fase líquida foi novamente descartada e o pellet mantido para secar em estufa à 50°C. Após secagem, o DNA genômico foi ressuscendido em 30 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0). A qualidade e quantidade de DNA foram avaliados por espectrofotometria de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Os valores referentes à qualidade do DNA no intervalo de 1,8 a 2,0, foram considerados como de boa qualidade (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.8 PCR em tempo real de genes de virulência dos SCN

A investigação dos genes foi realizada utilizando-se PCR em tempo real no departamento de *Pathobiology* da *University of Guelph*. A concentração final dos iniciadores foi de 10 pmol/µL em 25 µL de reação contendo 5 µL de DNA, 20 µL de Light Cycler 480 (LC480) Probe Master mix (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN). As amplificações ocorreram nos seguintes parâmetros: um ciclo de 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos consistindo de 95°C por 15s, 55°C por 40 segundos e 72°C por 20s. Os parâmetros da rampa foram de 4,4°C/s, 2,2°C/s e 4,4°C/s, respectivamente. Controles positivos, negativos e somente reação foram incluídos em cada corrida. Uma curva de amplificação em forma de sigmoide que ultrapassasse o padrão de corte (Ct) entre os ciclos 9 e 25 foi considerada como positiva. Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* COL, MW2, NewMan, MU50 como controle positivo para os seguintes genes e iniciadores utilizados neste estudo (Tabela 2).

Tabela 2. - Iniciadores utilizados para investigação de genes codificadores de fatores de virulência em *Staphylococcus* spp isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha.

Categoria	Gene	5'-3'	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referência
Genes de produção de toxinas	<i>tst</i>	F	AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA	306	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG		
	<i>eta</i>	F	CGCTGCGGACATTCTACATGG	676	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	TACATGCCCGCCACTTGCTTGT		
	<i>etb</i>	F	GAAGCAGCCAAAAACCCATCGAA	419	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	TGTTGTCCGCCTTTACCACTGTGAA		
	<i>sea</i>	F	TTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATC	252	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	TGGTGTACCACCCGCACATTGA		
	<i>sec</i>	F	CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA	602	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	CGCCTGGTGCAGGCATCATATC		
	<i>seb</i>	F	GACATGATGCCTGCACCAGGAGA	355	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	AACAAATCGTTAAAAACGGCGACACAG		
	<i>sei</i>	F	GGCCACTTTATCAGGACA	328	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	AACTTACAGGCAGTCCA		
	<i>seq</i>	F	GGAATTACGTTGGCGAA	330	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	AACTCTCTGCTTGACCA		
	<i>sem</i>	F	CATATCGCAACCGCTGA	148	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	TCAGCTGTTACTGTCTGA		
<i>seg</i>	F	GTTAGAGGAGGTTTTATG	198	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)	
	R	TTCCTTCAACAGGTGGAGA			
<i>see</i>	F	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	170	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)	
	R	TAACCTACCGTGGACCCTTC			
<i>eno</i>	F	ACGTGCAGCAGCTGACT	302	(MUNRO et al., 2011)	
	R	CAACAGCATCTTCAGTACCTTC			
<i>ebpS</i>	F	CATCCAGAACCAATCGAAGAC	186	(MUNRO et al., 2011)	
	R	CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG			
Adesão	<i>fib</i>	F	CTACAACACTACAATTGCCGTCAACAG	404	(MUNRO et al., 2011)
		R	GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC		
<i>fnbA</i>	F	GATACAAACCCAGGTGGTGG	191	(ARCIOLA et al., 2005)	
	R	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA			
Resistência a metilina	<i>mecA</i>	F	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA		

4.9 Confecções de iniciadores para identificação das espécies dos SCN e sequenciamento dos produtos de PCR obtidos

Foram utilizados dados disponíveis no banco de dados público *GenBank* sendo os acessos utilizados: *S. capitis*: NZ_GL545272.1, *S. caprae*: GL545272.1, *S. epidermidis*: NZ_JZUL01000001.1-1, *S. warneri* : ACPZ01000027.1-1, *S. pasteurii*: CP004014.1, *S. haemoliticus*: NZ_JFOJ01000002.1, *S. xylosus*: NZ_CP007208.1, *S. saprophyticus* : AP008934.1-1, *S. cohnii* NZ_LAKJ01000008.1, *S. sciuri*: NZ_LDTK01000063.1, *S. chromogenes*: JMJF01000001.1, *S. hyicus*: NZ_CP008747.1, *S. lugunensis*: GL622351.1-1, *S. simulans*: KQ957512.1, *S. hominis*: NZ_AKGC01000038.1-1 e *S. agnetis* NZ_CP009623.1.

As sequências obtidas dos genes *cydB* foram alinhadas e o dendrograma foi gerado por meio do Programa *CLC Sequence View 7*. Em seguida a sequência dos iniciadores foi obtida utilizando-se a ferramenta on-line *Integrated DNA Technologies - IDT* (<https://www.idtdna.com/site>) e a especificidade testada com a ferramenta de alinhamento local de sequências BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de dados disponível para as espécies. Adicionalmente, a detecção do gene *cydB* foi testada por PCR *in silico* por meio do programa <http://insilico.ehu.es/PCR/> para as espécies que possuíam dados disponíveis no programa.

Os produtos da PCR em tempo real foram purificados e sequenciados no *University of Guelph Laboratory services* utilizando-se os iniciadores *forward* e *reverse* específico de cada espécie e os resultados foram novamente comparados com o banco de dados *GenBank* para avaliar a especificidade, sendo considerados específicos os produtos com 97% de similaridade (GEVERS et al., 2005)

4.10 Sequenciamento e montagem do genoma de *Staphylococcus agnetis* e *Staphylococcus hyicus*

Para averiguar que os isolados eram de espécies diferentes, foi realizado o sequenciamento genômico como segue: após a extração de DNA genômico utilizando-se Kit Comercial *QIAamp DNA mini kit* de acordo com as instruções do fabricante, o DNA foi analisado no *University of Guelph Laboratory services* para a produção de biblioteca genômica e sequenciamento utilizando-se a técnica de *Ion*

Torrent. Os resultados do sequenciamento foram montados utilizando-se o programa *SeqManGen DNASTar*, os contigues gerados foram avaliados manualmente e o resultado obtido foi comparado utilizando-se o genoma disponível no *GenBank* através do programa *Progressive Mauve*

4.11 Comparação de genomas com *CCT-View* e *Progressive Mauve*

Os genomas gerados e montados do *S. hyicus* e do *S. agnetis* foram alinhados por meio do programa *CGView Comparison Tool* (GRANT; ARANTES; STOTHARD, 2012) foram apresentados em gráficos circular de semelhança entre o conteúdo da comparação de nucleotídeos (DNA) e de regiões codificadoras (CDS). Além disso, os genomas também foram comparados utilizando-se o programa *Progressive Mauve*.

4.12 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

As linhagens dos microrganismos isoladas foram submetidas à prova de sensibilidade antimicrobiana pelo método de difusão com discos (CLSI, 2005; CLSI, 2006). Foram utilizados princípios ativos de antimicrobianos disponíveis comercialmente e utilizados na terapia da mastite, a saber: clindamicina (02 mcg), vancomicina (30 mcg), cloranfenicol (30 mcg), rifanmpicina (05 mcg), cefepime (30 mcg), oxacilina (01 mcg), penicilina (10 UI), eritromicina (15 mcg), ciprofloxacina (05 mcg), gentamicina (10 mcg), cotrimoxazol (25 mcg) e tetraciclina (30 mcg). A ocorrência de linhagens multirresistentes foi considerada quando ocorreu resistência múltipla (simultânea) para três ou mais dos princípios ativos (FERNANDES et al., 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação prévia de casos de mastite bubalina

Dentre as 320 amostras de leite obtidas, 54 (16,8%) foram reagentes no *California mastitis test*, nenhuma amostra foi positiva ao teste da caneca de fundo escuro. Das 54 amostras positivas ao CMT, 18 (33,3%) apresentaram reações leves (+), 17 (31,5%) reações moderadas (++) e 19 (35,2%) intensas (+++). A média da contagem de células somáticas do total de amostras foi de 224.591 células/mL, a média da CCS das amostras não reativas ao CMT foi de 79.162 células/mL e a média das amostras reativas ao CMT foi de 643.169 células/mL (Tabela 3). Foram observadas amostras de leite não reativas ao CMT com CCS variando de 1.000 a 736.000 células/mL.

Tabela 3. Médias e desvios padrão da CCS (células/mL) no leite de búfalas durante a lactação em relação aos respectivos resultados da intensidade da reação ao teste CMT.

CMT	Média e desvios padrão da CCS (células/mL)	Número de amostras
Não reativo	79.162± 108.597	266
Reação Leve	227.722±141.376	18
Reação Moderada	378.588±250483	17
Reação Intensa	1308.509±1235.644	19

Resultados semelhantes foram observados por Jorge et al. (2005) e Cunha et al. (2006), que encontraram frequência de 17,6% e 20,1% de reações positivas ao CMT em amostras de leite bubalino nos Estados de São Paulo e do Rio Grande do Norte, respectivamente. Ali et al. (2008) observaram 14,4% de reações positivas em rebanhos bubalinos no Paquistão. Entretanto, Kapronezai; Melville; Benites (2005), verificaram 3,80% de reações positivas em amostras de leite bubalino obtidos de fêmeas, em sistema extensivo, no Estado de São Paulo. Estas diferenças podem ser atribuídas às diferentes condições de manejo, maior manipulação da glândula

mamária e ao diferente número de lactações dos animais das propriedades estudadas, uma vez que estes fatores contribuem para a instalação de processo inflamatório de origem infecciosa (BASTOS; BIRGEL, 2011).

Segundo Medeiros et al. (2011), utilizando-se o padrão de bovinos de 400.000 cel/mL como proposto por Piccinini et al. (2006) para glândula mamária sadia de bubalinos, a correlação entre CCS e exame microbiológico apresenta baixa eficiência e acurácia. Neste estudo foram observadas amostras de leite bubalino com reação moderada ao CMT com contagem de CCS inferior a 400.000 cel/mL e amostras de leite com contagens superiores a 600.000 cel/mL proém com reações negativas ao CMT.

Carvalho et al. (2007) relataram que o padrão de contagem de CCS para bubalinos é diferente do normalmente encontrado para bovinos e que os baixos valores de CCS não indicam necessariamente a ausência de infecção intramamária. A presença de mastite subclínica, sem identificação e controle no rebanho bubalino, além de causar prejuízos econômicos ao produtor e constituir uma fonte de infecção para outros animais da propriedade, pode constituir também um problema de saúde pública, devido à possibilidade da transmissão dos patógenos causadores de mastite e de suas toxinas por meio do consumo do leite e produtos lácteos contaminados, acarretando riscos à saúde do consumidor (MARTINS et al., 2010).

5.2 Identificação dos isolados pela Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser em tempo de voo (MALDI-TOF)

Dentre os 108 microrganismos isolados de amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha analisados pela técnica de MALDI-TOF MS, 85 foram identificados com escores superiores a 2,0. Dez foram identificados em nível de gênero com escores logarítmicos entre $>1,70$ e $< 1,9+$ e 13 não puderam ser corretamente identificadas obtendo escores $<1,70$.

De acordo com os resultados de espectrofotometria de massa os seguintes gêneros e espécies foram identificadas com escores logarítmicos $> 1,9$: 44 cepas identificadas ao nível de espécie como *S. chromogenes* (51,8%), uma como *S. saprophyticus* (1,18%), uma *S. caprae* (1,18%), seis *S. epidermidis* (7,06%), duas *S.*

equorum (2,35%), duas *S. haemolyticus* (2,35%), uma *S. hominis* (1,18%), dez *S. hyicus* (11,8%), uma *S. pasteurii* (1,18%), três *S. sciuri* (3,53%), uma *S. warneri* (1,18%), uma *Paenobacillus* spp. (1,18%), uma *Micrococcus luteus* (1,18%), uma *Macrococcus* spp. (1,18%), uma *Macrococcus caseolyticus* (1,18%), três *Kocuris* spp. (3,53%), uma *Kocuria rhizophila* (1,18%), uma *Enterococcus faecalis* (1,18%), três *Corynebacterium* spp. (3,53%), uma *Bacillus* spp. (1,18%). Dez Microrganismos foram identificados em nível de gênero com escore logarítmico entre >1,70 e < 1,99, nove deles pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp e um ao gênero *Corynebacterium* spp.

Tabela 4. Gêneros e espécies dos microrganismos isolados de amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha, identificados pela técnica de MALDI-TOF MS com escores logarítmicos superior a 1,99.

Espécie	MALDI-TOF MS	
	Valor Absoluto	Valor relativo
<i>S. chromogenes</i>	44	51,8%
<i>S. hyicus</i>	10	11,8%
<i>S. epidermidis</i>	6	7,06%
<i>S. sciuri</i>	3	3,53%
<i>Kocuris</i> spp	3	3,53%
<i>Corynebacterium</i> spp.	3	3,53%
<i>S. equorum</i>	2	2,35%
<i>S. haemolyticus</i>	2	2,35%
<i>S. saprophyticus</i>	1	1,18%
<i>S. caprae</i>	1	1,18%
<i>S. hominis</i>	1	1,18%
<i>S. pasteurii</i>	1	1,18%
<i>S. warneri</i>	1	1,18%
<i>Paenobacillus</i> spp.	1	1,18%
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1,18%
<i>Macrococcus</i> spp	1	1,18%
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	1	1,18%
<i>Kocuria rhizophila</i>	1	1,18%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1,18%
<i>Bacillus</i> spp.	1	1,18%
Total	85	100%

A análise proteômica proveniente da espectrofotometria de massa se mostrou eficiente para a determinação dos microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp., visto que todos os microrganismos deste gênero identificados foram confirmados pelo iniciadores *TstagG422* e *TstagG765* (MOROT-BIZOT; TALON; LEROY, 2004), específico para o gene *tuf*, como aqueles pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. e para as espécies identificadas neste estudo, exceto para *S. agnetis*.

S. agnetis foram erroneamente identificados como *S. hyicus* pela técnica de MALDI-TOF MS visto que nenhum dos isolados apresentou amplificação dos produtos de PCR aos iniciadores específicos para esta espécie para o gene *cydB*. O sequenciamento de DNA genômico de um microrganismo representante de cada espécie e o sequenciamento dos produtos de PCR em tempo real confirmaram estes resultados.

Segundo Tomazi et al. (2014), os resultados de espectrofotometria de massa concordaram em 95,4% dos resultados obtidos por PCR-RFLP. A técnica de MALDI-TOF MS permite a identificação rápida dos microrganismos, permitindo uma rápida mudança de manejo (TOMAZI et al., 2014). Por outro lado, Abdulwahab et al. (2015) verificaram que a técnica de MALDI-TOF MS identificou corretamente 99,2% dos isolados obtidos de vias respiratórias de casos clínicos humanos ao nível de gênero, e 95,9% ao nível de espécie. No presente estudo a identificação dos estafilococos de amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha ao nível de gênero concordou em 100% com os resultados da PCR em tempo real e em 89,9% ao nível de espécie.

Estes achados são semelhantes aos encontrados com 108 SCN obtidos de amostras de infecção intramamária bovina, em estudo realizado por Tomazi et al. (2014), onde observaram 95,4% de concordância entre o MALDI-TOF MS e a PCR-RFLP do gene *groEL*. Entretanto, para estes autores, problemas de identificação ocorreram para os *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*. Em outro estudo, Zhu et al. (2015) observaram que das 216 amostras de estafilococos identificados por MALDI-TOF MS, testes bioquímicos e por sequenciamento de 16S rRNA, 75% dos *S. sciuri* e 60% dos *S. caprae* produziam baixos (<2,0), porém precisos, escores no programa *Biotype*. Resultados semelhantes foram observados na identificação de 218 isolados de amostras de casos clínicos humanos (NORI et al., 2013). Esta distribuição de

baixos escores no programa *Biotype* parece ser espécie dependente (ZHU et al., 2015)

Neste quesito, a relevância dos SCN na saúde do úbere já foi estudado ao longo dos anos e, tópicos acerca do impacto na CCS dos quartos e o potencial para causar infecção intramamária persistente são controverso (VISSCHER, 2016). Assim, análises espécies específicas relevam diferenças entre o potencial patogênico na infecção intramamária pelos SCN (SUPRÉ et al., 2011). *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus* causam elevação significativa na CCS não diferente dos *S.aureus* (SUPRÉ et al., 2011) sugerindo que estas espécies são mais relevantes na infecção intramamária do que outras. Desta forma sugerindo que a prevenção das infecções intramamárias pelos SCN deveriam focar nestas “espécies mais relevantes”(VISSCHER, 2016).

Estudos realizados por vários autores mostram que a correta identificação de microrganismos pela técnica de MALDI-TOF MS varia de 74,2% a 99,3% (DUPONT et al., 2010; SPANU et al., 2011; LOONEN et al., 2012). A variabilidade da identificação dos SCN pode ser atribuída às diferenças nas condições de crescimento, preparo das amostras, número de referências utilizadas, versão do programa e delineamento experimental (LOONEN et al., 2012; TOMAZI et al., 2014).

5.3 Identificação dos estafilococos por RT-PCR

O gene da citocromo oxidase subunidade D II (*cydB*) foi escolhido para a identificação dos SCN por ser um gene conservado, mas que apresenta pequenas alterações em sua sequência de nucleotídeos que permitiram a confecção de iniciadores específicos para as espécies de estafilococos isoladas (VOGGU et al., 2006). As sequências obtidas do *cydB* no GenBank foram alinhadas e regiões conservadas e regiões com diversidade foram encontradas (Figura 1).

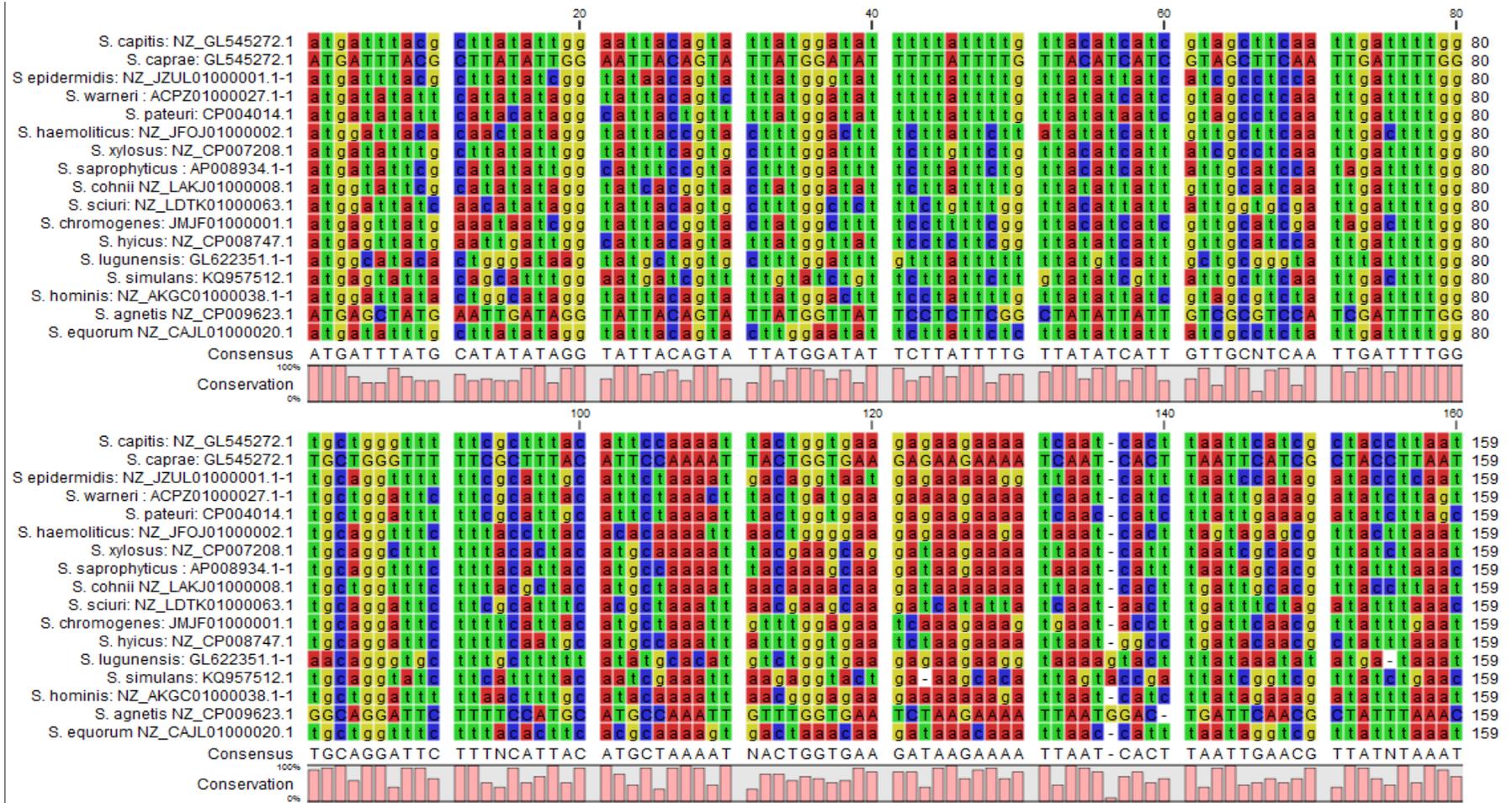


Figura 1. Alinhamento das sequências do gene *cydB* dos SCN, a linha contínua representa a sequência de nucleotídeos presentes no gene, espaços representam gaps (inserções para que nucleotídeos semelhantes possam ser alinhados), e a conservação dos nucleotídeos entre as espécies são representadas por barras abaixo do alinhamento.

Estas características tornaram possível utilizar este gene como possível marcador de a identificação das espécies . Por ser um gene conservado, estaria presente em todos os isolados pertencentes ao gênero *Staphylococcus spp* e as regiões que possuem diversidade foram utilizadas como alvos.

O uso de genes conservados e ubíquos para confecção de iniciadores espécie específicos já foi realizado anteriormente por meio do gene *sodA*, para os *S. capitis*, *S haemolyticus* e *S. warneri* demonstrando que a identificação por PCR em tempo real com iniciadores espécie específicos pode fornecer uma alternativa simples, sensível e específica (IWASE et al., 2007). Apesar do gene 16S rRNA ser geralmente o alvo para o *design* de iniciadores espécie específicos, a utilização deste gene se torna mais difícil devido as sequências de nucleotídeos de genes homólogos, ou seja, aqueles que a sua sequência de DNA deriva de uma origem comum, podendo ou não ter a mesma função, são similares. Portanto, apesar de técnicas como a ribotipagem e a PCR do espaço interno transcrito e diversos outros métodos já terem sido estudados em estafilococos, o desenvolvimento de iniciadores para a identificação das espécies , sem a necessidade de sequenciamento para uso em PCR quantitativa tem se provado difícil (IWASE et al., 2007).

A construção de um dendrograma de semelhança entre as espécies foi feita para identificar quais seriam genotipicamente próximas e poderiam resultar em reações falso positivas (Figura 2). De fato, os resultados do dendrograma mostraram que as cepas de *S. saprophyticus* e *S. xylosus*, *S. hominis* e *S haemolyticus*, *S. caprae* e *S. captis* poderiam ser erroneamente identificadas entre si por técnicas moleculares devido à grande proximidade entre si (>95%). Por outro lado, a análise do alinhamento juntamente com as informações do dendrograma permitiram a confecção dos iniciadores utilizando a ferramenta online *IDT Integrated DNA technology* que forneceu as sequências de iniciadores para cada espécie (Tabela 4), as quais foram testadas individualmente para especificidade e sensibilidade com o banco de dados GENBANK.



Figura 2. Dendrograma representativo do gene *cydB*, das espécies de SCN, gerado pela análise de *Neighbor Joining* e pela correção de Juker Cantor no programa *CLC Sequence View 7*, as espécies foram separadas de acordo com sua semelhança em grupo, espécies demonstrada por colchetes apresentariam semelhanças acima de 95%.

Tabela 5. Sequências de nucleotídeos e tamanho do produto gerado do gene *cydB* pelos Iniciadores desenhados e utilizados neste estudo para identificação dos SCN por PCR em tempo real.

Gene	Oligonucleotideo	Sequência (5'-3')	Produto
<i>S. caprae</i>	Forward	ACGCAAGTAAAGCACAAAGATAAG	206
	Reverse	CGTTAAAGCACCTGCAATTAGG	
<i>S. epidermidis</i>	Forward	GGCTGTTAATTCCAGCTTCTCT	235
	Reverse	TGCCATTGTCGTGTCATATCAT	
<i>S. warneri</i>	Forward	AAAGGATGAACCGGCATATCA	268
	Reverse	ACCATATCCAAAGAATGCGAATAAC	
<i>S. pasteurii</i>	Forward	GTTTGGGAAGTAACCAACGTATTT	229
	Reverse	ATGCAGCCGGAATCAACA	
<i>S. haemolyticus</i>	Forward	GCATGGTCAGTCGTCTTTCT	420
	Reverse	GCCCATTGAAGCATTAAACACC	
<i>S. xylosus</i>	Forward	GTACGGCATTGCTGGATTATTG	282
	Reverse	GATACTGCGATCATAGGTGCTC	
<i>S. saprophyticus</i>	Forward	GCCAGCCTCTATCGCTTTAATA	250
	Reverse	CGCTAAGAATACGACTGACCAA	
<i>S. sciuri</i>	Forward	TACAGTGCTTTGGCTCTTTCT	430
	Reverse	GTGAACGCCATCACTTGTTTC	
<i>S. chromogenes</i>	Forward	CGCGTGGATTTAGACTGGATAG	304
	Reverse	CTGCCACGAAGAATGCAATTAG	
<i>S. hyicus</i>	Forward	CTCTTGATACCCGCTTCGTTAT	210
	Reverse	TTCGCCATCTTTAGCTCTATGG	
<i>S. hominis</i>	Forward	CACTCGCAACTGTATTGACTATCT	226
	Reverse	CAGAACATAAACCATTGACGCATAA	
<i>S. equorum</i>	Forward	TCCCTGATGCAGCGAAATAC	293
	Reverse	AACGGCTAAGAATACGACAGAC	
<i>S. agnetis</i>	Forward	CGCATAGAGCCAAAGATGAAGA	204
	Reverse	ACGTTAGGATTCCC GCAATTAG	

Em seguida, foram conduzidas reações em cadeia da polimerase das diversas espécies utilizando-se com base os resultados obtidos por espectrofotometria de massa. Reações positivas foram observadas por cada um dos pares de iniciadores com a espécie ao qual foi desenhado. Com exceção dos microrganismos pertencentes ao *S. hyicus*, os demais microrganismos mostraram resultado positivo com curva de amplificação característica entre os ciclos 10 a 25 (Figura 3), com curvas de dissociação dentro do padrão esperado (Figura 4). Os isolados de *S. hyicus* apresentaram amplificação para os iniciadores da espécie *S. agnetis*. Para avaliar a possibilidade de reação falso-positiva devido as duas espécies apresentarem alta

proximidade no dendrograma, foi realizada a análise dos dados obtidos pelo sequenciamento dos produtos de iniciadores. Esta análise baseou-se no resultado da pesquisa deste sequenciamento do produto da PCR em tempo real, contra o banco de dados GENBANK pela ferramenta BLAST (Figura 5).

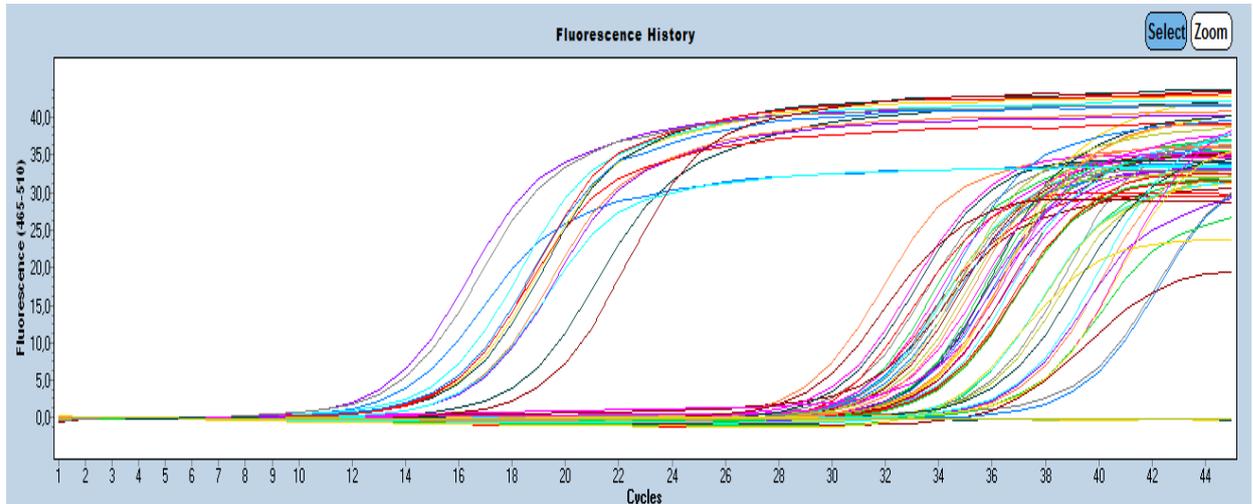


Figura 3. Curvas sigmóides representativas das reação de amplificação dos iniciadores. Reações positivas fora aquelas que possuem leituras acima do valor de ct e entre os ciclos 10 a 25.

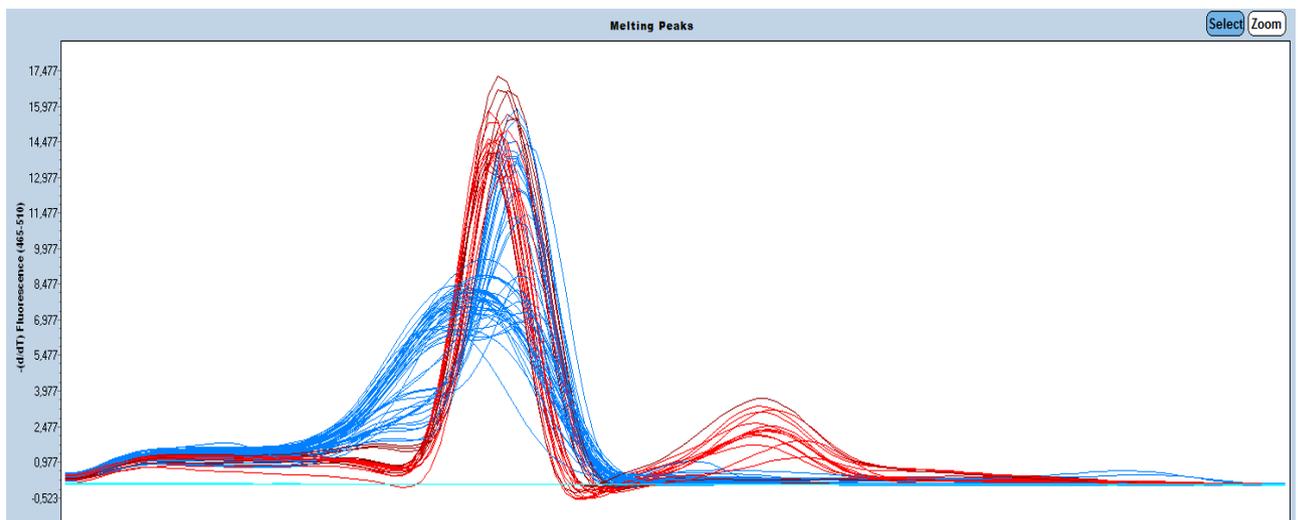


Figura 4. Curvas de *Melting* demonstrando os diferentes padrões de dissociação obtidos das amostras na PCR em tempo real. Resultados positivos são aquelas cuja curva apresenta mesmo comportamento que o resultado positivo, neste caso as curvas em vermelho.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Staphylococcus agnetis strain 908, complete genome	292	292	100%	1e-75	100%	CP009623.1

Figura 5. Representação do resultado da procura do produto sequenciado da PCR em tempo real do gene da citocromo oxidase do *S. agnetis* no banco de dados genômicos.

Os resultados do sequenciamento obtidos para cada iniciador foram avaliados individualmente, quanto à qualidade por meio do programa *Cromas Lite 2.1*, pela avaliação de seu padrão cromatográfico a procura de picos conflitantes. A presença de dois picos em um mesmo local indicaria pouca confiança na predição dos nucleotídeos (Figura 6)

Os iniciadores utilizados apresentaram padrão cromatográfico satisfatório e suas sequências de nucleotídeos foram então submetidos a uma busca como a descrita a seguir: a sequência de nucleotídeos obtida foram pareadas com os dados de *Whole shotgun sequence* (WGS), caso não houvesse dados de mapeamento completo de genoma disponível, ou *Genome sequence* caso houvesse. Na figura 7, o resultado da pesquisa junto ao banco de dados demonstrou 99% de cobertura e 99% de identidade para os dados disponíveis do genoma e do gene da citocromo oxidase conhecidos de *Staphylococcus chromogenes* MU 970 SCHR. Desta forma, embora a técnica de MALDITOF MS seja rápida e eficiente na identificação dos estafilococos, a associação dos seus resultados com os das técnicas moleculares ainda é necessária para que os bancos de dados sejam corretamente preenchidos com o perfil proteico de cada espécie para um correto diagnóstico definitivo sem a necessidade do uso de técnicas moleculares.

Neste estudo, as diferenças entre a composição de nucleotídeos do gene *cydB* permitiram a confecção de iniciadores seletivos para a identificação de SCN. A presença de regiões não pareadas em genes são frequentemente usadas para identificação das espécies (AYYADEVARA; THADEN; SHMOOKLER REIS, 2000; PAPP et al., 2003). De forma semelhante, Iwase et al. (2007) obtiveram sucesso no *design* de iniciadores para a identificação das espécies *S. capitis*, *S. haemolyticus* e

S. warneri pela PCR em tempo real usando SYBR Green. Este método permite a detecção direta e quantificação dos produtos de PCR através do aumento da fluorescência causada pela junção do corante SYBER Green com a dupla fita de DNA (ARYA et al., 2005).

A identificação rápida e precisa dos SCN torna-se ainda mais importante devido ao fato de que a maioria das infecções intramamárias em bovinos, causadas pelos *S. chromogenes*, *S. epidermidis* e *S. simulans* são persistentes, de forma oposta o *S. heamolyticus* e *S. xylosus* causam IMI de forma transitória (THORBERG et al., 2009). Além disso, Piessens et al., (2011) e Sawant; Gillespie; Oliver, (2009) asseguram que o ambiente é o reservatório para os SCN sugerindo que a mastite causada por eles pode ser considerada como de origem ambiental. Além disso a recente observação de cepas de SCN com a capacidade de coagular plasma de coelho (LANGE et al., 2016) colabora com a afirmação de possível erro diagnóstico com *S. aureus*.

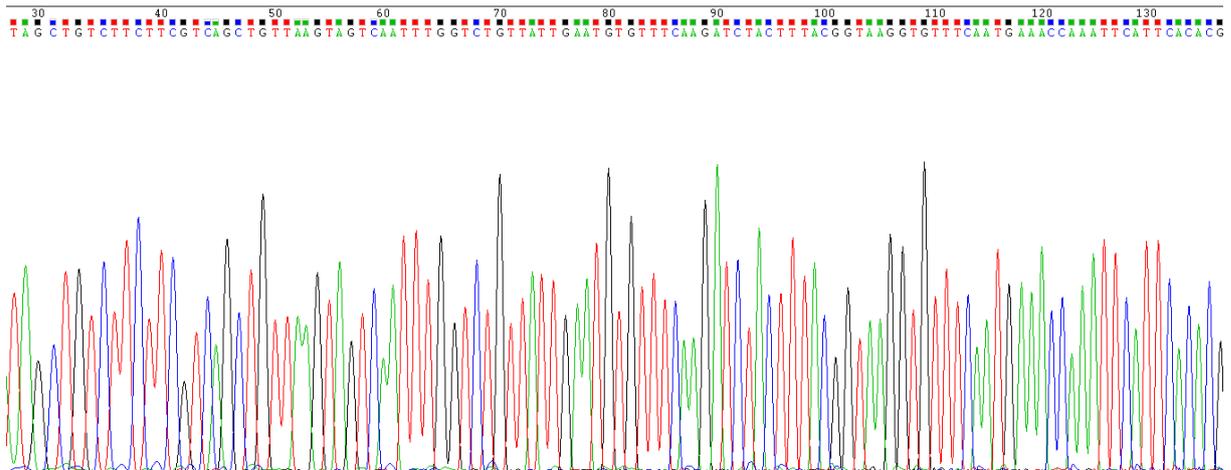


Figura 6. Perfil cromatográfico do sequenciamento dos produtos de PCR em tempo real.

5.4 Comparação de genomas entre o *S. agnetis* e o *S. hyicus*

Devido aos resultados conflitantes da identificação das espécies pelo MALDI-TOF MS e pelos iniciadores da PCR em tempo real, foi realizado o sequenciamento do DNA genômico, cujos resultados obtidos pela comparação entre composição de nucleotídeos (DNA vs DNA) mostrados na representação circular dos genomas e o

perfil das regiões codificadoras (CDS vs CDS) gerado pelo programa *CCT View*, demonstram que estes dois microrganismos possuem diferenças marcantes com relação a seu genoma demonstrados pela área em azul (82% a 88% de similaridade). Entretanto são semelhantes no que tange a seu conteúdo de regiões codificadoras (CDS), representado pela cor vermelha (Figura 7) que mostra semelhança de >90% entre esses microrganismos. O que coincide com os dados obtidos pela espectrofotometria de massa e da biologia molecular através da PCR em tempo real.

O sequenciamento completo do genoma (WGS) é uma ferramenta poderosa para obter uma quantidade maior e mais detalhada de informações para comparação entre dois ou mais genomas bacterianos. Entretanto, poucos sequenciamentos completos de genoma para algumas espécies de SCN estão disponíveis. Visto que a diversidade dos estafilococos deve-se principalmente ao polimorfismo que ocorre em ilhas de patogenicidade (regiões cromossômicas que foram adquiridas por transmissão horizontal), as quais carregam diversos genes, como genes de virulência e resistência antimicrobiana (GIRISH NAIR; KAUR, 2016), a falta destes sequenciamentos dificulta o uso de ferramentas de bioinformática para o entendimento da evolução dos mecanismos de adaptação e patogenia destes microrganismos. Além disso, alguns genes como o da coagulase, estão localizados fora de ilhas de patogenicidade e são conhecidos por serem polimórficos (WATANABE et al., 2005; BABA et al., 2008).

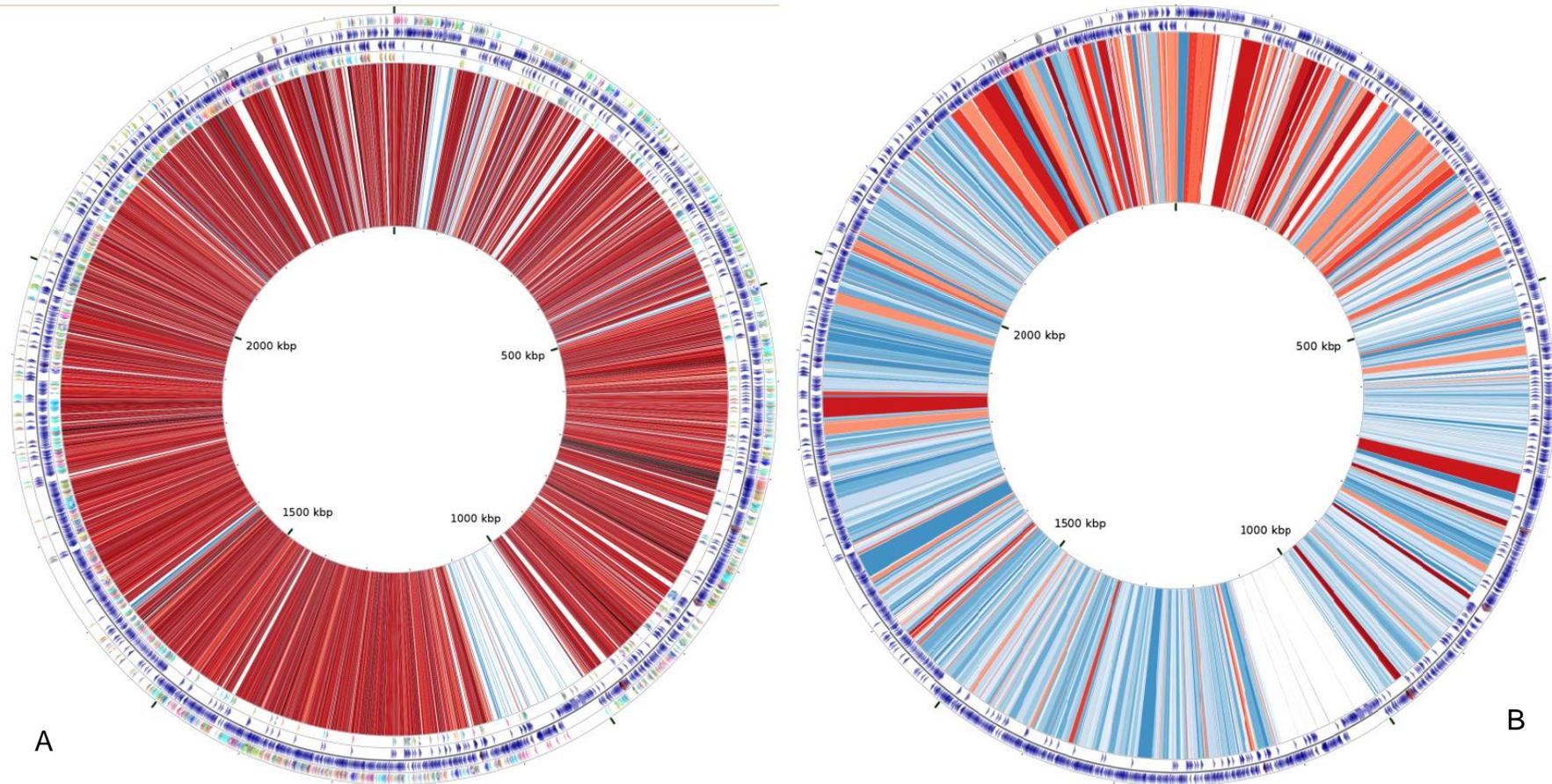


Figura 7. Gráfico representando a comparação entre as regiões codificadoras CDS vs CDS (A) do *S. agnetis* e o *S. hyicus*. As regiões em vermelho apresentam semelhança >95%. A representação circular entre composição de nucleotídeos DNA vs DNA (B), as regiões em azul representam semelhanças de 82% a 88%.

5.5 Sequenciamento de DNA genômico do *S. agnetis* e do *S. hyicus*

A análise dos dados brutos obtidos do sequenciamento genômico da cepa de *S. agnetis* foi montada utilizando o programa *DNASTAR SeqMan NGen 12* em 90 *contigs* com mais de 2 Kb, tais contigues foram avaliados manualmente para remover os finais com baixa cobertura dos terminais 5' e 3', e novamente remontados em 50 contigues que se sobreescreviam com 95% de identidade. Esta sequência final foi comparada com a sequência disponível e conhecida.

Os dados foram alinhados com o genoma disponível e conhecido de *S. agnetis* 908 pelo uso do programa *Proveance Mauve*. O alinhamento sugere que existem regiões com mais de 10Kb no genoma de *S. agnetis* 970 que não estão representadas ou que não possuem muita semelhança no genoma do *S. agnetis* deste estudo (Figura 8). Utilizando a ferramenta PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) foi verificado que o genoma depositado no *GenBank* apresenta fagos, dos quais apenas um sobreescreve-se com essas regiões.

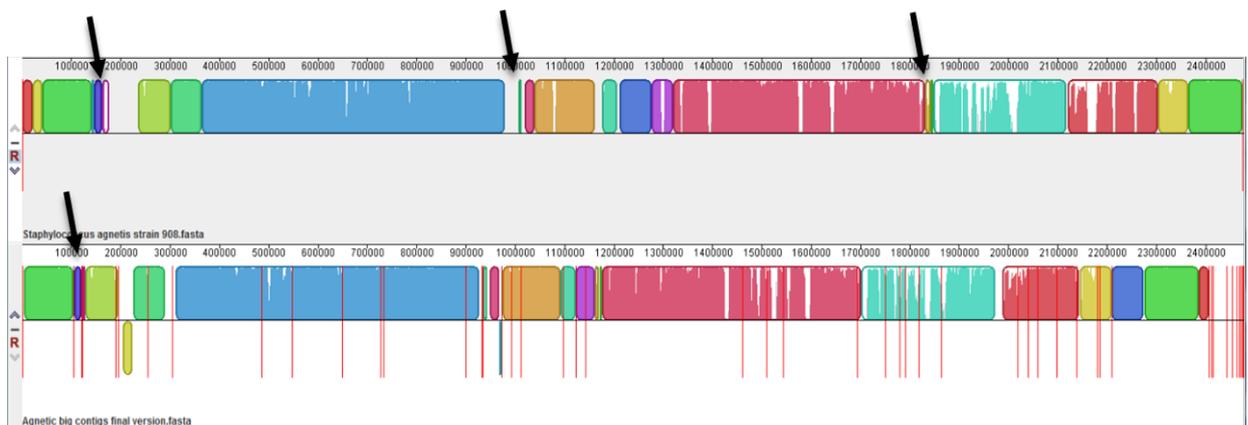


Figura 8. Representação gráfica de genomas linearizados de *S. agnetis* obtidos neste estudo e a cepa *S. agnetis* 970 no GenBank. Blocos com a mesma coloração representam regiões homólogas entre os genomas, Regiões divergentes ou ausentes estão representadas por falhas de coloração ou pela ausência de bloco no outro genoma correspondente (setas).

O mesmo processo foi realizado com uma cepa anteriormente classificada e cedida pelo *Animal Healthy Laboratory*. Esta cepa havia sido classificada

anteriormente como *S. hyicus* pela técnica de MALDI-TOF MS. Os dados foram montados utilizando o *DNASTAR SeqMan NGen12* e foram obtidos 56 *contigues* com mais de 2 kb, que também foram manualmente avaliados para remover os fins com baixa cobertura dos terminais 5' e 3', e foram novamente remontados em 31 *contigues* que se sobrepunham com 95% de identidade. Estes dados montados foram alinhados com o genoma disponível e conhecido de *S. hyicus* (ATCC 12249) pelo uso do programa *Proressive Mauve*.

O alinhamento sugere que existe uma região no centro de aproximadamente 1.050.000 pb no genoma da ATCC que não está contida no genoma da cepa de *S. hyicus* (Figura 9). Análises pelo programa PHAST revelaram que a ATCC 12249 contém fagos grandes com tamanho de 111.3 kb entre os nucleotídeos 1.010.408 - 1.121.775 que está relacionado ao fago *SPbeta-like* (NC_029119;127.73kb).

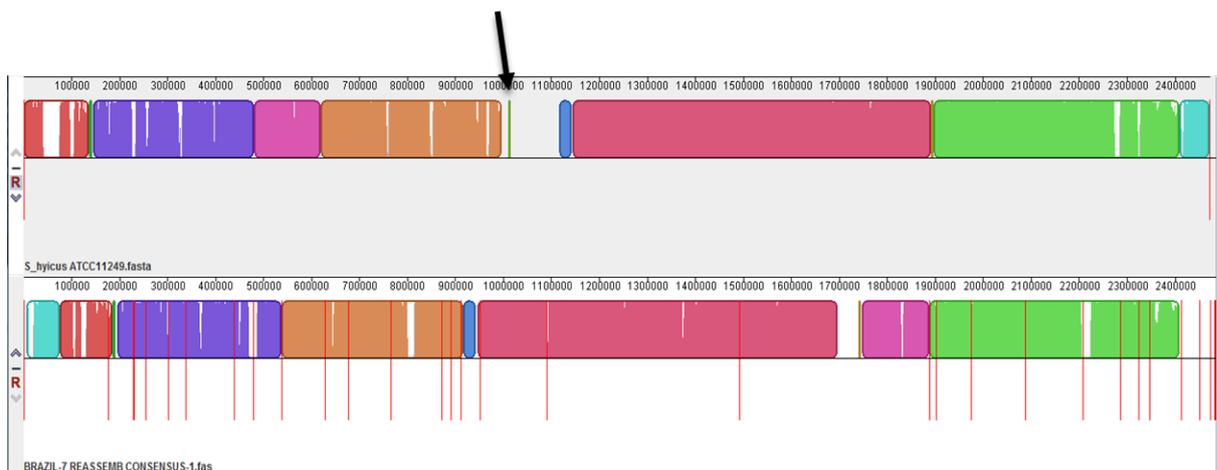


Figura 9. Representação gráfica de genomas linearizados de *S. hyicus* obtidos neste estudo e a cepa *S. hyicus* ATCC 12249 no GenBank. Blocos com a mesma coloração representam regiões homologas entre os genomas, Regiões divergentes ou ausentes estão representadas por falhas de coloração ou pela ausência de bloco no outro genoma correspondente (setas).

Os fagos são carreadores de genes de virulência. Isto já foi evidenciado em estudos anteriores (BABA et al., 2008), que sugerem que genes de virulência ou genes candidatos a virulência estavam dentro de quatro pró-fagos que foram incorporados ao genoma de *S. aureus* Newman. Estes autores observaram que vários genes de

virulência eram codificados por pró-fagos, o que corrobora com a admissão de que a baixa presença de genes de virulência encontrada nesse trabalho poderia estar relacionada à falta de fagos inseridos no genoma. Ainda neste quesito, a transferência de genes de virulência através de ilhas de patogenicidade e fagos parecem serem processos importantes pelos quais os estafilococos adquirem propriedades virulentas. Adicionalmente, a incorporação de genes adicionais e/ou mutação de genes pode exercer um papel adicional na evolução destes microrganismos quanto a sua patogênese e adaptação ao hospedeiro (MOON et al., 2015).

O termo “epidemiologia genômica” tem sido muito usado para descrever a prática do sequenciamento completo do genoma (SCG) para acessar, indexar e analisar sequências de DNA com importância epidemiológica (DENG X, DEN BAKKER HC, 2016). Como exemplo desta prática pode ser citado o caso em que cepas de *Escherichia coli* produtoras da toxina shiga causaram surtos de intoxicação alimentar e, que através do uso de sequenciamento completo do genoma foi observado que estas cepas haviam adquirido genes para a produção de Shiga toxina, resistência antimicrobiana e outros fatores de virulência (DENG X, DEN BAKKER HC, 2016). Poucos estudos utilizam o SCG para epidemiologia na mastite bubalina, entretanto para mastite bovina, epidemiologia genômica já foi utilizada em cepas de *E.coli* patogênica mamária (GOLDSTONE; HARRIS; SMITH, 2016), *Mycoplasma californicum* (CALCUTT; FOECKING; FOX, 2014) e *Corynebacterium bovis* (SCHRÖDER et al., 2012).

5.6 Espécies de SCN confirmados por meio da biologia molecular

Dentre as 320 amostras de leite obtidas 54 foram reativas ao CMT, com isolamento de *Staphylococcus spp.* em apenas seis. Quarenta e oito cepas de SCN foram isoladas de amostras de leite não reativas ao CMT e 27 foram obtidas de mão de ordenhador, teteiras e boca e narina de bezerros.

Dos 108 microrganismos isolados e corretamente classificados como SCN, 81 isolados de leite eram *Staphylococcus spp.* que pertencem às espécies *chromogenes* (48), *S. agnetis* (13), *S. epidermidis* (8), *S. sciuri* (3), *S. haemolyticus* (2), *S. equorum* (2), *S. pasteurii* (1), *S. warneri* (1), *S. hominis* (1), *S. caprae* (1) e *S. saprophyticus* (1).

Das 12 amostras obtidas de mãos dos ordenadores, oito foram de *S. epidermidis*, uma de *S. saprophyticus*, duas de *S. chromogenes* e uma de *S. pasteurii*, das dez amostras de teteiras obtidas, quatro foram de *S. chromogenes*, quatro de *S. agnetis*, uma de *S. haemolyticus* e uma de *S. sciuri*. Das cinco amostras de boca e narina dos bezerros três foram de *S. chromogenes*, uma de *S. haemolyticus* e uma de *S. sciuri* (Tabela 5). Esses resultados permitem observar a grande frequência de isolamento dos *S. chromogenes* em amostras de leite, seguido por *S. agnetis* e *S. epidermidis*. Em amostras obtidas das mãos dos ordenadores, *S. epidermidis* foi a espécie mais isolada, seguida por *S. chromogenes*. Em amostras de teteiras, *S. agnetis* e *S. chromogenes* foram as espécies mais isoladas. Nas amostras de boca e nariz de bezerros, *S. chromogenes* foi a espécie com maior frequência de isolamento.

Tabela 6. Frequência de isolamentos das espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) corretamente identificadas por meio de iniciadores espécie específicos e PCR em tempo real de acordo com o local de coleta da amostra.

Espécie	Local de Coleta			
	Búfala	Ordenhadores	Teteira	Bezerros
<i>S. chromogenes</i>	47	2	4	3
<i>S. agnetis</i>	10	-	4	-
<i>S. epidermidis</i>	7	8	-	-
<i>S. equorum</i>	2	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	2	-	1	1
<i>S. pasteurii</i>	2	1	-	-
<i>S. caprae</i>	1	-	-	-
<i>S. hominis</i>	1	-	-	-
<i>S. warneri</i>	1	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	1	-	-
<i>S. sciuri</i>	-	-	1	1
Total	73	12	10	5

A maior frequência de isolamento de *S. chromogenes* em amostras de leite e ambiente de ordenha pode ser atribuída ao fato de que esta espécie é a mais adaptada à glândula mamária bovina (e talvez bubalina) (THORBERG et al., 2009). Estes resultados são comparáveis aos observados anteriormente que sugerem que *Staphylococcus* spp. (ALI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; MEDEIROS et al., 2013), incluindo *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. simulans* e *S. epidermidis* (CAPURRO et al.,

2009), são os microrganismos mais comumente isolados de casos de mastite bubalina e de leite de búfala. Embora cautela deve ser exercitada ao extrapolar as descobertas entre espécies diferentes, esses achados também são semelhantes aos relatos de SCN em bovinos (SANTOS et al., 2008).

Cunha et al. (2006b) em estudo em um rebanho bubalino da raça Murrah no estado do Pernambuco, obtiveram 50,6% (41) de frequência de isolamentos de *Staphylococcus* spp em casos de mastite subclínica, 80% dos quais eram SCN. Segundo estes mesmos autores, ao compararem seus resultados com estudo de Chander; Baxi (1975), indicou-se que podem ocorrer similaridades de isolamento ao longo do tempo em diferentes regiões geográficas. Kapronezai; Melville; Benites (2005) isolaram microrganismos em 78,6%, 60,5% e 24,4% das amostras de leite bubalino. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por (MEDEIROS et al., 2011), que observaram uma frequência de isolamento de 21,8% para SCN, 1,3% para *S. aureus* e 16,7% para *Corynebacterium* sp. em amostras de leite de búfala.

5.7 Frequência de genes de virulência dos SCN isolados

Na detecção dos genes relacionados à adesão e à formação de biofilme, 27 (33,3%) cepas de SCN foram positivas para o gene *eno*, 10 (12,3%) para o gene *ebps*, 10 (12,3%) para o gene *fnbA* (Tabelas 6 e 7). Estes resultados demonstram que estas amostras apresentavam genes relacionados à adesão e à formação de biofilme. A presença destes genes em algumas amostras pode ser um indicativo de que os mesmos estejam relacionados à manutenção destes microrganismos no animal.

Em relação aos genes relacionados à produção de enterotoxinas, apenas uma cepa foi positiva para o gene *sea* e uma cepa positiva para a cepa *see*. Estes resultados sugerem que os microrganismos isolados de búfalas e no ambiente de ordenha possuem ilhas de patogenicidade e o risco de intoxicação por enterotoxinas, pela capacidade de transferência destes genes a outras cepas devido ao fato destas toxinas terem sido encontradas em transposon acesso GenBank: U93688.2. A capacidade de adesão e invasão dos SCN foi estudada em cultivo celular (ALMEIDA; OLIVER, 2001; ANAYA-LÓPEZ et al., 2006; HYVÖNEN et al., 2009). Estes autores observaram que embora os SCN possuíssem a mesma, ou até superior, capacidade

de se aderirem as células mamárias bovinas, a capacidade invasiva destes microrganismos era menor do que a do *S. aureus*. Kuroishi et al. (2003) observaram uma grande frequência de mastites subclínicas, crônicas e agudas induzidas por enterotoxinas ou toxinas do choque tóxico estafilocócicas. Segundo estes autores, a produção de diferentes enterotoxinas e toxina do choque tóxico foi comum em isolados de SCN, tanto em mastite subclínica quanto em mastites crônicas ou agudas.

Tabela 7. Frequência de genes de virulência, detectados por PCR em tempo real, de acordo com a espécie de SCN identificada em leite bubalino e ambiente de ordenha.

Espécie	Genes																
	<i>tsst-1</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>mecA</i>	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>cna</i>	<i>seb</i>	<i>sei</i>	<i>seq</i>	<i>sem</i>	<i>seg</i>	<i>see</i>	<i>eno</i>	<i>ebps</i>	<i>fib</i>	<i>fnbA</i>
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	11	4	-	5
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-
<i>S. caprae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>S. pasteurii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	1
<i>S. sciuri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>S. equorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>S. agnetis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	2	-	3
<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
Total	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	26	10	-	10

Gene relacionados a produção de toxinas: *tsst-1*, *eta*, *etb*, *sea*, *sec*, *seb*, *sei*, *seg*, *sem*, *seq* e *see*

Genes relacionados a adesão: *eno*, *ebps* *fib* *fnbA*

Gene relacionado a resistência a meticilina: *mecA*

Entretanto, métodos moleculares detectam a presença dos genes *se*, não permitindo inferir quanto à produção de enterotoxinas pelos estafilococos. Blaiotta et al. (2004) e Mello et al. (2016) observaram que o gene *sea*, exibiu uma prevalência de 18,2% e foi detectado tanto em *S. aureus* quanto em SCN isolados de mastite subclínicas bovinas. Este gene é carregado por um pró-fago e pode ser facilmente disseminado entre os estafilococos (BORST; BETLEY, 1994). No estudo de Mello et al. (2016), o gene *see* foi pouco detectado (8,2%). Este gene também é carregado por pró-fagos e estudos demonstram que os genes *see*, *sed* e *sea* são intimamente relacionados entre si, sendo que os genes *see* e *sea* apresentam uma homologia de 81% (BUSSCHE; LYON; BOHACH, 1993; MELLO et al., 2016). Kumar et al., (2011) Observaram a presença do gene *eno* (codifica uma proteína ligadora de laminina) em

100% dos 128 *S. aureus* isolados de mastite subclínica bovina. No estudo de Mello et al., (2016) o gene *eno* foi o mais frequentemente detectado em isolados de estafilococos (82,1%), junto com os genes *fnbA* (72,6%) e *fib* (71,7%). A proteína ligadora de fibronectina (*fnbA*) contribui para a invasão e adesão da bactéria a glândula mamária e também inibe a fagocitose (IKAWATY et al., 2010). A presença dos genes *fib* e *ebpS* em casos de mastites clínica ou subclínica, indica um provável papel deste gene na patogênese microbiana (ATSHAN et al., 2012).

Tabela 8. Frequência da detecção dos genes de virulência das cepas de SCN, identificada em leite bubalino e ambiente de ordenha, detectados por PCR em tempo real, de acordo com a origem.

Genes	Local de Coleta			
	Leite	Teteira	Ordenhador	Bezerro
<i>tst</i>	-	-	-	-
<i>eta</i>	-	-	-	-
<i>etb</i>	-	-	-	-
<i>mecA</i>	-	1	-	-
<i>sea</i>	1	-	-	-
<i>sec</i>	-	-	-	-
<i>cna</i>	-	-	-	-
<i>seb</i>	-	-	-	-
<i>sei</i>	-	-	-	-
<i>seq</i>	-	-	-	-
<i>sem</i>	-	-	-	-
<i>seg</i>	-	-	-	-
<i>see</i>	1	-	-	-
<i>eno</i>	17	2	6	2
<i>ebpS</i>	8	1	1	-
<i>fib</i>	-	-	-	-
<i>fnbA</i>	9	-	1	-
Total	36	4	8	2

Gene relacionados a produção de toxinas: *tsst-1*, *eta*, *etb*, *sea*, *sec*, *seb*, *sei*, *seg*, *sem*, *seq* e *see*

Genes relacionados a adesão: *eno*, *ebpS*, *fib*, *fnbA*

Gene relacionado a resistência a meticilina: *mecA*

5.8 Susceptibilidade dos SCN aos antimicrobianos

Os resultados do antibiograma indicam que dentre as 81 amostras dos SCN isolados de amostras de leite bubalino, 17 foram resistentes à penicilina, 15 foram resistentes ao cotrimoxazole, 13 foram resistentes à eritromicina, nove foram

resistentes à vancomicina, sete foram resistentes à rifampicina, sete foram resistentes à oxacilina, quatro foram resistentes à clindamicina, quatro foram resistentes ao cefepime, três foram resistentes à tetraciclina, uma foi resistente ao cloranfenicol, enquanto nenhuma foi resistente à ciprofloxacina e à gentamicina (Figura 10). Além disso, resistência a dois ou mais princípios ativos antimicrobianos *in vitro* foi observada em 21 isolados, sendo que destes um apresentou resistência a seis antimicrobianos simultaneamente, um a cinco antimicrobianos simultaneamente, três a quatro antimicrobianos simultaneamente, três a três antimicrobianos simultaneamente e 13 a dois antimicrobianos simultaneamente. A presença de cepas multirresistentes pode estar relacionada com a transferência lateral de genes, visto que genes de resistência a antimicrobianos encontram-se em elementos móveis como os plasmídeos, transposons e bacteriófagos.

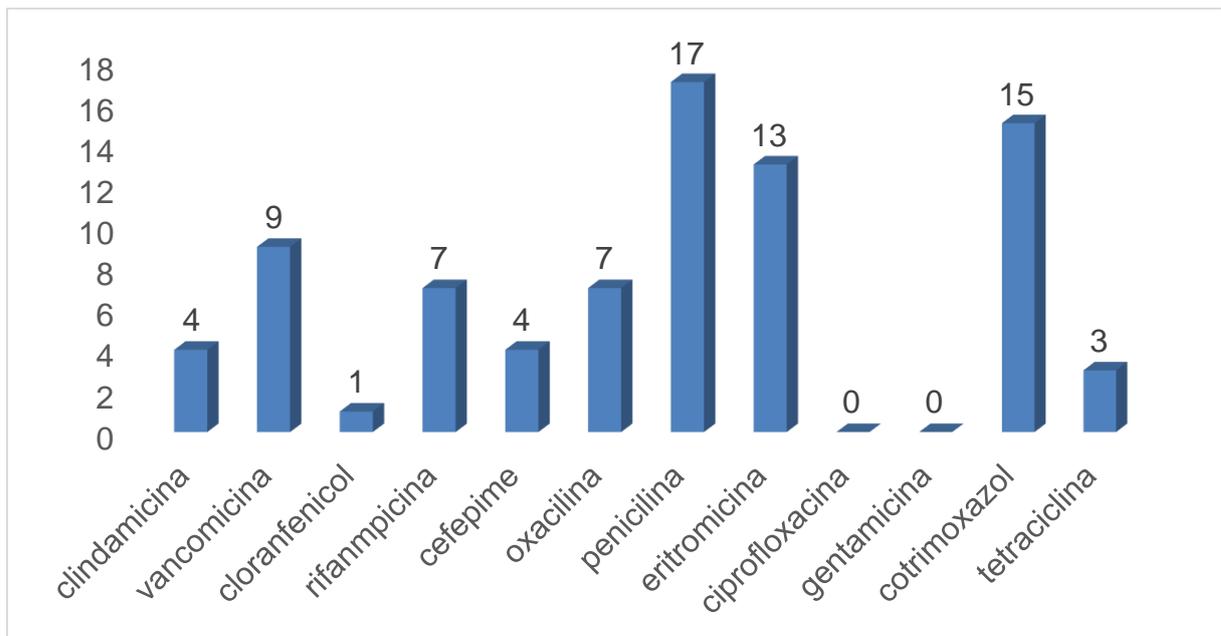


Figura 10. Resistência dos SCN isolados de amostras de leite bubalino frente aos princípios ativos antimicrobianos.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Cunha et al. (2006a), cujos microrganismos isolados nas amostras de leite de búfalas apresentaram um percentual de sensibilidade de 97,9% para gentamicina, 90,9% para enrofloxacin, 77,8% para sulfametoxazol/trimetoprim e 65,7% para a penicilina. A alta porcentagem de resistência à penicilina, neomicina e sulfametoxazol/trimetoprim e a presença de

cepas multirresistentes verificadas no estudo pode estar relacionada ao uso indiscriminado e inadequado dos princípios ativos e aos mecanismos de transferência de resistência, possibilitando a seleção de cepas resistentes, constituindo sério problema de saúde pública (QUEIROZ et al., 2012).

Segundo Soares et al. (2012) a resistência à penicilina e à ampicilina em *Staphylococcus* spp é um fenômeno mundial e recorrente, apesar da pressão pelo uso correto de beta-lactâmicos no controle da mastite. A dispersão de cepas resistentes a penicilinas semissintéticas tem tornado o tratamento de doenças causadas por estafilococos difícil (SOARES et al., 2012). Resistência a penicilina e neomicina foram observados por Pamuk; Eker; Yildirim (2010) em SCN isolados de amostras de leite bubalino, queijo e creme coalhado, reforçando que a resistência aos antimicrobianos pode estar relacionada ao sistema de produção e a política de uso de antimicrobianos em cada país.

6 CONCLUSÕES

- Os principais *Staphylococcus* coagulase negativa isolados foram *S. chromogenes*, *S. agnetis* e *S. epidermidis*, o que reforça o papel destes microrganismos como os mais adaptados a glândula mamaria e causadores de infecções intramamárias. *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. equorum*, *S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. caprae* e *S. saprophyticus* foram os isolados em menor frequência contribuindo com o status de agentes oportunistas em mastite em bubalinos.
- A detecção de genes relacionados à adesão e à produção de enterotoxinas e toxinas do choque tóxico tornam estas cepas um risco potencial à saúde pública devido ao fato de grande parte delas apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, inclusive demonstrando multirresistência.
- Também foram detectados genes relacionados à adesão que contribuem para a permanência desses microrganismos tanto nos animais quanto no ambiente.
- A técnica de MALDI-TOF MS pode ser uma ferramenta muito útil para o diagnóstico rápido e preciso para as espécies de SCN, no entanto, o método deve ser utilizado com precaução ao avaliar amostras veterinárias, pois o perfil de cepa pode não estar disponível nos bancos de dados.
- Os iniciadores desenhados para o gene *cydB* neste estudo podem ser utilizados para PCR convencional ou em tempo real para complementar (ou caso não disponível, substituir) outras técnicas para identificação de SCN.

7. REFERÊNCIAS

ABDULWAHAB, A.; TAJ-ALDEEN, S. J.; IBRAHIM, E. B.; TALAQ, E.; ABU-MADI, M.; FOTEDAR, R. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. **Infection and drug resistance**, v. 8, p. 83–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25995646>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

ALI, L.; MUHAMMAD, G.; ARSHAD, M.; SAQUIB, M.; HASSAN, I. J. Bacteriology of Mastitis in Buffaloes in Tehsil Samundri of District Faisalabad, Pakistan. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 31–33, 2008.

ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Interaction of coagulase-negative Staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, n. 5, p. 205–212, nov. 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401001904656>>. Acesso em: 3 nov. 2016.

ANAYA-LÓPEZ, J. L.; CONTRERAS-GUZMÁN, O. E.; CÁRABEZ-TREJO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; OCHOA-ZARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 358–361, 2006.

ANDRADE, K. D. de; RANGEL, A. H. do N.; ARAÚJO, V. M. de; JÚNIOR, D. M. de L.; OLIVEIRA, N. A. de. Efeito da estação do ano na qualidade do leite de búfalas. **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 33–37, 2011.

ANTUNES, A. L. S.; BONFANTI, J. W.; PEREZ, L. R. R.; PINTO, C. C. F.; FREITAS, A. L. P. de; MACEDO, A. J.; BARTH, A. L. High vancomycin resistance among biofilms produced by Staphylococcus species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 51–55, 2011.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 1, p. 81–86, 2005.

ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. R. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics.**, v. 5, n. 2, p. 209, 2005.

ATANASOVA, K.; GUCHTC, S. Van; BARBÉ, F.; DUCHATEAU, L.; REETH, K. Van. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* exacerbates respiratory disease in porcine respiratory coronavirus-infected pigs. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 2, p. 210–215, 2011.

ATSHAN, S. S.; NOR SHAMSUDIN, M.; SEKAWI, Z.; LUNG, L. T. T.; HAMAT, R. A.; KARUNANIDHI, A.; MATEG ALI, A.; GHAZNAVI-RAD, E.; GHASEMZADEH-MOGHADDAM, H.; CHONG SENG, J. S.; NATHAN, J. J.; PEI, C. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

AYYADEVARA, S.; THADEN, J. J.; SHMOOKLER REIS, R. J. Discrimination of Primer 3'-Nucleotide Mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 284, n. 1, p. 11–18, ago. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269700946359>>. Acesso em: 3 nov. 2016.

BABA, T.; BAE, T.; SCHNEEWIND, O.; TAKEUCHI, F.; HIRAMATSU, K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: Polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 300–310, 2008.

BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; SANVIDO, G. B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖTTCHER, V.; EBERLIN, M. N.; DOS SANTOS, M. V. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5661–7, dez. 2010.

BASTIANETTO, E. Aspectos Econômicos da Criação de Bubalinos em Minas Gerais. In: II

Simpósio Mineiro de Buiatria 2, 2005. Belo Horizonte. **Anais...**Belo horizonte, p.320-327.

BASTOS, P. A.; BIRGEL, E. H. Milk of Murrah buffaloes bred in São Paulo (Brazil): influence of age, lactation phase, time of milking and bacterial isolation in the physical-chemical and cell composition Resumo. **Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP**, v. 9, n. 3, p. 6–13, 2011.

BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLINA, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2011.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n. Xvii, p. 293–298, 2007.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1614–1619, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x>>.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 719–730, 2004.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; ERCOLINI, D.; PEPE, O.; COPPOLA, S. Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial kat (Catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S.* . **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 192–201, 2010.

BORST, D. W.; BETLEY, M. J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 113–118, 1994.

BRESOLIN, B. M. Z.; DALL'STELLA, J. K.; FONTOURA-DA-SILVA, S. E. PESQUISA SOBRE

A BACTÉRIA STAPHYLOCOCCUS AUREUS NA MUCOSA NASAL E MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS EM CURITIBA/PARANÁ/BRASIL. **Estudos de Biologia**, v. 27, n. 29, p. 27–32, 2005.

BRITTEN, A. M. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 187–202, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.006>>.

BUSSCHE, R. A. Van Den; LYON, J. D.; BOHACH, G. A. Molecular Evolution of the Staphylococcal and Streptococcal Pyrogenic Toxin Gene Family. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 2, n. 4, p. 281–292, 1993.

BUZI, K. A.; PAES, J.; NOGUEIRA, D. A.; ROBERTO, P.; RAMOS, R.; BIONDI, G. F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala Microbiological analysis and electrophoretic characterization of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 7–11, 2009.

CALCUTT, M. J.; FOECKING, M. F.; FOX, L. K. Complete Genome Sequence of the Bovine Mastitis Pathogen *Mycoplasma californicum* Strain ST-6T (ATCC 33461T). **Genome announcements**, v. 2, n. 4, p. 2–3, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4081997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CAPURRO, A.; ARTURSSON, K.; WALLER, K. P.; BENGTSSON, B.; ERICSSON-UNNERSTAD, H.; ASPÁN, A. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3–4, p. 327–333, 2009.

CARVALHO, L. B.; AMARAL, F. R.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; LEITE, R. C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 242–245, 2007.

CHANDER, S.; BAXI, K. K. Note on diagnosis and treatment of subclinical mastitis in buffaloes.

Indian Veterinary Journal, v. 52, p. 847–849, 1975.

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, n. 1–2, p. 1–17, 2007.

COSTA, J. C. M.; ESPESCHIT, I. F.; PIERI, F. A.; CARVALHO, I. A.; MOREIRA, M. A. S. Perfil de sensibilidade de células sésseis e planctônicas de *Escherichia coli* a antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p. 129–136, 2014.

CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G. da; JÚNIOR, J. W. P.; SILVA, D. R. da; OLIVEIRA, A. A. da F.; SILVA, K. P. C. da; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos . **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 17–21, 2006a.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. a O. Toxigenicity in *Staphylococcus* with emphasis on coagulase- negative staphylococci. **Applied Microbiology**, p. 778–782, 2007.

CUNHA, M. de L. R. de S. da; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; JÚNIOR, J. P. A. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 70–74, mar. 2006b.

CUNHA NETO, O. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; HOTTA, R. M.; SOBRAL, P. J. A. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 448–453, 2005.

DE VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; PIESENS, V.; VAN COILLIE, E.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3–4, p. 466–474, 2014.

De VISSCHER, A. **Ecology and epidemiology of bovine-related coagulase-negative staphylococcus species**. 2016. 256f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária de Ghent, Ghent, 2016.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAUJO, W. P. De; KITAMURA, S. S.; ROSENFELD, A. M. F.; BIRGEL, E. H. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híginas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1087–1092, 2004.

DENG X, DEN BAKKER HC, H. R. Genomic epidemiology: whole-genome-sequencing-powered surveillance and outbreak investigation of foodborne bacterial pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.7, n.1, p. 1–22, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772415>>.

DEVRIESE, L. A.; DE KEYSER, H. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. **The Journal of dairy research**, v. 47, n. 1, p. 155–8, fev. 1980.

DUPONT, C.; SIVADON-TARDY, V.; BILLE, E.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; ALVAREZ, A. S.; DEGAND, N.; FERRONI, A.; ROTTMAN, M.; HERRMANN, J. L.; NASSIF, X.; RONCO, E.; CARBONNELLE, E. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 998–1004, jul. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X1461764X>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. G.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; LARA, G. H. B.; LISTONI, F. J. P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 745–748, 2009.

FRY, P. R.; MIDDLETON, J. R.; DUFOUR, S.; PERRY, J.; SCHOLL, D.; DOHOO, I. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 8, p. 4876–85, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214004196>>.

GERAGHTY, L.; BOOTH, M.; ROWAN, N.; FOGARTY, A. Investigations on the efficacy of routinely used phenotypic methods compared to genotypic approaches for the identification of staphylococcal species isolated from companion animals in Irish veterinary hospitals. **Irish**

veterinary journal, v. 66, n. 1, p. 7, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3649918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, n. 1740–1526 (Print), p. 733–739, 2005. Disponível em: <<c:%5CKarsten%5CPDFs%5CGrundlagen-PDFs%5CGrund-2005%5CGevers et al.-Re-evaluating prokaryotic species.pdf>>.

GHEBREMEDHIN, B.; LAYER, F.; KÖNIG, W.; KÖNIG, B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1019–1025, 2008.

GIRISH NAIR, R.; KAUR, G. Genome Mining and Comparative Genomic Analysis of Five Coagulase- Negative *Staphylococci* (CNS) Isolated from Human Colon and Gall Bladder. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 7, n. 2, 2016. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/open-access/genome-mining-and-comparative-genomic-analysis-of-five-coagulasenegative-staphylococci-cns-isolated-from-human-colon-and-gallbladd-2153-0602-1000192.php?aid=68820>>.

GISELE DELA RICCI, P. F. D.; RICCI, G. Dela; DOMINGUES, P. F.; GISELE DELA RICCI, P. F. D.; RICCI, G. Dela; DOMINGUES, P. F. Grandes animais , o leite de búfala. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 10, n. 1, p. 14–19, 2012.

GOLDSTONE, R. J.; HARRIS, S.; SMITH, D. G. E. Genomic content typifying a prevalent clade of bovine mastitis-associated *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 30115, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep30115>>.

GRANT, J. R.; ARANTES, A. S.; STOTHARD, P. Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 202, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/202%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22621371%5Cnhttp://www.pubmedc>

entral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3469350>.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HYVÖNEN, P.; KÄYHKÖ, S.; TAPONEN, S.; VON WRIGHT, A.; PYÖRÄLÄ, S. Effect of bovine lactoferrin on the internalization of coagulase-negative staphylococci into bovine mammary epithelial cells under in-vitro conditions. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 2, p. 144, 5 maio 2009. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029908003774>. Acesso em: 3 nov. 2016.

IKAWATY, R.; BROUWER, E. C.; DUIJKEREN, E. Van; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Virulence Factors of Genotyped Bovine Mastitis Staphylococcus aureus Isolates in The Netherlands. **Internation Journal of Dairy Science**, v. 5, n. 2, p. 60–70, 2010.

IWASE, T.; SEKI, K.; SHINJI, H.; MIZUNOE, Y.; MASUDA, S. Development of a real-time PCR assay for the detection and identification of Staphylococcus capitis, Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus warneri. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1346–1349, 2007.

JORGE, A. M.; STRAZZA, M. R. B.; ANDRIGHETTO, C.; MARIA, SILVIA STORTI, M. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas do leite de búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039–2045, 2005.

KAPRONEZAI, J. **Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas bubalinas (Bubalus bubalis) no Estado de São Paulo**. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

KAPRONEZAI, J.; MELVILLE, P.; BENITES, N. R. Análise microbiológica , teste de Tamis e California Mastitis Test realizados em emostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 183–187, 2005.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; ANAND, S. K.; SINGH, R. S. Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 513–521, 2011.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Unimar**, v. 19, n. April, p. 683–689, 1997.

KUROISHI, T.; KOMINE, K.; KAI, K.; ITAGAKI, M.; KOBAYASHI, J.; OHTA, M.; KAMATA, S.; KUMAGAI, K. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 8, p. 899–906, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12951423>>.

LANGE, C. C.; AVELLAR-COSTA, P.; APARECIDA, M.; PAIVA, V.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. *Staphylococcus chromogenes*, a coagulase-negative *Staphylococcus* species that can clot plasma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1372–1375, 2016.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36–40, 2011.

LANGONI¹, H.; DOMINGUES¹, P. F.; FILHO², J. R. M.; BALDINI, S. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Ars Veterinaria**, v. 17, n. 3, p. 213–217, 2001.

LOONEN, A. J. M.; JANSZ, A. R.; BERGLAND, J. N. B.; VALKENBURG, M.; WOLFFS, P. F. G.; VAN DEN BRULE, A. J. C. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1437–1439, 2012.

LUCHEIS, S. B. A IMPORTÂNCIA DOS ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS NA MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 1–6, 2011.

MADELLA-OLIVEIRA, A. D. F.; QUIRINO, C. R.; ADONA, P. R.; PACHECO, A. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 1, p. 53–54, 2005.

MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 3057–3071, 2010.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G. da; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. de A. Prevalência E Etiologia Infecçiosa Da Mastite Bovina Na Microrregião De Cuiabá-Mt. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181–187, 2010. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/index.php?journal=vet&page=article&op=view&path%255B%255D=5085&path%255B%255D=8093>>.

MATSUDA, N.; MATSUDA, M.; NOTAKE, S.; YOKOKAWA, H.; KAWAMURA, Y.; HIRAMATSU, K.; KIKUCHI, K. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3862–6, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3502947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MCDONALD, J. S.; KINSEL, M. L.; ADAMS, D. S.; DARLINGTON, R. L. Studying the effects of backflushing milking units. **Veterinary Medicine (USA)**, 1993.

MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SAUKAS, T. N.; KREWER, C. C.; SANTOS, A. S.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1891–1894, 2013.

MEDEIROS, E. S. S.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; AZEVEDO, S. S. S.; JUNIOR, J. W. P.; ALBUQUERQUE, T. N. S. P. P. F. de; MOTA, R. A.; JATOBÁ, S. B. P. B. R. B.; AZEVEDO, S. S. S.; SAUKAS, J. W. P. J. T. N.; ALBUQUERQUE, P. P. F. de; APARECIDO, M. R. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 219–223, 2011.

MELLO, P. L.; FLÁVIO, D.; RIBOLI, M.; PINHEIRO, L. Detection of Enterotoxigenic Potential and Determination of Clonal Profile in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Different Brazilian States. **Toxins**, v. 8, n. 104, p. 1–10, 2016.

MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; FRENEY, J.; BES, M.; GUE, V. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 287–294, 2000.

MOON, B. Y.; PARK, J. Y.; HWANG, S. Y.; ROBINSON, D. A.; THOMAS, J. C.; FITZGERALD, J. R.; PARK, Y. H.; SEO, K. S. Phage-mediated horizontal transfer of a *Staphylococcus aureus* virulence-associated genomic island. **Scientific reports**, v. 5, p. 9784, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4402969&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MOROT-BIZOT, S. C.; TALON, R.; LEROY, S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1087–1094, 2004.

MUNRO, P.; CLÉMENT, R.; LAVIGNE, J. P.; PULCINI, C.; LEMICHEZ, E.; LANDRAUD, L. High prevalence of *edin-C* encoding *RhoA*-targeting toxin in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 8, p. 965–972, 2011.

NETO, F. P.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras- revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1679–7353, 2011.

NORI, P.; OSTROWSKY, B.; DOROKHOVA, O.; GIALANELLA, P.; MOY, M.; MUGGIA, V.; GROSSBERG, R.; KORNBLUM, J.; LIN, Y.; LEVI, M. H. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to resolve complex clinical cases of patients with recurrent bacteremias. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1983–1986, 2013.

OLIVEIRA, A. A. F.; PINHEIRO, J. W.; MOTA, R. A.; CUNHA, M. L. R. S.; LOPES, C. A. M.;

ROCHA, N. S. Phenotype characterization of *Staphylococcus* species strains isolated from buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1208–1211, 2011. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1040638711428946>>.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L. M.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1–2, p. 133–140, 2006.

PAMUK, S.; EKER, E.; YILDIRIM, Y. Antibiotic resistance of coagulase negative *Staphylococci* isolated from buffalo milk and some milk products. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 7–12, 2010.

PANIAGUA-CONTRERAS, G.; SÁINZ-ESPUÑES, T.; MONROY-PÉREZ, E.; RAYMUNDO RODRÍGUEZ-MOCTEZUMA, J.; ARENAS-ARANDA, D.; NEGRETE-ABASCAL, E.; VACA, S. Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Hemodialysis Catheters of Mexican Patients. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 476–487, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=25847>>.

PAPP, A. C.; PINSONNEAULT, J. K.; COOKE, G.; SADÉE, W. Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. **BioTechniques**, v. 34, n. 5, p. 1068–72, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765033>>. Acesso em: 3 nov. 2016.

PARADIS, M.-E.; BOUCHARD, E.; SCHOLL, D. T.; MIGLIOR, F.; ROY, J.-P. Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 2989–97, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030210003085>>.

PARK, J. Y.; FOX, L. K.; SEO, K. S.; MCGUIRE, M. A.; PARK, Y. H.; RURANGIRWA, F. R.; SISCHO, W. M.; BOHACH, G. A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 1–2, p. 142–8, 10 jan. 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3689435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 maio. 2016.

PERRETEN, V.; GIAMPÀ, N.; SCHULER-SCHMID, U.; TEUBER, M. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 113–20, mar. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202098800143>>. Acesso em: 25 maio. 2016.

PICCININI, R.; MIARELLI, M.; FERRI, B.; TRIPALDI, C.; BELOTTI, M.; DAPRÀ, V.; ORLANDINI, S.; ZECCONI, A. Relationship between cellular and whey components in buffalo milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 2, p. 129, 14 maio 2006. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029905001548>. Acesso em: 3 nov. 2016.

PIEPERS, S.; SCHUKKEN, Y. H.; PASSCHYN, P.; DE VliegHER, S. The effect of intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in early lactating heifers on milk yield throughout first lactation revisited. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5095–105, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213004438>>.

PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B.; SUPRÉ, K.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRIKX, M.; DE VliegHER, S. Distribution of coagulase-negative Staphylococcus species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of dairy science**, v. 94, p. 2933–2944, 2011.

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597–612, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20011685>>. Acesso em: 4 nov. 2016.

QUEIROZ, G. M.; SILVA, L. M. da; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p. 132–138, 2012.

QUINN, P. .; B., M.; M.E., C.; W.J., D.; F.C, L. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. Diseases of the mammary gland. In: **Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats**. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. cap.15, p. 673–763.

RAPINI, L.; CERQUEIRA, M.; CARMO, L. Presence of Staphylococcus strains producer of enterotoxins and toxic shock toxin syndrome isolated from goat's cheese handlers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n. 6, p. 825–829, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352005000600019&script=sci_arttext>.

RODRIGUES, C. F. de C.; IAPICHINI, J. E. C. B.; LISERRE, A. M.; SOUZA, K. B. de; FACHINI, C.; REICHERT, R. H. Oportunidades e desafios da bubalinocultura familiar da região sudoeste paulista. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**. p. 100–109, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning. a laboratory manual**. 3rd. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, O. C. da S.; BARROS, E. M.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, M. do C. de F.; DOS SANTOS, K. R. N.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 1–2, p. 134–140, 2008.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SAWANT, A.; GILLESPIE, B.; OLIVER, S. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 73–81, 16 fev. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113508003660>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

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, n. 5, p. 199–204, 1 mar. 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13416088>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

SCHRÖDER, J.; GLAUB, A.; SCHNEIDER, J.; TROST, E.; TAUCH, A. Draft genome sequence of *Corynebacterium bovis* DSM 20582, which causes clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4437–4437, 2012.

SCHUKKEN, Y. H.; GONZÁLEZ, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOME, F. L.; BENNETT, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J.; ZADOKS, R. N. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 9–14, 2009.

SEO, K. K.; 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, n. 1, p. 260–269, 2007.

SHAFABI, M.; VAFAI, K. Synthesis of biofilm resistance characteristics against antibiotics. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 53, n. 15–16, p. 2943–2950, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2010.04.004>>.

SIMEÃO DO CARMO, L.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; JOSÉ DE SENA, M.; APARECIDA DOS SANTOS, D.; EDUARDO DE FARIA, M.; PENNA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9–14, fev. 2002.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. a; PRIBUL, B. R.; OLIVA, M. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S.; C, A. S. L.; PEREIRA, I. a; PRIBUL, B. R.; OLIVA, M. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Antimicrobial resistance and detection of *mec A* and *bla Z* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 692–696, 2012.

SOLLECITO, N. V.; LOPES, L. B.; LEITE, R. C. Contagem de células somáticas, perfil de sensibilidade antimicrobiana e microorganismos isolados de mastites em búfalos: Uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 1, p. 18–22, 2011.

SPANU, T.; DE CAROLIS, E.; FIORI, B.; SANGUINETTI, M.; D'INZEO, T.; FADDA, G.;

POSTERARO, B. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to rpoB gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 1, p. 44–49, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03181.x>>.

SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; VANEECHOUTTE, M.; PIEPERS, S.; DE VLIEGHER, S. Some coagulase-negative Staphylococcus species affect udder health more than others. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2329–40, maio 2011. Disponível em: <<http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030211002086/fulltext>>. Acesso em: 10 maio. 2016.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 96–100, 2005.

THORBERG, B.-M.; BRÄNDSTRÖM, B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 47, n. 9, p. 683–691, nov. 2000.

THORBERG, B.-M.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; EMANUELSON, U.; PERSSON WALLER, K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4962–70, 2009. Disponível em: <<http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030209708276/fulltext>>.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; ARCARI, M. A.; DOS SANTOS, M. V. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3071–8, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25726098>>. Acesso em: 22 maio. 2016.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; DE CAMPOS BRAGA, P. A.; PRADA E SILVA, L. F.; EBERLIN, M. N.; DOS SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1658–1663, 2014.

UPPAL, S. K.; SINGH, K. B.; ROY, K. S.; NAURIYAL, D. C.; BANSAL, B. K. Natural defense mechanism against mastitis: a comparative histomorphology of buffalo and cow teat canal. **Buffalo Journal**, v. 10, p. 125–131, 1994.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.; HAESEBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative Staphylococcus species associated with ruminant udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5275–5293, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214004317>>.

VERRAES, C.; VAN BOXSTAEL, S.; VAN MEERVENNE, E.; VAN COILLIE, E.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; DE SCHAEZTEN, M. A.; VAN HUFFEL, X.; IMBERECHTS, H.; DIERICK, K.; DAUBE, G.; SAEGERMAN, C.; DE BLOCK, J.; DEWULF, J.; HERMAN, L. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 7, p. 2643–2669, 2013.

VOGGU, L.; SCHLAG, S.; BISWAS, R.; ROSENSTEIN, R.; RAUSCH, C.; GÖTZ, F. Microevolution of cytochrome bd oxidase in staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by Pseudomonas. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 23, p. 8079–8086, 2006.

WATANABE, S.; ITO, T.; TAKEUCHI, F.; ENDO, M.; OKUNO, E.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of ten serotypes of Staphylocoagulases in Staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 11, p. 3698–3707, 2005.

WATTS, J. L.; NICKERSON, S. C. A comparison of the STAPH-Ident and STAPH-Trac systems to conventional methods in the identification of staphylococci isolated from bovine udders. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 179–87, jul. 1986.

ZHU, W.; SIERADZKI, K.; ALBRECHT, V.; MCALLISTER, S.; LIN, W.; STUCHLIK, O.; LIMBAGO, B.; POHL, J.; RASHEED, J. K. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of Staphylococcus species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 117, p. 14–17, 2015.