

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 03/02/2018.

**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, 57 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:



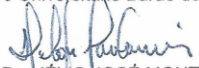
Pesquisador Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON  
EMBRAPA / São Carlos, SP



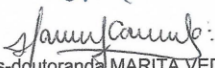
Pesquisador Dr. MAURICIO DE ALVARENGA MUDADU  
Bioinformática / EMBRAPA - Campinas, SP



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 Àvila**, 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 .....                                                                                                      | 329 |
| 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 rifanmpicina, 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

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Principais fatores de virulência dos estafilococos. ....                                                                                                                                                                            | 6  |
| <b>Tabela 2.</b> - 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 |
| <b>Tabela 3.</b> 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 |
| <b>Tabela 4.</b> 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 |
| <b>Tabela 5.</b> 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 |
| <b>Tabela 6.</b> 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 |
| <b>Tabela 7.</b> 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 |
| <b>Tabela 8.</b> 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

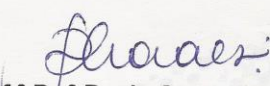
**Figura 10.** Resistência dos SCN isolados de amostras de leite bubalino frente aos princípios ativos antimicrobianos.....37

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.

## 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.; HAESEBROUCK, 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*) híbridas 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>>  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22621371>>  
<<http://www.pubmedcentral.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](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 amostras 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.

LANGONI<sup>1</sup>, H.; DOMINGUES<sup>1</sup>, P. F.; FILHO<sup>2</sup>, 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 Infecciosa 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](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 Infecciosas**. 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](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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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.; PENA, 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.