

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Staphylococcus **COAGULASE NEGATIVO**
PRODUTORES DE COAGULASE ISOLADOS DE LEITE
BUBALINO E AMBIENTE DE ORDENHA PODEM SER
CONFUNDIDOS COM *Staphylococcus aureus* POR
MÉTODOS FENOTÍPICOS E POR BIOLOGIA MOLECULAR

Camila Chioda de Almeida
Bióloga

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Staphylococcus **COAGULASE NEGATIVO**
PRODUTORES DE COAGULASE ISOLADOS DE LEITE
BUBALINO E AMBIENTE DE ORDENHA PODEM SER
CONFUNDIDOS COM *Staphylococcus aureus* POR
MÉTODOS FENOTÍPICOS E POR BIOLOGIA MOLECULAR

Camila Chioda de Almeida

Orientador: Fernando Antônio de Ávila

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

A447s Almeida, Camila Chioda
Staphylococcus coagulase negativo produtores de coagulase isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha podem ser confundidos com *staphylococcus aureus* por métodos fenotípicos e por biologia molecular / Camila Chioda de Almeida. -- Jaboticabal, 2018

VII, 50 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Fernando Antônio de Ávila

Banca examinadora: Adilson César Abreu, Luciano Menezes Ferreira, Hélio Jose Montassier, Karina Paes

Bibliografia

1. Mastite. 2. PCR espécie específica. 3. enterotoxina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.293.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVO PRODUTORES DE COAGULASE ISOLADOS DE LEITE BUBALINO E AMBIENTE DE ORDENHA PODEM SER CONFUNDIDOS COM *Staphylococcus aureus* POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E POR BIOLOGIA MOLECULAR

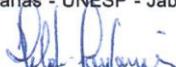
AUTORA: CAMILA CHIODA DE ALMEIDA

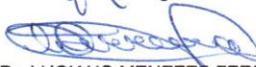
ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal - SP


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


Prof. Dr. LUCIANO MENEZES FERREIRA
Câmpus Veterinário / Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. ADILSON CÉSAR ABREU BERNARDI
UNIARA / Araraquara/SP

Jaboticabal, 04 de julho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAMILA CHIODA DE ALMEIDA - Nascida em 06 de Maio de 1984 na cidade de Catanduva - SP, ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara, SP em fevereiro de 2006, concluindo-o em dezembro de 2009. Foi Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq - Nível 3- DTI-3, no Projeto de Pesquisa Científica intitulado “Estudo epidemiológico do *Staphylococcus aureus* em propriedades rurais leiteiras e em laticínios como ferramenta para a melhoria da qualidade do leite e derivados” sob orientação do Professor Dr. Antônio Nader Filho com vigência no período de 01/07/10 a 31/07/11. Ingressou, como bolsista da CAPES, no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP Campus de Jaboticabal em agosto de 2012, sob orientação do prof. Dr. João Martins Pizauro Junior e coorientação do prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior. Obteve o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária em julho de 2015. Ingressou no Doutorado, no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP Campus de Jaboticabal, em agosto de 2015, sob orientação do Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila e realizou estágio sanduíche na University of Guelph na cidade de Guelph – Ontario – Canadá sob orientação da Dra. Janet Isabel MacInnes, pelo programa CAPES - PDSE durante o período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

“A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência”.

Charles Darwin

DEDICATÓRIA

Dedico à pessoa mais importante da minha vida, minha mãezinha querida, Marina dos Santos Chioda, por todo amor, apoio e por ser o alicerce para meu desenvolvimento.

.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** primeiramente, pela dádiva de viver. Pela saúde, coragem, ânimo nas horas difíceis, paciência e pelas pessoas especiais que estão na minha vida e que me ajudaram a realizar mais um sonho. “O senhor é meu Pastor e nada me faltará...”

À minha família pelo apoio e incentivo, em especial, minha mãe **Marina dos Santos Chioda**, meus irmãos **Leandro** e **Fábio**.

Ao meu noivo **Lucas José Luduvério Pizauro** por toda a ajuda, apoio, carinho, companheirismo, dedicação e paciência.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila** pela confiança, pelo apoio e orientação.

A todos os meus amigos pelos conhecimentos compartilhados, pela paciência, ajuda e amizade não só no laboratório, mas em todos os momentos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos que contribuíram para mais esta vitória.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Bublinocultura leiteira	2
2.2 Mastite estafilocócica	2
2.3 Fatores de Virulência e Resistência Antimicrobiana	3
2.4 Identificação	4
3. OBJETIVOS	6
3.1 Objetivo geral	6
O objetivo deste estudo foi comparar os métodos fenotípico e genotípico para a identificação de <i>S. aureus</i> e testar a confiabilidade dos mesmos para diagnóstico da mastite bubalina	6
3.2 Objetivos específicos	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Coleta das amostras	7
4.2 Identificação dos <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva	7
4.3 Extração de DNA	7
4.4 Identificação dos <i>S. aureus</i> pelo Sa442	8
4.5 Ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF)	9
4.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA	9
4.7 Desenho dos oligonucleotídios espécie específico do gene <i>cydB</i>	10
4.8 Desenho dos oligonucleotídios para o gene da coagulase (<i>coa</i>)	12
4.9 PCR em Tempo Real dos genes de virulência (<i>mecA</i> , <i>tsst-1</i> , <i>eta</i> , <i>etb</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>cydB</i> e <i>coa</i>	14
4.10 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	14
5. RESULTADOS	18
5.1 Isolamento e identificação preliminar dos <i>Staphylococcus</i> spp.	18
5.2 Teste do látex, identificação pelo MALDI-TOF e sequenciamento 16S rRNA	18
5.3 Análise e detecção do gene <i>cydB</i>	18
5.4 Genes de virulência	19
5.5 Suscetibilidade aos antimicrobiano	19

6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÕES	25
8. LIMITAÇÕES	25
9. REFERÊNCIAS.....	26

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Estudo da Interação Polimicrobiana em Leite de Búfala e Detecção de Fatores de Virulência em *Staphylococcus aureus* Isoladas de Leite Bubalino e Ambiente de Ordenha para Diagnóstico e Controle da Mastite**", protocolo nº 19.009/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de dezembro de 2016.

Vigência do Projeto	10/01/2017 a 28/02/2018
Espécie / Linhagem	Bezerro bovino
Nº de animais	04
Peso / Idade	Mínimo 02 meses
Sexo	Macho
Origem	Fazenda – FCAV/Unesp Jaboticabal

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Staphylococcus COAGULASE NEGATIVO PRODUTORES DE
COAGULASE ISOLADOS DE LEITE BUBALINO E AMBIENTE DE ORDENHA
PODEM SER CONFUNDIDOS COM *Staphylococcus aureus* POR MÉTODOS
FENOTÍPICOS E POR BIOLOGIA MOLECULAR

RESUMO -. Assim como nos bovinos, a búfala pode ter mastite, sendo o *Staphylococcus aureus* o principal causador desta enfermidade. No entanto, é possível que sua prevalência possa estar superestimada. Este estudo objetivou comparar métodos fenotípico e genotípico na identificação de *S. aureus* em amostras de leite bubalino e ambiente de ordenha bem como propor uma nova PCR quantitativa em tempo real para identificação do mesmo. Para isso, de um total de 408 amostras obtidas de leite de búfalo, ambiente de ordenha e mãos de ordenhadores, 32 cepas presuntivas de *S. aureus* foram identificadas com base em seu crescimento fenotípico característico em ágar Baird Parker, reações positivas de Gram e catalase, capacidade de coagular plasma de coelho, e resultado positivo no ensaio de PCR Sa442 específico para a espécie. No entanto, testes adicionais revelaram que destas 32 estirpes, apenas 10 isolados apresentaram resultado positivo na aglutinação em látex, incluindo um *S. chromogenes* e um *S. agnetis*. A análise de MALDI-TOF MS revelou que oito das 32 cepas eram *S. aureus*, 19 *S. chromogenes*, três *S. agnetis* e uma *S. xylosus*. Todas as oito cepas identificadas como *S. aureus* pela análise de MALDI-TOF e confirmadas pelo sequenciamento do 16S rRNA foram positivas na PCR do gene *cydB* específico para *S. aureus*. Além disso, foi encontrada uma cepa positiva para o gene *sea*, nove para o gene *cna*, uma para o gene *sei*, duas para o gene *sem*, uma para o gene *seg*, seis para o gene *seh*, 15 para o gene *eno* 11 para o gene *ebps* duas para o gene *fib* e 14 para o gene *fnbA*. Das cepas isoladas, apenas uma apresentou resistência a clindamicina, uma a vancomicina, uma para a rifampicina, nove para a penicilina, 15 para a eritromicina, duas para a ciprofloxacina e três para o cotrimoxazole. Resistência a dois antimicrobianos foi observado em oito cepas, a três antimicrobianos em uma cepa e a quatro antimicrobianos em uma cepa. Finalmente, sete das oito cepas de *S. aureus* foram positivas para a nova PCR em tempo real do gene *coa*, duas das 19 cepas *S. cromogenes* e a única cepa de *S. xylosus* também foram positivas. Em

conjunto, nossos achados sugerem que *S. agentis* e *S. chromogenes* podem ser identificados erroneamente como *S. aureus* pelos testes de aglutinação em látex, PCR para Sa442 PCR e Staphyclin latex enquanto MALDI-TOF MS e um teste de PCR *cydB* específico para *S. aureus* podem identificar com precisão *S. aureus* de leite de búfala e amostras ambientais e que estas cepas podem apresentar genes que codificam enterotoxinas e resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: Mastite, PCR espécie específica, enterotoxina

Staphylococcus COAGULASE NEGATIVE THAT ARE COAGULASE
PRODUCERS ISOLATED FROM BUBALINE MILK AND ENVIRONMENT CAN BE
MISIDENTIFIED AS *Staphylococcus aureus* BY PHENOTYPIC METHODS AND
MOLECULAR BIOLOGY

ABSTRACT -. Like cattle, buffalo may have mastitis, with *Staphylococcus aureus* being its main cause. However, it is possible that its prevalence may be overestimated. This study aimed to compare phenotypic and genotypic methods for *S. aureus* identification in samples of buffalo milk and milking environment as well as to propose a new quantitative real time PCR for its identification. For this, a total of 408 samples obtained from buffalo milk, milking environment and milkers hand, 32 presumed *S. aureus* strains were identified based on their characteristic phenotypic growth in Baird Parker agar, positive reactions of Gram and catalase, ability to coagulate rabbit plasma, and positive result in the species-specific Sa442 PCR assay. However, additional tests revealed that of these 32 strains, only 10 isolates tested positive for latex agglutination, including a *S. chromogenes* and a *S. agnetis*. Analysis of MALDI-TOF MS revealed that eight of the 32 strains were *S. aureus*, 19 were *S. chromogenes*, three were *S. agnetis* and one was *S. xylosus*. All eight strains identified as *S. aureus* by MALDI-TOF analysis and confirmed by 16S rRNA sequencing were positive in *S. aureus* specific *cydB* gene PCR. In addition, a positive strain was found for the *sea* gene, nine for the *cna* gene, one for the *sei* gene, two for the *sem*, one for the *seg* gene, six for the *seh* gene, 15 for the *eno* 11 gene for the gene *ebps* two for the *fib* gene and 14 for the *fnbA* gene. Of the isolates, only one showed resistance to clindamycin, one to vancomycin, one to rifampicin, nine to penicillin, 15 to erythromycin, two to ciprofloxacin and three to cotrimoxazole. Resistance to two antimicrobials was observed in eight strains, three antimicrobials in one strain and four antimicrobials in one strain. Finally, seven of the eight strains of *S. aureus* were positive for the new real-time PCR of the *coa* gene, two of the 19 *S. chromogenes* strains and the only strain of *S. xylosus* were also positive. Taken together, our findings suggest that *S. agnetis* and *S. chromogenes* can be misidentified as *S. aureus* by the agglutination assays of Sa442 PCR and Staphyclin latex while MALDI-TOF MS and a *cydB* PCR test specific for *S. aureus* can identify

with accurate *S. aureus* of buffalo milk and environmental samples and that these strains may have enterotoxin genes and antimicrobial resistance genes in buffaloes.

Key words: Mastitis, PCR specific species, enterotoxin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição dos oligonucleotídios utilizados para detecção de genes codificadores de adesinas, toxinas, resistência a meticilina e produção de biofilme nas cepas isoladas de leite bubalinos e ambiente de ordenha	16
Tabela 2. Genes de virulência das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha.....	20
Tabela 3: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (PSA) das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Análise do alinhamento do gene *cydB* de 14 cepas de *Staphylococcus* spp utilizando software CLC Sequence View 711
- Figura 2:** Alinhamento da região conservada do gene *coa*13

1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* destaca-se como um dos mais importantes patógenos responsáveis por causar a mastite contagiosa, doença que gera grandes prejuízos na bubalinocultura leiteira (ZAITOUN, 2008). No combate a esta enfermidade, a antibiótico-terapia contra o *S. aureus* é muitas vezes malsucedida e as falhas no tratamento podem levar à disseminação da infecção. Estas falhas estão relacionadas principalmente aos fatores de virulência que permitem a adesão, evasão da resposta imune do hospedeiro e a resistência aos antimicrobianos como por exemplo a capacidade de formação de biofilme e a produção da betalactamase. Como resultado, os animais com infecção crônica por *S. aureus* são frequentemente, precocemente, descartados (HAMED; ZAITOUN, 2014).

A identificação inicial de *S. aureus* é baseada em cultura e fenótipo em meio específico e o teste da coagulase livre em tubo; outros ensaios usados para identificá-lo são os testes de PCR Sa442, PCR do gene *nuc* e aglutinação de látex. O teste de PCR Sa442, desenvolvido por Martineau et al., 1998 é considerado específico para *S. aureus*; o gene *nuc* codifica uma termonuclease específica para esta espécie, enquanto kits de aglutinação de látex comercialmente disponíveis, como o teste de látex Staphaurex, são baseados na interação de proteínas de superfície de *S. aureus* com IgG humana e fibrinogênio ligadas a partículas de látex (STUTZ; STEPHAN; TASARA, 2011). No entanto, esses testes podem não ser precisos e podem levar a uma falsa identificação (TAKEUCHI et al., 2001; STUTZ; STEPHAN; TASARA, 2011). Neste estudo, é descrito como abordagens comuns de testes fenotípicos podem levar a erros de identificação de “não-*S. aureus*” como *S. aureus* e o desenvolvimento de um novo teste de PCR em tempo real para os genes *cydB* e coagulase (*coa*) podem ser usados para auxiliar na identificação precisa de *S. aureus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bubalinocultura leiteira

A espécie bubalina é uma das mais importante fonte de leite não bovina no mundo (13,2%), sendo que em alguns países, como por exemplo, na Índia a produção de leite de búfala chega a 55% do total de leite produzido (CATOZZI et al., 2017). No Brasil, a bubalinocultura é uma atividade recente, com o rebanho bubalino concentrado principalmente na região Norte do país com 65% do efetivo total (SANTOS et al., 2016a). A búfala é considerada como um animal extremamente eficiente, sendo também cultivado em outros países como na Europa, com aproximadamente 440.000 animais, principalmente na Itália (GUCCIONE, 2017). O principal interesse na criação de búfalas, é para a produção de derivados de leite, como a muçarela, devido ao fato de este apresentar uma grande quantidade de sólidos totais, principalmente gordura e proteína (BAILONE et al., 2017). Neste sentido, os bubalinos, assim como os bovinos, podem apresentar mastite, que é caracterizada como uma inflamação da glândula mamária de origem infecciosa ou não e que gera alterações na composição do leite (LANGONI et al., 2001), problemas na elaboração de derivados lácteos e riscos à saúde da população consumidora destes produtos (MUNGATANA et al., 2011)

2.2 Mastite estafilocócica

Dentre os microrganismos causadores de mastite clínica e subclínica em bubalinos e bovinos ao redor do mundo, destacam-se os *Staphylococcus* spp. e entre eles, o *S. aureus* é considerado como um dos mais importante agente contagioso (GUCCIONE et al., 2014), sendo transmitidos no momento da ordenha (PIZAURO et al., 2014). Os *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos que formam aglomerados de células que lembram cacho de uvas, anaeróbios facultativos, não esporulados, apresentam reação de catalase, coagulase (coagulação do plasma sanguíneo) positivos e são capazes de se multiplicarem em meio contendo 10% de cloreto de sódio. (SILVA et al., 2010). O papel dos

Staphylococcus coagulase negativo na mastite ainda não é completamente compreendido, sendo em algumas ocasiões considerados agentes oportunistas e em outras como agentes principais de mastites clínicas e subclínicas em bovinos e bubalinos (FRY et al., 2014). Neste quesito, a dificuldade de erradicação do *S. aureus* no rebanho leiteiro pode estar associada à infecção por cepas altamente transmissíveis, resistentes aos antimicrobianos e que possuem genes de virulência (WADE; LI; M. WAHL, 2013). Esses fatores contribuem para que a infecção se espalhe pelos animais, o que aumenta as perdas econômicas, principalmente em pequenas propriedades, que geralmente apresentam baixos níveis de controle sanitário (HAMED; ZAITOUN, 2014).

2.3 Fatores de Virulência e Resistência Antimicrobiana dos estafilococos

Dentre os principais fatores de virulência podemos citar a proteína A, a coagulase e a formação de biofilme (AGUILAR; ITURRALDE, 2001). Outros fatores de virulência são produzidos pelos estafilococos para escapar das defesas do hospedeiro, como proteínas de superfície celular, toxinas, algumas enzimas e várias adesinas (CASTELANI, 2012). O principal papel das proteínas de superfícies e exoproteínas é o de colonizar a glândula mamária (SALASIA et al., 2004). Dentre estas, a proteína A é reconhecida pela suas habilidade de ligar-se a região Fc das imunoglobulinas da maioria dos mamíferos (ALONSO; DAGGETT, 2000). Essa proteína é codificada pelo gene *spaA* que possui uma região polimórfica (X) e uma região conservada. A região polimórfica X consiste de um variável número de repetições de 24 pares de base localizada em uma região codificante do terminal C da parede celular (KOREEN et al., 2004).

As adesinas promovem a colonização das bactérias nos tecidos do hospedeiro. Elas são os principais componentes do MSCRAM (componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz), os quais, os genes que codificam a proteína ligadora ao colágeno (*cna*), proteína ligadora a laminina (*eno*), proteína ligadora a elastina (*ebpS*), proteína ligadora a fibronectina (*fnbA*) são os de maior importância (ZUNIGA et al., 2015). As toxinas, possuem atuações variadas, algumas são citotóxicas, superantígenos e outras degradam moléculas de adesão

das células epiteliais cutâneas. A coagulase tem a capacidade de transformar o fibrinogênio em fibrina através de um mecanismo diferente da coagulação natural e tem sido atribuído um papel importante na infecção intramamária (COELHO et al., 2009). Esta enzima é codificada pelo gene *coa* que também possui uma região polimórfica repetida e uma conservada, a região polimórfica consiste em uma repetição de 81 pares de base (COELHO et al., 2009). Além disso, esta enzima constitui o principal critério de identificação de *S. aureus* nos laboratórios de microbiologia ((TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2005). Outro fator agravante e que dificulta o controle da infecção por *Staphylococcus aureus* é representada por sua resistência aos antimicrobianos (PRIBUL et al., 2011). Essa resistência se deve principalmente ao uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos e comprometem a eficiência do tratamento da mastite por *S. aureus*, sendo que o surgimento de estirpes de *S. aureus* multirresistentes nas últimas décadas deve-se a esta seleção exercida pelos agentes antimicrobianos (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Dessa forma, o uso excessivo dos antimicrobianos contribuem para gerar cepas resistentes que podem ser transmitidas ao ser humano por meio da ingestão de produtos de origem animal (WHITE; MCDERMOTT, 2001). Além disso, a presença de resíduos de antibióticos no leite pode ocasionar reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos mais sensíveis, caracterizando assim um risco relevante à saúde pública (MARTINS et al., 2010).

2.4 Identificação

Dessa forma, a identificação rápida e direta dos *S. aureus* é imperativa para que os primeiros cuidados possam ser tomados. Em países em desenvolvimento, os testes fenotípicos são as formas principais de diagnóstico, no qual o teste da coagulase é usualmente usado para confirmação de *S. aureus* e embora efetivos, os resultados deste teste podem variar (KATEETE et al., 2010). Além disso, ocasionalmente, alguns organismos podem apresentar características bioquímicas que não se enquadram no padrão conhecido do gênero e espécie. (WOO et al., 2001). Outros testes comumente utilizados na identificação de *S. aureus* são a PCR do Sa442, gene *nuc* e teste de aglutinação do látex. A PCR do fragmento Sa442,

que foi desenvolvido por Martineau et al. (1998) tem como alvo um fragmento cromossômico que pensava-se ser específico para o *S. aureus*, o gene *nuc* codifica uma termonuclease espécie específica, enquanto que testes de aglutinação em látex é baseado na interação entre as proteínas ancoradas de superfície do *S. aureus* com a IgG humana e fibrinogênio aderidos a partículas de látex (STUTZ; STEPHAN; TASARA, 2011). Entretanto, estes métodos podem não ser tão precisos quanto inicialmente imaginado e podem levar a falsa identificação (STUTZ; STEPHAN; TASARA, 2011). Atualmente, o método de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDIT-TOF) é baseado na diferenciação dos perfis proteicos dos microrganismos e tem sido usado para diagnóstico microbiológico clínico na medicina humana (BENAGLI et al., 2011). Esta técnica já tem sido utilizada com sucesso para identificar *Staphylococcus* coagulase negativo de leite bovino (TOMAZI et al., 2014) mas sem estudos até o momento para o *S. aureus*. Portanto, é importante caracterizar *Staphylococcus* spp isolados de ambiente de ordenha e de leite bubalino, principalmente quanto ao uso de técnicas para a identificação de espécies, presença de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi comparar os métodos fenotípico e genotípico para a identificação de *S. aureus* e testar a confiabilidade dos mesmos para diagnóstico da mastite bubalina.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar *S. aureus* obtidos de leite bubalino e ambiente de ordenha pelos métodos fenotípicos e por biologia molecular.
- Comparar a acurácia dos métodos fenotípicos e moleculares para a identificação de *S. aureus*
Realizar a busca dos principais genes que compõem o sistema MSCRAMM (componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva) *eno*, *cna*, *ebps*, *fib* e *fnbA*.
- Realizar a busca do gene (*mecA*) responsável pela resistência a meticilina
- Realizar a busca dos genes responsáveis pela produção de toxinas como a toxina do tóxico (*tst*), toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*) e enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sei*, *seq*, *sem*, *seg* e *seh*).
- Desenhar um novo primer para uma região conservada do gene *coa* para facilitar a detecção deste gene em cepas de *S. aureus* coagulase positivos.
- Desenhar um novo primer para o gene da *cydB* e avaliar sua eficiência na identificação de *S. aureus*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Amostras de leite de cada quarto mamário foram coletadas de 80 búfalas, selecionadas ao acaso em uma fazenda leiteira situada no município de Analândia, estado de São Paulo, Brasil, de novembro de 2013 a abril de 2014, totalizando 320 amostras de leite. Após o exame clínico da glândula mamária (RADOSTITS et al., 2007), foi feita a assepsia dos tetos com álcool 70% e o leite de cada quarto mamário foi examinado pelos teste da caneca de fundo escuro para detecção de mastite clínica e o “California Mastitis Test” (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957) para detecção de mastite subclínica. Amostras de mão de 16 ordenhadores e 64 amostras de teteiras foram coletadas utilizando suabes estéreis (Pro-lab Diagnostics) e armazenados em água peptonada como previamente descrito por Silva et al. (2000).

4.2 Identificação dos *Staphylococcus* spp. coagulase positiva

O Isolamento e identificação do *S. aureus* foi realizado de acordo com “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (SWANSON J.; PETRAN L.; HANLIN, 2001). Após o crescimento por 24h a 37 em agar Braid Parker e as amostras que obtiveram estirpes identificadas presuntivamente como *S. aureus* foram testados para reação de Gram e catalase, produção de hemólise em ágar sangue e habilidade de produzir coagulase livre em tubo (CAPURRO et al., 2010), pelo teste de coagulação de plasma de coelho através do kit comercial Coagu-Plama kit (Laborclin, Pinhais, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Neste teste, como controle positivo, foi utilizado a cepa *S. aureus* ATCC 25293 e *S. epidermidis* ATCC. 12228 como controle negativo. Adicionalmente, os isolados foram testados, individualmente, pelo teste do látex (Laborclin, Pinhais, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA, uma colônia de cada estirpe acima identificada como *Staphylococcus* coagulase positivo foi inoculada em tubo contendo 5 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C por 18h. Em seguida, procedeu-se a extração do DNA genômico através do método de Kuramae-Izioka. (1997) com modificações. Um mL de cultura bacteriana foi transferida para microtubos de 2 mL, centrifugados a 13.400 x g por 2 minutos e o pellet de células foi suspenso em 700 µL de tampão de extração [160mM Tris- HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 20mM NaCl e SDS 0.5% (p/v)]. A suspensão de células foi homogeneizada através de agitação e incubada em banho de água a 65 C por 40 minutos, agitada a cada 10 min. Em seguida, 300 µL de acetato de potássio 5M foi adicionado e a solução homogeneizada e incubada em gelo por 30 min com inversões a cada 15 minutos. Após essa incubação, as amostras foram retiradas do gelo e 650 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isomálico [24:1 (v/v)] foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 1000 µL de etanol absoluto refrigerado. A mistura de etanol e sobrenadante foi misturada por inversão e foi acondicionada a -20°C “overnight”. Em seguida, foi centrifugada a 13.400 x g por 10 min a 10°C. Os pellets de DNA resultante foram secos em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspensos em 30 µL de TE (10 µM Tris-HCl, pH 7.3, 0.1 µM EDTA)

4.4 Identificação dos *S. aureus* pelo Sa442

Os isolados foram caracterizados usando o teste da PCR desenvolvido por Martineau et al. (1998) com algumas pequenas modificações. Os oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados a uma concentração de 10 pmol/µl em 25 µL de reação contendo 50 ng/µl de DNA e 20 µl de “LightCycler® 480 SYBER Green Master mix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)”. Os parâmetros de amplificação foram: um ciclo a 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 10 s, 55°C por 20 s, e 72°C por 12 s em um termociclador de PCR em tempo real Roche LightCycler® 480

(LC480). As taxas de rampa foram de 4,4°C/s; 2,2°C/s e 4,4°C/s, respectivamente. Para testar possíveis reações cruzadas, foram utilizados DNAs de *Staphylococcus chromogenes* e *Streptococcus suis* e água como controle negativo e as cepas de *S. aureus* COL, NewMan, MW2, Mu50 e ATCC 25923 foram usadas como controles positivos. Adicionalmente, uma curva de melting (62°C) foi feita para confirmar um único produto.

4.5 Especificação por Ionização/ dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF)

A identificação dos *Staphylococcus* coagulase positiva ao nível de espécie foi realizada por espectrofotometria de massa, utilizando o sistema MALDI-TOF “Bruker Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, EUA)” no Laboratório de Saúde Animal da Universidade de Guelph, Guelph, Ontário, Canadá. Os resultados foram analisados usando o software “Biotyper 3.0”, que incluiu mais de 5500 espectros de referência. Para análise MALDI-TOF, culturas puras dos *Staphylococcus* coagulase positivo foram cultivadas em ágar sangue de carneiro a 5% por 24 h. Utilizando uma alça descartável, uma pequena quantidade de crescimento bacteriano foi transferida para uma placa alvo “BC” de aço polido “MSP 96” (Microflex LT, Bruker Daltonics / BD, Alemanha, EUA), em seguida, 1 mL de Matriz [ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA)] foi adicionado e as placas foram secas em temperatura ambiente de 1 à 2 min. Os espectros de massa resultantes foram analisados e comparados com os espectros de referência. A identificação bacteriana ao nível da espécie foi analisada de acordo com valores em escores; se o valor do escore foi igual ou maior que 2,00, pôde-se confirmar a identificação da espécie. Um valor de pontuação entre 1,70 e 1,99 foi aceito como identificação acurada para gênero e identificação presuntiva para espécie.

4.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA

O sequenciamento do gene 16S rRNA (1000 pb) foi realizado no Laboratório de Saúde Animal da Universidade de Guelph, Guelph, Ontario e as sequências

foram comparadas com o gene 16S rRNA de *Staphylococcus aureus* MCRF184 (CP014791.1) e outros *Staphylococcus* spp. sequências “GenBank” usando “blastn”.

4.7 Desenho dos oligonucleotídios espécie específico do gene *cydB*

Os Pares de iniciadores de PCR foram desenhados com base nas sequências do gene *cydB* da citocromo ubiquinol oxidase d subunidade II de 14 *Staphylococcus* spp. (isto é, *S. aureus* (NC_007795.1), *S. epidermidis* (NZ_JZUL01000001.1-1), *S. haemolyticus* (NZ_JFOJ01000002.1), *S. warneri* (ACPZ01000027.1-1), *S. xylosus* (NZ_CP007208.1), *S. chromogenes* (JMJF01000001.1), *S. saprophyticus* (AP008934.1-1), *S. caprae* (GL545272.1), *S. agnetis* (NZ_CP009623.1), *S. hominis* (NZ_AKGC01000038.1-1), *S. equorum* (NZ_CAJL01000020.1), *S. sciuri* (NZ_LDTK01000063.1), *S. pasteurii* (CP004014.1), *S. hyicus* (NZ_CP008747.1)) obtidos da base de dados de nucleotídeos NCBI. Estas sequências foram alinhados pela primeira vez usando a ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local Blast (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e o software CLC Sequence View 7 para procurar por regiões específicas (Fig. 1). Com base nessas análises, os primers foram projetados usando o software PrimerQuest (Integrated DNA technologies, Inc.). Análises para a detecção do gene *cydB* também foram feitas por PCR “in silico” utilizando o programa <http://insilico.ehu.es/PCR/> para as espécies que possuíam sequências disponíveis no banco de dados do programa. O tamanho da sequência previstos para o produto do *S. aureus* foi de 432 pb e foi confirmado por sequenciamento de DNA (Laboratory Sciences Division, Laboratório Agrícola e Agroalimentar, Guelph). O sequenciamento do gene 16S rRNA também foi realizado para confirmar a identidade dos isolados de *S. aureus* positivo para *cydB* qPCR. Adicionalmente, 84 cepas de 84 *Staphylococcus* spp isolados de leite bubalino (PIZAURO et al., 2017) foram testados usando este teste de PCR para o gene *cydB* específico para *S. aureus*.

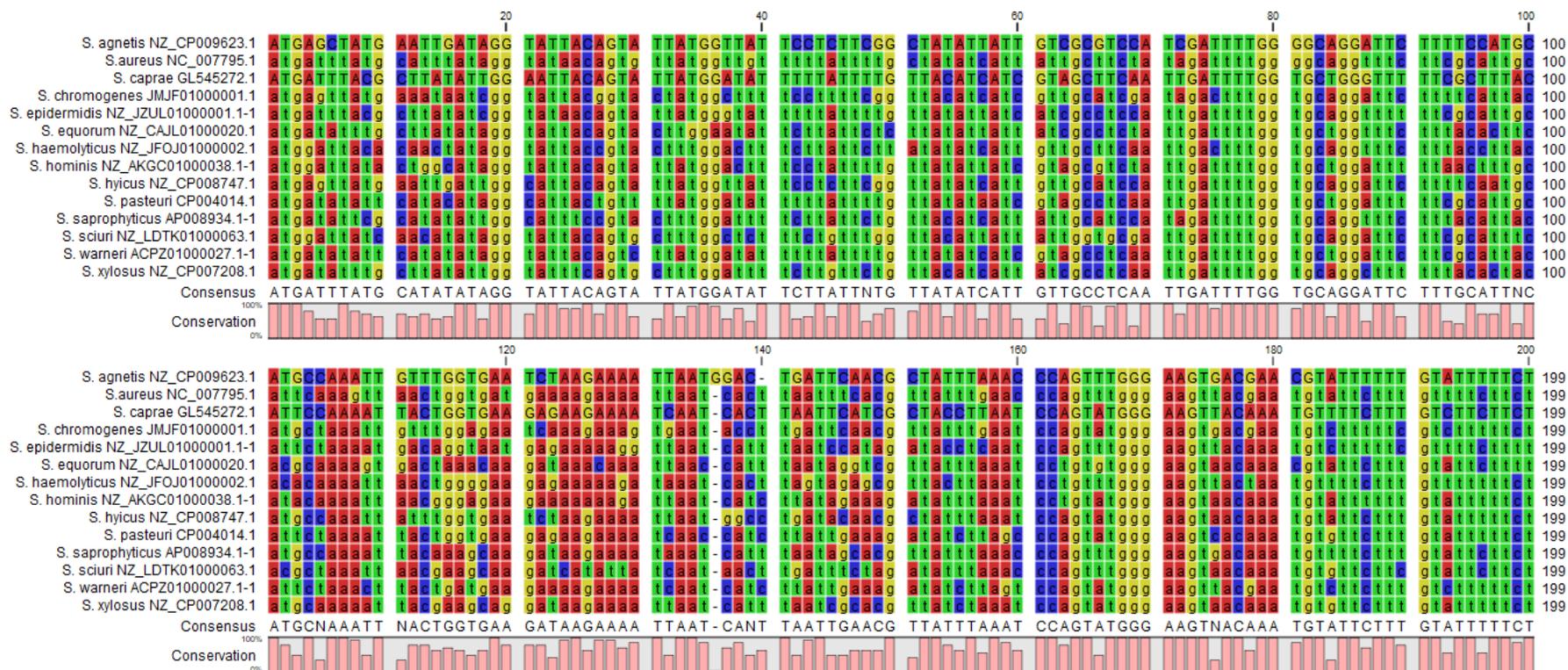


Figura 1: Análise do alinhamento do gene *cydB* de 14 cepas de *Staphylococcus* spp utilizando software CLC Sequence View

4.8 Desenho dos oligonucleotídios para o gene da coagulase (*coa*)

Os oligonucleotídios desenvolvidos para o gene *coa* geram produtos de tamanhos diferentes (WALKER et al., 1998). Assim, um novo par de oligonucleotídios foi desenvolvido (*coaF* e *coaR*; tabela 1) utilizando o software PrimerQuest (Integrated DNA technologies, Inc. <http://www.idtdna.com>) para o gene da coagulase do do *S. aureus* JCSC 7638 (AB488509.1). Uma região conservada do gene foi identificada através do alinhamento de 103 amostras no GenBank através do software “CLC Sequence View” versão 8.0 (figura 2)

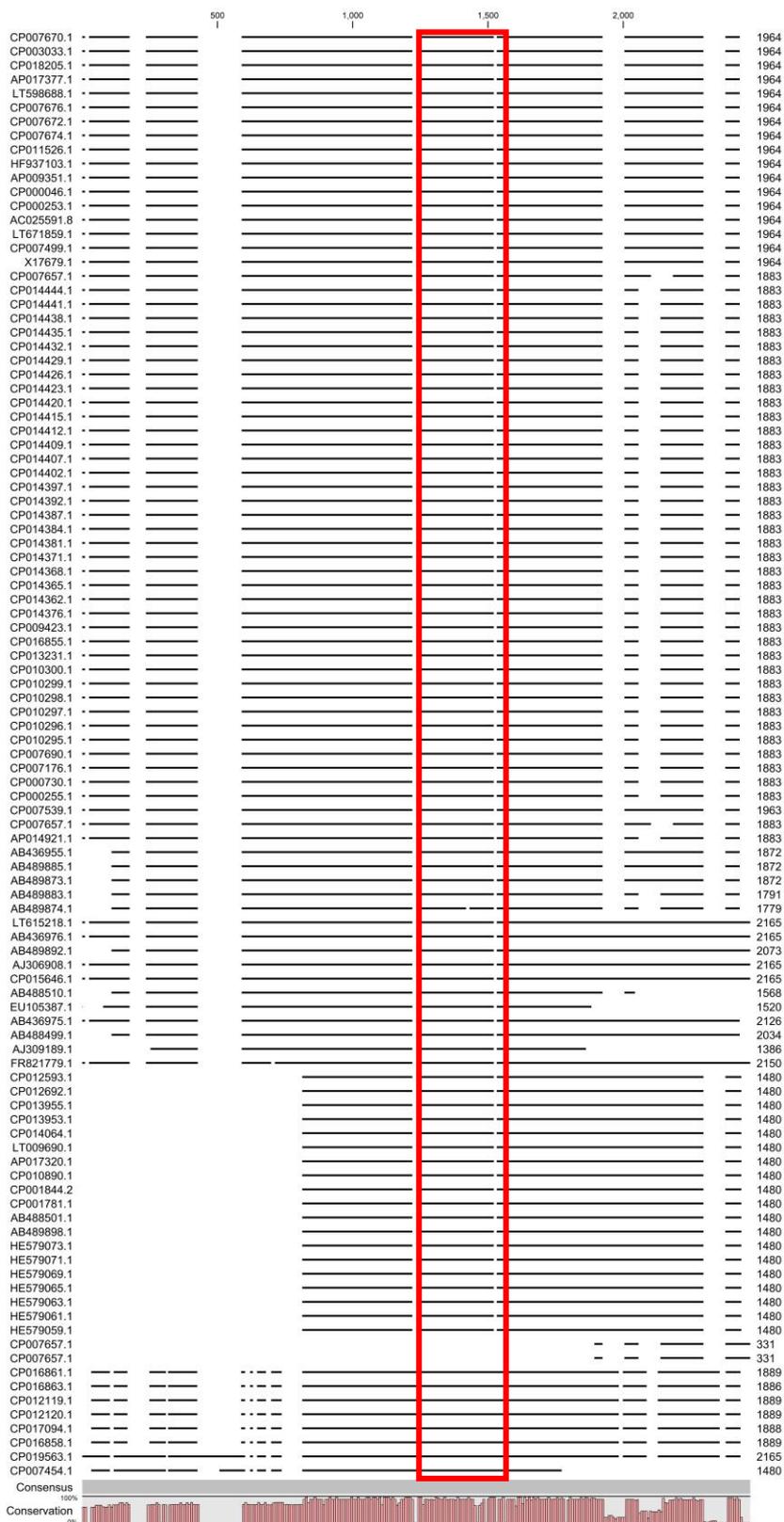


Figura 2: Representação parcial do alinhamento do gene *coa* das 103 amostras obtidos pelo software *CLC Sequence View* com a região utilizada em realce (Retângulo vermelho)

4.9 PCR em Tempo Real dos genes de virulência (*mecA*, *tsst-1*, *eta*, *etb*, *sea*, *sec*, *cna*, *seb*, *sei*, *seq*, *sem*, *seg*, *see*, *eno*, *ebps*, *fib*, *fnbA*), *cydB* e *coa*

Para a detecção dos genes de virulência por PCR em tempo real, foram utilizados os oligonucleotídeos na tabela 1 a uma concentração de 10 pmol/ μ L e volume total de 25 μ L de reação contendo 50 ng/ μ L de DNA e 20 μ L de mix “SYBER Green Master Light Cyler 480” (LC480) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Para as amplificações dos genes os parâmetros foram: um ciclo a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 10s, 55°C por 20s e 72°C por 25s em um termociclador de PCR em tempo real Roche Light. Cyler 480 (LC480). As taxas de rampa foram de 4,4°C/s; 2,2°C/s e 4,4°C/s, respectivamente; DNA de *Streptococcus suis* e água foram utilizados como controles negativos. Além disso, uma etapa de curva de melting (62 °C) foi realizada para confirmar um único produto. As estirpes de *S. aureus* COL, NewMan, MW2, Mu50 e ATCC 25923 foram utilizadas como controles positivos. Todos os PCR em tempo real foram realizados em triplicata.

4.10 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, as estirpes isoladas foram cultivadas “overnight” à 37 °C em tubos contendo 5 mL de BHI. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas assepticamente em tubos contendo 4 mL de solução salina estéril até a turbidez ser idêntica à da solução padrão de cloreto de bário (preparada pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário a 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1% (v / v)). As culturas diluídas foram plaqueadas com o auxílio de suabes estéreis em placas de ágar Mueller-Hinton; deixando secar por 3 min, então os discos de antibióticos (SENSIFAR E MULTIFAR-CEFAR®) foram adicionados (BAUER et al., 1966; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INTITUTE, 2007). Os halos de inibição foram medidos utilizando uma régua milimétrica após incubação a 37°C por no mínimo 18h e máximo 24h. Os diâmetros (em mm) foram comparados com os padrões fornecidos pelo fabricante. Os discos antibióticos utilizados foram: cefepima (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), cloranfenicol (30 μ g), clindamicina (2 mg), eritromicina (15 μ g),

gentamicina (10 mg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 Un), rifampicina (30 µg), sulfazotrina (25 mcg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg). *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizado como controle positivo.

Tabela 1 Descrição dos oligonucleotídios utilizados para detecção de genes codificadores de adesinas, toxinas, resistência a meticilina e produção de biofilme nas cepas isoladas de de leite bubalinos e ambiente de ordenha.

Categoria	Gene	Orientação 5'-3'	Sequência (5'- 3')	Produto	Referência
Coagulase	<i>coa</i>	F	GTCTTGAAAGTAGCTCATCTAAACTTG	228	Este estudo
		R	ATCCAAATGTTCCATCGTTGTATTC		
Identificação	<i>sa442</i>	F	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	108	(MARTINEAU et al., 1998)
		R	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA		
	<i>cydB</i>	F	CCCATTTGCTTGGTCTGTAGTA	432	Este estudo
		R	GTCCAGCCCATTCTGGATTA		
	<i>tsst</i>	F	AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA	306	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG		
	<i>eta</i>	F	CGCTGCGGACATTCCTACATGG	676	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	TACATGCCCGCCACTTGCTTGT		
	<i>etb</i>	F	GAAGCAGCCAAAAACCCATCGAA	419	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	TGTTGTCCGCCTTTACCACTGTGAA		
Produção de toxinas	<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)

Continua

		R	AACTCTCTGCTTGACCA		2012)
	<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	TAACTTACCGTGGACCCTTC		
	<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	TGTGCTTGACCATGCTCTTC (
	<i>cna</i>	F	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA	192	(ARCIOLA et al., 2005)
		R	AGTGCCTTCCCAAACCTTTT		
Resistência metilina	a <i>mecA</i>	F	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310	(PANIAGUA-CONTRERAS et al., 2012)
		R	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA		

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação preliminar dos *Staphylococcus* spp.

Das 408 amostras obtidas, 7% (32) foram cepas putativas de *S. aureus* com base em seu fenótipo característico em ágar Baird Parker, em seguida, foram selecionadas aquelas que também foram Gram positivas, catalase positivas e positivas no ensaio de PCR Sa442 de Martineau et al. (1998) específico para o *S. aureus*. Em testes adicionais, 24 amostras foram consistentemente positivas no teste de coagulase; enquanto oito deram pelo menos um resultado discordante. Além disso, 21 das 32 cepas putativas de *S. aureus* foram β -hemolíticas, duas foram α -hemolíticas e nove não apresentaram hemólise.

5.2 Teste do látex, identificação pelo MALDI-TOF e sequenciamento 16S rRNA

Das estirpes putativamente identificadas como *S. aureus* (32), 31,2% (10) foram positivas no teste de aglutinação do látex. Entretanto, a análise MALDI-TOF MS revelou que apenas 25,0% (8) eram *S. aureus*, sendo o restante 59,4% *S. chromogenes* (19), 9,37% *S. agnetis* (3), 3,12% *S. xylosus* (1) e 3,12% *S. cohnii* (1) (Tabela 2). Todas as oito estirpes identificadas como *S. aureus* por análise de MALDI-TOF tiveram 100% de identidade com o gene 16S rRNA de *Staphylococcus aureus* MCRF184 (NZ_CP014791.1).

5.3 Análise e detecção do gene *cydB*

O alinhamento das sequências genômicas de *Staphylococcus* spp. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sugeriram que o gene *cydB* é bem conservado nos *Staphylococcus* spp. permitindo o desenho de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos. Os oito isolados de *S. aureus* previamente identificados foram positivos para os iniciadores de *cydB* específicos de *S. aureus* e com seus produtos de amplificação resultantes com 99-100% de identidade com o *S. aureus* NCTC 8325. Além disso, os iniciadores para o gene *cydB* específicos para

S. aureus não amplificaram nenhum dos outros estafilococos coagulase positivo testado neste estudo nem 84 estirpes de outros estafilococos coagulase negativos putativos avaliados por Pizauro et al. (2017).

5.4 Genes de virulência

Das 32 cepas isoladas, apenas 3,12% (1) foi positiva para o gene *sea* que codifica a enterotoxina A, 28,1% (9) foram positivos para o gene *cna*, 3,12% (1) foi positiva para o gene *sei*, 6,25% (2) foram positivas para o gene *sem*, 3,12 (1) para o gene *seg*, 18,7% (6) para o gene *seh*, 46,8% (15) para o gene *eno*, 34,4% (11) para o gene *ebps*, 6,25% (2) para o gene *fib* e 43,7%(14) para o gene *fnbA* (tabela 2)

5.5 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Das estirpes isoladas, apenas 3,12% (1) apresentou resistência à clindamicina, 3,12% (1) à vancomicina, 3,12% (1) para rifampicina, 28,1% (9) para a penicilina, 46,8% (15) para a eritromicina, 6,25% (2) para a ciprofloxacina e 9,37% (3) para o cotrimoxazole. Além disso, resistência a dois antimicrobianos foi observado em 25,0% (8) das estirpes, três antimicrobianos em 3,12% (1) estirpe e a quatro antimicrobianos em 3,12% (1) estirpe (tabela 3).

Tabela 2. Genes de virulência das cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha

Espécie	gene																	
	<i>tst</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>she</i>	<i>eno</i>	<i>ebps</i>	<i>fib</i>	<i>fnbA</i>	<i>coa</i>
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	1	-	7	-	1	-	2	1	6	6	7	2	7	7
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	6	2	-	4	2
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>S. equorun</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
<i>S. agnetis</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-
<i>S. xylosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

Tabela 3: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (PSA) das cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha

Espécie	PSA ^{1,2}	Clin	Van	Clo	Rif	Cef	Oxa	Pen	Eri	Cip	Gen	Cot	Tet
		[%]	[%]	[%]	[n ^o , %]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
<i>S. aureus</i>	S	100%	87,5%	100%	100%	100%	100%	75%	25%	75%	100%	75%	100%
	R	0%	12,5 %	0%	0%	0%	0%	25%	75%	25%	0%	25%	0%
<i>S. chromogenes</i>	S	94,4%	100%	100%	94,4%	100%	100%	72,3%	55,6%	100%	100%	94,4%	100%
	R	5,55%	0	0	5,55%	0	0	27,7%	44,4%	0	0	5,55%	0
<i>S. cohnii</i>	S	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	100%
	R	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
<i>S. equorun</i>	S	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	R	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>S. agnetis</i>	S	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	R	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>S. xylosus</i>	S	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	R	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%

¹ Clin = Clindamicina, Van = Vancomicina, Clo = Cloranfenicol, Rif = Rifampicina, Cef = Ceftiofur, Oxa = Oxacilina, Pen = Penicilina, Eri = eritromicina, Cip = Ciprofloxacina, Gen = Gentamicina, Cot = Cotrimoxazole, Tet = Tetraciclina

² S = sensível, R = resistente

6. DISCUSSÃO

Alguns *Staphylococcus* spp. tipicamente coagulase negativo como 59,3% (19) isolados de *S. chromogenes* (19/32), 3,12% *S. xylosus* (1/32), 3,12% *S. cohnii* (1/32) e 9,37% *S. agnetis* (3/32) foram coagulase positivos. Esse achado é consistente com estudos de Santos et al. (2016b) em que 23/42 dos *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) coagularam plasma de coelho. Estes autores sugeriram que este fenótipo está relacionado a pulsotipos específicos. A presença de coagulase é um indicador de patogenicidade pois permite às bactérias resistirem à fagocitose e causar infecções crônicas (VIANA et al., 2010). Estas adaptações específicas ao hospedeiro podem ser adquiridas através de elementos genéticos móveis (MGEs) (VIANA et al., 2010) de *S. aureus* próximos (VIANA et al., 2010) ou outros *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP), como o *S. pseudintermedius* (SANTOS et al., 2016b). Assim, a presença do gene *coa* em SCN com os oligonucleotídeos para este gene descritos neste estudo podem ser o resultado dessa transferência horizontal de genes. A atividade da coagulase nas estirpes negativas para o gene *coa* no presente estudo também pode estar relacionada a outro gene, como o descrito em *S. chromogenes*, que compartilha 41% de identidade com o gene da coagulase previsto para o *S. pseudintermedius* (SANTOS et al., 2016b)

Não foi detectado o gene (*tst*) que codifica a toxina do choque tóxico e os genes (*eta* e *etb*) das toxinas esfoliativas A e B nas amostras. Entretanto, foram detectados os genes *sea* 3,12% (1), *sei* 3,12% (1), *sem* 6,25% (2), *seg* 3,12% (1), *seh* 18,7% (6) que codificam as enterotoxinas A, I M G e H, respectivamente. Apenas 6,25% (2) cepas tiveram mais de um gene de toxina simultaneamente. Apesar de alguns estudos investigarem o potencial toxigênico dos SCN e sua enterotoxina no desenvolvimento de intoxicações alimentares (MARTINS et al., 2017), estes genes foram detectados apenas nas cepas identificadas como *S. aureus*. O fato de esses genes terem sido encontrados em algumas cepas de SCN, não significa que eles o expressem, mas devem ser consideradas como produtoras em potencial (JØRGENSEN et al., 2005). A detecção de genes de enterotoxinas em amostras de *S. aureus* provenientes de mastite já foram obtidas anteriormente e

acredita-se que desempenhem um papel importante na infecção da glândula mamária (CARFORA et al., 2015; PAJIĆ et al., 2016).

A produção de biofilme tem sido associada à persistência da infecção intramamária, pois protege as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e dos antimicrobianos (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). Avaliação de alguns dos genes que codificam o MSCRAMM (componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva) nas estirpes deste estudo, os mais comumente presentes foram *eno* (46,8%), *fnbA* (43,7%), *cna* (28,1%) e *ebps* (34,3%). O gene *fib* foi encontrado em apenas dois isolados dos SCP. Esses resultados estão em concordância parcial com os observados por Zuniga et al. (2015) cujos resultados indicam que, em bovinos, os genes mais frequentes em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite foram *eno* (72%), *fnbA* (71,7%), *fib* (60%), *ebps* (17%) e *cna* (5,7%) e pode indicar que, em búfalos, o gene *fib* pode não ser tão importante quanto os genes *eno*, *fnbA*, *ebps* e *cna*. Entretanto estudos com estes genes em isolados de búfalas são escassos. Além disso, o gene *fnbA*, que tem um papel importante na invasão bacteriana, adesão, inibição de fagocitoses e pode prevenir a remoção bacteriana durante a lactação (IKAWATY et al., 2010), sendo mais detectado em *S. aureus* a partir de amostras de leite o que corrobora para o seu papel de agente principal de mastite crônica. Um dos fatos mais importantes é que esses genes também estavam presentes em amostras de *S. aureus* obtidos das mãos dos ordenhadores, reforçando o efeito de que as cepas do ambiente são portadoras de genes de virulência (CAPURRO et al., 2010).

Foi observada uma resistência à penicilina (28,1%) e à eritromicina (46,8%) neste estudo, sendo que destas, o *S. chromogenes* foi responsável por 53,3% das estirpes resistentes a eritromicina e 55,5% das estirpes resistentes a penicilina. Apesar de neste estudo estes isolados terem demonstrado a capacidade de coagular plasma de coelho, os *Staphylococcus* coagulase negativo possuem um estilo mais comensal e estão espalhados pelo ambiente, normalmente servindo como disseminadores da transferência de resistência aos antimicrobianos (PIESSENS et al., 2012). Esses resultados estão de acordo com o fato de que a resistência aos antimicrobianos estão associados a virulência (PIESSENS et al., 2012) já que as

cepas que apresentaram a maior frequência de resistência foram as que adquiriram a capacidade de coagular o plasma de coelho. Uma explicação a este resultado, poderia ser atribuído o fato de que, o ambiente possui uma grande variedade de populações microbianas que facilita a transferência lateral de genes quando comparada ao ambiente relativamente estéril do úbere (PIESSENS et al., 2012)

Neste estudo, os não *S. aureus* capazes de coagular plasma de coelho (*S. chromogenes*, *S. agnetis*, *S. cohnii* e *S. xylosus*) também foram positivos para a PCR do Sa442. Este é o primeiro relato de reações falso positivas com essas espécies; no entanto, outras cepas/rebanhos devem ser testadas para se saber se esses achados podem/devem ser generalizados. Quando as sequências dos iniciadores Sa442 (MARTINEAU et al., 1998a) foram comparadas com o genoma disponível da estirpe *S. chromogenes* MU 970 (NZ_JMJF00000000.1), não foi detectada homologia significativa; no entanto, esse genoma não está completo e pode estar faltando a região contendo as sequências desta região compatível. Além de ter sido estabelecido como único para *S. aureus*, o fragmento Sa442 ainda não foi profundamente caracterizado (KLAASSEN; DE VALK; HORREVORTS, 2003). Além disso, Klaassen; De Valk; Horrevorts. (2003) e Heilmann et al. (2004) relataram resultados falso negativos com o teste Sa442 e a PCR do gene está sujeito à variação das cepas (HOEGH et al., 2014). Os testes de aglutinação em látex também podem ser problemáticos. Em estudos anteriores, resultados falso positivos foram observados em frequências relativamente baixas como 7,9% (IDELEVICH et al., 2014) e 9,3% [(BES; ETIENNE; ZBINDEN, 2001). O maior número de reações de falso positivo neste estudo (20%) pode ter sido relacionado à estrutura populacional e/ou ao tamanho da amostra ser relativamente pequeno.

Dado o impacto que o *S. aureus* pode ter na saúde humana e animal, o seu diagnóstico preciso é importante (PANTOSTI, 2012). A identificação errônea de espécies de *Staphylococcus* spp. mais benignas como *S. aureus*, embora possivelmente menos grave, não está isenta de consequências econômicas significativas. No presente estudo, as oito cepas de *S. aureus* (identificadas por sequenciamento de 16 sRNA e MALDI-TOF) foram positivas com nosso novo teste de PCR do gene *cydB* específico para *S. aureus*, enquanto não houve amplificação com estafilococos que foram positivos para o Sa442 e para o teste da coagulase.

Além disso, pode-se notar que *S. caprae*, *S. hyicus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. equorum*, *S. sciuri* e *S. pasteurii* foram negativos para este primer específico para o *S. aureus* provenientes de um estudo complementar (PIZAURO et al., 2017) (Tabela 2).

7. CONCLUSÕES

- Testes fenotípicos e genotípicos usados rotineiramente para identificação de *S. aureus* podem resultar em falso positivos.
- A técnica de espectrofotometria de massa, MALDI-TOF, associada a PCR em tempo real do gene *cydB* e *coa* foram mais satisfatórios na identificação de *S. aureus*.
- Estirpes de *Staphylococcus* coagulase positivo não *S. aureus* podem apresentar genes que compõem o sistema MSCRAMM (componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva) *eno*, *cna*, *ebps*, *fib* e *fnbA*.
- Apesar de não ter sido encontrado o gene de resistência a meticilina (*mecA*) nos isolados, estes apresentaram resistência aos antimicrobianos, principalmente a penicilina e eritromicina, fato que gera preocupação, principalmente pelo comportamento zoonótico dos *Staphylococcus* spp
- Apesar de não ter sido encontrado os genes responsáveis pela produção de toxinas como a toxina da Síndrome do tóxico (*tsst*) e toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*), foram encontrados os genes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sei*, *seq*, *sem*, *seg* e *seh*) reforçando a importância dos *S. aureus* na saúde pública

8. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 165–175, 2001.
- ALONSO, D. O. V.; DAGGETT, V. Staphylococcal protein A: Unfolding pathways, unfolded states, and differences between the B and E domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 133–138, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>%5Cn<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.1.133>>.
- 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.
- BAILONE, R. L.; BORRA, R. C.; ROÇA, R. de O.; DE AGUIAR, L.; HARRIS, M. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (*bubalus bubalis bubalis*) in different farms and seasons in Brazil. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–6, abr. 1966. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707>>. Acesso em: 15 jul. 2016.
- 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.
- BES, L. E.; ETIENNE, J.; ZBINDEN, R. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 1, p. 86–89, 2001.
- CAMARGO, G. de; ASPILCUETA-BORQUIS, R.; FORTES, M.; PORTO-NETO, R.; CARDOSO, D.; SANTOS, D.; LEHNERT, S.; REVERTER, A.; MOORE, S.; TONHATI, H. Prospecting major genes in dairy buffaloes. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 872, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2->

s2.0-

84945538612&partnerID=tZOtx3y1%5Cnhttp://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-

84945538612&partnerID=40&md5=ac1771bf28dc7bdc768155d500a463a1>.

CAPURRO, A.; ASPÁN, A.; UNNERSTAD, H. E.; WALLER, K. P.; ARTURSSON, K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 180–191, 2010.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.009>>.

CASTELANI, L. Perfil de resistência, genótipos de virulência e genotipagem de *Staphylococcus aureus* associados à mastite. 2012. Disponível em: <<http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1332429199.pdf>>.

CATOZZI, C.; SANCHEZ BONASTRE, A.; FRANCINO, O.; LECCHI, C.; DE CARLO, E.; VECCHIO, D.; MARTUCCIELLO, A.; FRAULO, P.; BRONZO, V.; CUSCÓ, A.; D'ANDREANO, S.; CECILIANI, F. The microbiota of water buffalo milk during mastitis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–20, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l: s.n.]v. 27

COELHO, S. M. O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I. a.; SOARES, L. C.; DEMO, M.; BOGNI, C.; SOUZA, M. M. S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 369–374, 2009.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em paúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 0103-8478, p. 1315–1320, 2004.

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>>.

GUCCIONE, J. Mastitis in Mediterranean Buffaloes. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 2, n. 5, p. 1–4, 2017. Disponível em:

<<https://juniperpublishers.com/jdvs/JDVS.MS.ID.555596.php>>.

GUCCIONE, J.; PESCE, A.; PASCALE, M.; TOMMASINI, N.; GAROFALO, F.; DI LORIA, A.; CORTESE, L.; SALZANO, C.; CIARAMELLA, P. Short communication: effects of systemic treatment with penethamate hydriodide on udder health and milk yields in dry primiparous Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal of dairy science**, v. 97, n. 4, p. 2219–25, 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214001313>>.

HAMED, M. I.; ZAITOUN, A. M. A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis in dairy buffaloes farms. **International Journal of Livestock Research**, v. 4, n. 3, 2014.

HEILMANN, F.; VAN DER ZANDEN, A.; REUBSAET, F.; WANNET, W. Identification of 2,600 clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in the Netherlands yielded sporadic cases of strains negative for the species-specific Sa442 gene fragment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2350, 2004.

HOEGH, S. V.; SKOV, M. N.; BOYE, K.; WORNING, P.; JENSEN, T. G.; KEMP, M. Variations in the *Staphylococcus aureus*-specific *nuc* gene can potentially lead to misidentification of methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. PART 7, p. 1020–1022, 2014.

IDELEVICH, E. A.; WALTHER, T.; MOLINARO, S.; LI, X.; XIA, G.; WIESER, A.; PETERS, G.; PESCHEL, A.; BECKER, K. Bacteriophage-based latex agglutination test for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3394–3398, 2014.

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.

JØRGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by

enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 2, p. 267–272, 2005.

KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A.; OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, p. 1–7, 2010.

KLAASSEN, C. H. W.; DE VALK, H. A.; HORREVORTS, A. M. Clinical *Staphylococcus aureus* isolate negative for the Sa442 fragment [5]. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4493, 2003.

KOREEN, L.; GRAVISS, S. V.; RAMASWAMY, E. A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B. N. spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 2, p. 792–799, 2004.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.1.133>>.

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.

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.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 618–623, 1998a.

MARTINS, K. B.; FACCIOLI, P. Y.; BONESSO, M. F.; FERNANDES, S.; OLIVEIRA, A. A.; DANTAS, A.; ZAFALON, L. F.; CUNHA, M. de L. R. S. Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2184–2195, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217300413>>.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G. da; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. de A. Prevalência E Etiologia Infeciosa 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%5B%5D=5085&path%5B%5D=8093>>.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 398–407, 2006.

MUNGATANA, N. K.; NGURE, R. M.; SHITANDI, A.; ONYIEGO, B.; MUTUMBA, M. Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 360–364, ago. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.2011.00672.x>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

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.

PAJIĆ, M.; BOBOŠ, S.; VELEBIT, B.; RAŠIĆ, Z.; KATIC, V.; RADINOVIĆ, M.; NIKOLIĆ, A.; SIMONOVIĆ, D.; BABIĆ, M. Prevalence and molecular characterization of enterotoxin-producing strains of *staphylococcus aureus* isolated from serbian dairy cows. **Acta Veterinaria**, v. 66, n. 4, p. 466–477, 2016.

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. 02, n. 04, p. 476–487, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=25847>>.

PANTOSTI, A. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health** **Frontiers in Microbiology**, 2012. .

PIESSENS, V.; DE VliegHER, S.; VERBIST, B.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRIKX, M.; VAN COILLIE, E. Characterization of coagulase-negative *staphylococcus* species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips.

Journal of dairy science, v. 95, n. 12, p. 7027–38, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030212006911>>.

PIZAURO, L. J. L.; DE ALMEIDA, C. C.; SOLTES, G. A.; SLAVIC, D.; ROSSI-JUNIOR, O. D.; DE ÁVILA, F. A.; ZAFALON, L. F.; MACINNES, J. I. Species level identification of coagulase negative Staphylococcus spp. from buffalo using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and cydB real-time quantitative PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 204, n. March, p. 8–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.036>>.

PIZAURO, L. J. L.; SILVA, D. G.; SANTANA, A. M.; CLEMENTE, V.; LARA, G. H. B.; LISTONI, F. J. P.; VAZ, A. C. N.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; RIBEIRO, M. G.; FAGLIARI, J. J. Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Anápolis, São Paulo State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1703–1710, 2014.

PRIBUL, B. .; PEREIRA, I. .; SOARES, L. .; COELHO, S. M. .; BARBERIS, I. .; PASCUAL, L.; SOUZA, M. M. . Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de Lactobacillus spp em Staphylococcus aureus isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 744–748, 2011.

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**. [s.l: s.n.]p. 673–763.

SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LAMMLER, C.; ZSCHOCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of veterinary science (Suwon-si, Korea)**, v. 5, n. 2, p. 103–109, 2004.

SANTOS, C. L. R. dos; SANTOS JÚNIOR, J. B. dos; CUNHA, M. C. da; NUNES, S. R. F.; BEZERRA, D. C.; TORRES JÚNIOR, J. R. de S.; CHAVES, N. P. Nível tecnológico e organizacional da cadeia produtiva da bubalinocultura de corte no estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 0, p. 1–8, 2016a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572016000100201&lng=pt&tlng=pt>.

SANTOS, D. C. dos; LANGE, C. C.; AVELLAR-COSTA, P.; SANTOS, K. R. N. dos; BRITO, M. A. V. P.; 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, 2016b.

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.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. [s.l.: s.n.]

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 103–106, jun. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 15 jul. 2016.

STUTZ, K.; STEPHAN, R.; TASARA, T. *SpA*, *ClfA*, and *FnbA* genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 638–646, 2011.

SWANSON J., K. M.; PETRAN L., R.; HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association, Washington, DC**, v. 4th editio, p. 53–62, 2001.

TAKEUCHI, S.; MAEDA, T.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA, Y. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 79, n. 3, p. 267–74, 2001.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; DE CAMPOS BRAGA, P. A. P. A. P. A.; PRADA E SILVA, L. F.; EBERLIN, M. N.; DOS SANTOS, M. V.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; DE CAMPOS BRAGA, P. A. P. A. 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.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiology**. 4ed. ed. [s.l: s.n.]p. 175–182.

VIANA, D.; BLANCO, J.; TORMO-MÁS, M. Á.; SELVA, L.; GUINANE, C. M.; BASELGA, R.; CORPA, J. M.; LASA, Í.; NOVICK, R. P.; FITZGERALD, J. R.; PENADÉS, J. R. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1583–1594, 2010.

WADE, M.; LI, Y.-C.; M. WAHL, G. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 83–96, 2013.

WALKER, J.; BORROW, R.; EDWARDS-JONES, V.; OPPENHEIM, B. a; FOX, a J. Epidemiological characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the North West of England by protein A (*spa*) and coagulase (*coa*) gene polymorphisms. **Epidemiology and Infection**, v. 121, p. 507–514, 1998.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E151–E155, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030201702093>>.

WOO, P. C. Y.; LEUNG, A. S. P.; LEUNG, K. W.; YUEN, K. Y. Identification of slide coagulase positive, tube coagulase negative *Staphylococcus aureus* by 16S ribosomal RNA gene sequencing. **Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology**, v. 54, n. 4, p. 244–247, 2001.

ZAITOUN, A. M. A. Clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* in dairy buffaloes. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 54, n. 119, p. 289–310, 2008.

ZUNIGA, E.; MELVILLE, P. A.; SAIDENBERG, A. B. S.; LAES, M. A.; GONSALES, F. F.; SALABERRY, S. R. S.; GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; DOS SANTOS, F. G. B.; LINCOPAN, N. E.; BENITES, N. R. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. **Microbial Pathogenesis**, v. 89, p. 1–6, 2015.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, um número significativo de estirpes de SCN foram capazes de coagular o plasma de coelho e foram positivos para o teste de PCR Sa442 e, portanto, podem ser erroneamente classificados como *S. aureus* o que pode ocasionar custos ao produtor com tratamento e descarte desnecessário de animais. As bases desses fenótipos continuam a ser determinadas, mas podem ser o resultado da transferência lateral de genes ou o fato de essas espécies serem menos homogêneas do que se pensava anteriormente. Por outro lado, a técnica de MALDI-TOF e o teste de PCR em tempo real específico para o gene *cydB* desenvolvido neste estudo permitem a identificação precisa do *S. aureus*. Além disso, cepas de *S. aureus* de ambiente de ordenha, mão de ordenadores e leite bubalino podem albergar resistência a antimicrobianos e produção de enterotoxinas acarretando risco a saúde pública.