

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS FENOTÍPICA E GENOTÍPICA, *mecA* E *vanA* E EXPRESSÃO GÊNICA EM ESTAFILOCOCOS SCP E SCN ISOLADOS DE MASTITE BOVINA”.

FELIPE DE FREITAS GUIMARÃES

Botucatu – SP
Fevereiro/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ENTEROTOXINAS E
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS FENOTÍPICA E GENOTÍPICA,
mecA E *vanA* E EXPRESSÃO GÊNICA EM ESTAFILOCOCOS SCP E SCN
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA”.**

Felipe de Freitas Guimarães

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Titular Dr. Hélio Langoni

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Guimarães, Felipe de Freitas.

Detecção de genes codificadores de enterotoxinas e resistência aos antimicrobianos fenotípica e genotípica, *mecA* e *vanA* e expressão gênica em estafilococos SCP e SCN isolados de mastite bovina / Felipe de Freitas Guimarães. - Botucatu, 2015

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2015

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502000

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite. 3. Expressão gênica. 4. Enterotoxinas. 5. Estafilococos. 6. Infecções estafilocócicas. 7. Genes.

Palavras-chave: Mastite bovina, identificação fenotípica e genotípica de SCN e SCP, enterotoxinas, genes *mecA* e *vanA*, PCR, RT-PCR, expressão gênica

Felipe de Freitas Guimarães

Deteção de genes codificadores de enterotoxinas, do gene *vanA* de resistência à vancomicina e expressão gênica em estafilococos isolados nas mastites bovinas .

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Hélio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adjunto Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Assistente Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Titular Dr. Nilson Benites

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP – São Paulo/SP

Profa. Dra. Acácia Orieth Elias

Membro Titular

Coordenação disciplinas EaD - Cursos Semipresenciais

Universidade de Santo Amaro –UNISA- São Paulo/SP

Prof. Adjunto Dr. Paulo Francisco Domingues

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Associado Dr. Marcos Veiga dos Santos

Membro Suplente

Departamento de Nutrição e Produção Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - Pirassununga/SP

Profa. Associado Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

Membro Suplente

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP – São Paulo/SP

Defesa: 05/02/2015. Local: FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu/SP.

DEDICATÓRIA

A Deus, por tudo que sempre me proporcionou...

à Família

Em especial minha mãe Elizabeth, o melhor exemplo que poderia ter em minha vida, de coragem, dedicação, determinação e amor.

Ao meu pai Antônio Eduardo (in memoriam), apesar do breve convívio que tivemos, sempre estará comigo.

Aos meus avós Lizabeth (in memoriam) e Nadyr (in memoriam) pessoas iluminadas que muito influenciaram em minha criação.

Aos meus "outros Pais" Ruth e João Luiz, pessoas maravilhosas, e apesar da distância física, não há padrinhos mais presentes.

À minha namorada e companheira Luísa, alguém com quem compartilho meu amor, ela é muito importante para mim.

Aos meus filhos Boomer, Chico, Farofa, Maíada, Rabuja, Totti e Selminha (in memoriam), e netos, como seria sem graça a vida sem eles.

Por todos procuro evoluir e sempre desempenhar o melhor para que se orgulhem de mim, o tanto que eu me orgulho de todos.

AGRADECIMENTOS

AO meu orientador e amigo Prof. Hélio Langoni, por quem tenho grande respeito e admiração, acreditou e investiu desde minha residência, com paciência, confiança, conhecimentos e à sua esposa Aparecida Langoni pelo carinho durante todos esses anos.

Aos meus Familiares, Silvana, tia Maria e tio Beto (in memoriam), Víctor Hugo (in memoriam), Tio Chico (in memoriam) e tia Mariázinha, Conceição, Patrícia, Cristiano, Helton, Célia, Arnaldo, Ana Regina, Zé Paulo, Pedrinho muito obrigado por todo carinho.

Aos meus afilhados e sobrinhos, Gabriel, Víctor, Lucas, Bruno, Arthur, Vincenzo, Guilherme, sabemos quando estamos ficando velhos, quando nos eventos há mais crianças que adultos.

Aos meus irmãos Danilo Bononi, Gabriel Pedroso e Lucas Pedroso desde nossa infância estamos juntos e continuaremos.

Aos meus irmãos de república Felipe e João Marcelo grandes amigos para vida.

Aos meus amigos de São Paulo Emi, Mau, Guara, Cris, Dudu, Digo, Milena e Melina, Lara, Michelle, Carol, nossos encontros estão cada vez mais difíceis, saudades de vocês.

Aos colegas e amigos Rodrigo Costa da Silva, Sâmea Fernandes Joaquim, Marcela de Pinho Manzi, Ariane Nascimento, Virgínia Bodelão por toda ajuda com o projeto.

Aos amigos de Botucatu, uns foram, outros chegaram, mas a turma é sempre animada, Selene, Juliana, Veridiana (Skond), Luana (pelioço), Muriel (Gina), Mariana (Zaca), Osvaldo (Netão),

Fabiano(Ritchie), Gustavo Lara, Janaína, Luciana, Gão, Síd, Barrika, Guigo, Kejo, Papa, Profs, Hugo...

Aos meus amigos de pós-graduação e residentes, Anelise, Gabriela, Gustavo, Lucilene, Leila, Carla, Raíssa, Ubirajara, Patrícia, Diego por todo apoio em todos esses anos.

À Minha Professora querida, Acácia Orieth Elias, graças a ela acabei vindo para cá, muito obrigado pelos ensinamentos e oportunidades.

A todos os professores do DHVSP muito obrigada. Principalmente aos professores Antônio Carlos Paes, Jane Megid, Marcio Garcia Ribeiro pelos ensinamentos e principalmente por todo cuidado e atenção que proporcionaram ao meu filhote Boomer quando esteve internado. E Prof. Paulo Francisco Domingues que muito contribuiu em minha formação.

Ao Prof. José Carlos Pantoja por toda ajuda na publicação de artigos e análise estatística.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), principalmente ao técnico do laboratório de Zoonoses, Benedito D. Menozzi

À Fapesp pela concessão da bolsa de Doutorado (2011/21142-2) e de auxílio pesquisa (2011/21323-7).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados bioquímicos e do sequenciamento do gene <i>rpob</i> nas 150 linhagens de SCN isolados do leite em casos de mastite bovina. Botucatu-SP, 2015.....	32
Tabela 2. Resultados bioquímicos e do sequenciamento do gene <i>rpob</i> nas 150 linhagens de SCP isolados do leite de vacas. Botucatu-SP, 2015.....	33
Tabela 3. Resistência “in vitro” aos antimicrobianos de 150 linhagens de estafilococos coagulase negativa (SCN) de casos de mastite bovina avaliados no teste de difusão com discos. Botucatu-SP, 2015.....	35
Tabela 4. Resistência “in vitro” aos antimicrobianos de 150 linhagens de estafilococos coagulase positiva (SCP) de casos de mastite bovina avaliados no teste de difusão com discos. Botucatu-SP, 2015.....	36
Tabela 5. Resistência e sensibilidade em linhagens de SCP e SCN aos antimicrobianos. Botucatu-SP, 2015.....	37
Tabela 6. Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) à Vancomicina de acordo com as espécies de estafilococos isoladas de leite de vacas. Botucatu-SP, 2015.....	38
Tabela 7. Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) à Oxacilina de acordo com as espécies de estafilococos isoladas de leite de vacas. Botucatu-SP, 2015.....	38
Tabela 8. Associação entre a presença do gene <i>mecA</i> e resistência a oxacilina nas linhagens de SCN e SCP isolados de leite em casos de mastite bovina. Botucatu-SP, 2015.....	39
Tabela 9. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas em linhagens SCP e SCN isolados de casos de mastite bovina. Botucatu-SP. 2015.....	43

Tabela 10. Frequência dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas nas principais espécies SCN isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2015.....44

Tabela 11. Frequência dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas nos principais espécies SCP isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2015.....45

Tabela 12. Linhagens de SCN e *S. aureus* em relação à CCS das amostras de leite dos casos de mastite bovina das quais foram isoladas. Botucatu, SP.2015.....46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécies SCN isoladas de casos de mastite bovina identificadas e apresentadas em porcentagem. Botucatu-SP. 2015.....	33
Figura 2. Espécies SCP isoladas de casos de mastite bovina identificadas e apresentadas em porcentagem. Botucatu-SP. 2015.....	34
Figura 3. Genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de SCN isoladas de mastite bovina. Botucatu-SP.2015.....	42
Figura 4. Genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de SCP isoladas de mastite bovina. Botucatu-SP.2015.....	42

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Principais características de produção, rebanho bovino e instalações das fazendas estudadas. Botucatu-SP, 2015.....	20
Quadro 2. Principais características de manejo de vacas em fazendas estudadas. Botucatu-SP, 2015.....	21
Quadro 3. Sequência das bases, localização dentro dos genes e tamanhos dos produtos amplificados pelos <i>primers</i> oligonucleotídeos toxina-específicos utilizados na reação de PCR para detecção de genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> , <i>sej</i> , <i>sek</i> , <i>sel</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>sep</i> , <i>seq</i> , <i>ser</i> , <i>seu</i> codificadores de enterotoxinas. Botucatu-SP, 2015.....	25
Quadro 4. Condições para PCR de genes codificadores de enterotoxinas de estafilococos isolados do leite em casos de mastite bovina. Botucatu-SP, 2015.....	26
Quadro 5. Frequência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em linhagens de SCP e SCN isoladas de casos de mastite em bovinos em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2015.....	41

LISTA DE ABREVIATURA

PCR	reação em cadeia pela polimerase
RT-PCR	reação em cadeia pela polimerase transcriptase reversa
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
TSST-1	Toxina 1 da Síndrome do Choque tóxico
SE	Enterotoxina Estafilocócica
CCS	Contagem de Células Somáticas
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
UFC	unidades formadoras de colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
CMT	California Mastitis Test
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
PBP	proteína ligante à penicilina
VISA	<i>S. aureus</i> resistência intermediária à vancomicina

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Amostras.....	18
4.2. Coleta de leite dos animais.....	18
4.3. Diagnóstico do processo inflamatório.....	18
4.4. Identificação de SCN e SCP	22
4.5. Sensibilidade microbiana “ <i>in vitro</i> ”.....	23
4.6. CIM de estafilococos à vancomicina e oxacilina.....	23
4.7. Extração do DNA.....	24
4.8. Primers utilizados.....	24
4.9. Detecção dos genes codificadores de enterotoxinas.....	26
4.10. Visualização dos produtos amplificados.....	27
4.11. Extração do RNA.	27
4.12. Obtenção do cDNA.....	27
4.13. Detecção do gene <i>rpob</i>	28
4.14. Sequenciamento.....	28
4.15. Pesquisa do gene <i>vanA</i> e <i>mecA</i>	29
4.16. Análises estatísticas.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Identificação fenotípica e genotípica de SCP e SCN.....	31
5.2. Resistência aos antimicrobianos.....	34
5.3. Resistência à vancomicina e oxacilina e pesquisa do gene <i>mecA</i> e <i>vanA</i> ...38	
5.4. Genes codificadores de enterotoxinas.....	40
5.5. Expressão de enterotoxinas.....	45
5.6. Relação da intensidade da reação inflamatória entre SCN e <i>S. aureus</i>45	
6. DISCUSSÃO	47
6.1. Identificação fenotípica e genotípica de SCP e SCN.....	48
6.2. Genes codificadores de enterotoxinas.....	51
6.3. Expressão de enterotoxinas....	52
6.4. Relação da intensidade da reação inflamatória entre SCN e <i>S. aureus</i>53	
6.5. Resistência aos antimicrobianos.....	54

6.6. Resistência à vancomicina e oxacilina e pesquisa do gene <i>mecA</i> e <i>vanA</i> ...	55
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
9. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	81

GUIMARÃES, F.F. **Detecção de genes codificadores de enterotoxinas e resistência aos antimicrobianos fenotípica e genotípica, *mecA* e *vanA* e expressão gênica em estafilococos SCP e SCN isolados de mastite bovina.** Botucatu, 2015. 127p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Foram estudados 300 estafilococos isolados de casos de mastite bovina de diferentes propriedades do estado de São Paulo: 150 *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e 150 *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). A presença de genes para produção de enterotoxinas foi detectada pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e a expressão gênica pela PCR transcriptase reversa (RT-PCR). Os isolados foram submetidos ao perfil de sensibilidade correlacionada com a detecção dos genes *mecA* e *vanA*, pela técnica de PCR. Os 150 SCN isolados foram identificados como sendo: 48 (32%) *S. warneri*, 22(15%) *S. epidermidis*, 20(13%) *S. hyicus*, 10(7%) *S. xylosus*, 7(5%) *S. haemolyticus*, 6(4%) *S. simulans*, 6(4%) *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, 6(4%) *S. hominis*, 5(3%) *S. pasteurii*, 4(2,7%) *S. cohnii*, 3(2%) *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* 3(2%) *S. chromogenes* 3(2%) *S. sciuri*, 2(1%) *S. saccharolyticus*, 2(1%) *S. lugdunensis*, 1(0,7%) *S. auricularis*, 1(0,7%) *S. saprophyticus* subsp. *bovis* e 1(0,7%) *S. capitis*. Entre os SCP foram isolados: 105 (70%) *S. aureus*, 21(14%), *S. hyicus*, 19(13%), *S. intermedius* e 5(3%) *S. schleiferi* subsp *coagulans*. A concordância entre a identificação fenotípica e genotípica do total de linhagens de SCN e SCP foi de 96,7% e 98,7%, respectivamente. Foram detectados genes codificadores para enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*) e outras enterotoxinas (*see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*) em 175 (58%) dos 300 *Staphylococcus* spp. pesquisados. Estes genes foram detectados em 109 (73%) dos SCN isolados, resultado significativamente maior que entre SCP 66 (44%), $P < 0,0001$. Entre os 109 SCN foram detectados genes codificadores de enterotoxinas nas seguintes espécies: 37(33,9%) *S. warneri*, 17(15,6%) *S. epidermidis*, 16(14,7%) *S. hyicus*, 5(4,6%) *S. xylosus*, 5(4,6%) *S. haemolyticus*, 4(3,7%) *S. simulans*, 4(3,7%) *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, 4(3,7%) *S. homini*, 4(3,7%) *S. pasteurii*, 3(2,7%) *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, 3(2,7%) *S. cohnii*, 3(2,7%) *S. chromogenes*, 2(1,8%) *S. sciuri*, 1(0,9%) *S. lugdunensis* e 1(0,9%) *S. capitis*. Nos 66 SCP estes genes foram encontrados nas seguintes espécies: 48 (73 %) *S. aureus*, 10(15%) *S. hyicus*, 7(11%) *S. intermedius* e 2(3%) *S. schleiferi* subsp *coagulans*. As espécies *S. aureus* e *S. warneri* foram as que mais apresentaram genes codificadores de enterotoxinas. Entre os genes codificadores de enterotoxinas clássicas *sea* foi predominante entre os isolados: 61 SCN (56%) e 29 SCP (44%). Entre SCN a presença dos seguintes genes codificadores de enterotoxina foi observada: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sem*, *sen*, *seo*. Entre SCP foram evidenciados: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sen*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*. Foi detectada tanto a presença de apenas um destes genes como de outros concomitantemente. Verificou-se simultaneamente em um isolado de *S. warneri* cinco diferentes genes (*sec*, *sed*, *sem*, *sen*, *seo*) e em outro isolado de *S. aureus* cinco genes (*see*, *seg*, *sem*, *sen*, *seo*). Nos SCP a principal resistência foi observada aos betalactâmicos, à penicilina em 54 (36 %) isolados, à ampicilina em 51 (34%), à

oxacilina 25 (16,7%) enquanto nos foi observada SCN resistência à penicilina em 37 (24,7%), à ampicilina 34 (22,7%) e à oxacilina 20 (13,3%) dos isolados. O gene *mecA* foi detectado em 17(11%) SCN isolados, em 44(29%) nos SCP, somente em *S. aureus*. A resistência dos isolados de origem bovina à oxacilina, antibiótico de primeira escolha na terapia de infecções estafilocócicas em humanos, é preocupante em saúde pública e, quando há insucesso no tratamento, a vancomicina é o antibiótico preconizado. O gene *vanA*, que codifica a resistência à vancomicina não foi detectado nos isolados avaliados. A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo E-test não demonstrou resistência à vancomicina entre os isolados. Entretanto foi verificada resistência intermediária a este antimicrobiano. O presente estudo contribuiu para evidenciar o potencial risco à segurança alimentar dos consumidores do leite e derivados ao avaliar fatores de virulência e resistência em SCP e SCN isolados da mastite bovina

Palavras-chave: Mastite bovina, identificação fenotípica e genotípica de SCN e SCP, enterotoxinas, genes *mecA* e *vanA*, PCR, RT-PCR, expressão gênica.

GUIMARÃES, F.F. **Detection of enterotoxins encoding genes, phenotypic and genotypic antimicrobial resistance, *mecA* and *vanA* and genic expression in bovine mastitis cases by staphylococcus coagulase positive and negative isolates.** Botucatu, 2015. 127 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

A total of 300 isolates of bovine mastitis cases from several Brazilian dairy herds were studied, respectively: 150 CPS and 150 CNS strains. The isolates were analyzed to enterotoxins codifying genes by Polymerase Chain Reaction (PCR). Gene expression was evaluated by reverse transcription PCR (RT-PCR). The isolates were subjected to sensitivity profile correlated with the detection of *mecA* and *vanA* gene by PCR. Among the CNS the following species were identified: 48 (32%) *S. warneri*, 22(15%) *S. epidermidis*, 20(13%) *S. hyicus*, 10(7%) *S. xylosus*, 7(5%) *S. haemolyticus*, 6(4%) *S. simulans*, 6(4%) *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, 6(4%) *S. hominis*, 5(3%) *S. pasteurii*, 4(2.7%) *S. cohnii*, 3(2%) *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* 3(2%) *S. chromogenes* 3(2%) *S. sciuri*, 2(1%) *S. saccharolyticus*, 2(1%) *S. lugdunensis*, 1(0.7%) *S. auricularis*, 1(0.7%) *S. saprophyticus* subsp. *bovis* and 1(0.7%) *S. capitis*. Among the 150 CPS: 105 (70%) *S. aureus*, 21(14%), *S. hyicus*, 19(13%), *S. intermedius* and 5(3%) *S. schleiferi* subsp *coagulans*. The identification by phenotypic and genotypic tests showed a concordance of 96.7% in the CNS isolates, and 98.7% in the CPS. The codifying genes to enterotoxins production were detected to classical and enterotoxin-like in 175 (58%) out of 300 *staphylococci* isolates. These genes were detected significantly higher among the CNS (73%) in relation to CPS (44%), $P < 0.0001$. In 109 CNS codifying genes to enterotoxins were detected in the following species: 37(33.9%) *S. warneri*, 17(15.6%) *S. epidermidis*, 16(14.7%) *S. hyicus*, 5(4.6%) *S. xylosus*, 5(4.6%) *S. haemolyticus*, 4(3.7%) *S. simulans*, 4(3.7%) *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, 4(3.7%) *S. homini*, 4(3.7%) *S. pasteurii*, 3(2.7%) *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, 3(2.7%) *S. cohnii*, 3(2.7%) *S. chromogenes*, 2(1.8%) *S. sciuri*, 1(0.9%) *S. lugdunensis* and 1(0.9%) *S. capitis*. Among the 66 CPS, the enterotoxin genes were observed in the following species: 48(73 %) *S. aureus*, 10(15%) *S. hyicus*, 7(11%) *S. intermedius* and 2(3%) *S. schleiferi* subsp *coagulans*. The species *S. aureus* and *S. warneri* showed the highest presence of these genes whereas it was not detected statistical difference. The major enterotoxin codifying gene observed was *sea* 61(56%) in the CNS and 29 (44%) in the CPS. In the CNS the presence of the following enterotoxin genes were verified: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sem*, *sen*, *seo*. This genes were found alone. as well as, concomitantly with others enterotoxin codifying genes. In the CPS the presence of the following enterotoxin genes were observed: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sen*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*. In one *S. warneri* isolate were detected five different genes (*sec*, *sed*, *sem*, *sen*, *seo*) and, another *S. aureus* isolate showed concomitantly five genes (*see*, *seg*, *sem*, *sen*, *seo*). The main

antimicrobial resistance observed in the CPS were toward the betalactamics: penicilin 54 (36%); ampicillin 51(34%); oxacillin 25 (16.7%). Also, among the CNS were toward the betalactamics: penicillin 37(24.7%), ampicillin 34(22.7%), and oxacillin 20(13.3%). The gene *mecA* was detected in 17(11%) SCN isolates and among the SCP 44(29%), it were verified only in *S.aureus* isolates. The resistance os strains to oxacillin, is a Public Health concern, since this antimicrobial is first choice to human therapy in the staphylococcal infection cases. The vancomycin is the second choice to human therapy. The gene *vanA*, that codify vancomycin resistance was researched among the isolates, whereas it was not detected. The E-test vancomycin MIC did not showed vancomycin resistance, nevertheless, the intermediate resistance were observed in some isolates. The main contribution of the present study was the detection of virulence factors among CPS and CNS isolates from mastitis cases, emphasizing the potential risk to the consumers of milk and dairies.

Keywords: bovine mastitis, CNS and CPS phenotypic and genotypic identification, PCR, RT-PCR, genic expression, enterotoxins, *vanA* gene, *mecA* gene

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O leite é o primeiro alimento consumido após o nascimento, processo no qual ocorre transmissão de imunidade passiva. É considerado uma das principais fontes de nutrientes na alimentação humana e animal. Apresenta composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente cálcio) essenciais à saúde. A qualidade do leite é fundamental para preservar a saúde de quem o consome e tem como principal parâmetro o perfil microbiológico do produto. Este é diretamente associado à carga microbiana inicial e à taxa de multiplicação microbiana (COSTA, 2005).

A produção de leite no Brasil deve aumentar 5% em 2014, conforme projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Se confirmado o aumento, a produção nacional deverá atingir 36,75 bilhões de litros em 2014. Em 2013, a produção leiteira foi de 35 bilhões de litros, sendo 35% a mais que os 26 bilhões contabilizados em 2007.

Em 2007, foram produzidos 26.134 bilhões de litros, dos quais apenas 18 bilhões sob inspeção (EMBRAPA, 2008). Estimativas oficiais assinalaram o comércio informal de 48% do leite produzido no país sem qualquer fiscalização sanitária e, em 2013, estimou-se o equivalente a 33% da produção de leite sem fiscalização. Aliado à comercialização irregular e indevida, ressalta-se o hábito da utilização do produto “*in natura*”, tanto para consumo, como fabricação de derivados lácteos. Deve-se considerar, ainda, a utilização inadvertida ou mesmo deliberada do leite de animais com mastite. O conjunto desses fatores alerta para o risco, em potencial, à saúde pública, pela veiculação de micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas para os humanos pelo consumo de leite (ABPL, 1999; CONAB, 2013).

A mastite bovina é a mais importante doença que compromete a produção leiteira mundialmente, pela alta prevalência e por determinar elevado prejuízo econômico devido principalmente à redução na produção e as penalidades decorrentes do comprometimento da qualidade, custos com tratamento e descarte prematuro de animais (SEEGERS et al., 2003). A mastite é causada por um amplo espectro de micro-organismos que invadem o canal do teto e se multiplicam na cisterna do úbere (CARRILLO-CASAS; MIRANDA-MORALES, 2012). Na mastite, inflamação da glândula mamária, a

severidade do processo inflamatório depende do agente etiológico e da resposta de defesa do hospedeiro, da qual participam as células residentes e as recrutadas da circulação para o lúmen da glândula mamária (BANERMAN et al. 2004; BARKENA et al., 2006; PETZL et al., 2012). Entre os agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um dos principais, causando mastites predominantemente subclínicas e crônicas. Ressalte-se que as mastites subclínicas e crônicas são responsáveis por aproximadamente 80% da casuística pelos altos custos, por reduzir a produção e comprometer a qualidade do leite (SHIM et al., 2004).

A importância de *S. aureus* como agente infeccioso causador de doenças em humanos e nos animais é reconhecida à muito tempo e, mais recentemente, outras espécies do gênero *Staphylococcus* [*Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN)] assumiram destaque em patologias animais, particularmente na mastite bovina (PYORALA et al., 2008; FOX, 2009; PANTOJA et al., 2009; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009; SAMPIMON et al., 2009 SWARTZ et al., 2010; de FREITAS GUIMARAES et al., 2014) e em patologias humanas, principalmente em casos de infecções hospitalares e surtos de intoxicações e/ou toxi-infecções alimentares (CUNHA et al., 2006, ROWLINSON et al., 2006).

A intoxicação estafilocócica ocorre frequentemente por ingestão das toxinas termoestáveis produzidas e liberadas pela bactéria, durante a multiplicação no alimento, e podem permanecer viáveis após tratamento térmico. As intoxicações e/ou toxi-infecções alimentares é um problema em países em desenvolvimento, bem como nos desenvolvidos (ALCARÃS et al., 1997).

Dados da European Food Safety Authority relatou que, em 2008, as toxinas bacterianas foram envolvidas em 525 de 5.332 surtos de intoxicação por alimentos (9,8%) em toda Europa. Entre as toxinas bacterianas, enterotoxinas estafilocócicas (Ses) foram envolvidas em 291 dos 525 surtos notificados de intoxicação alimentar (55,4%), ou 5,5% de todos os surtos notificados.

No Brasil, ainda que os dados epidemiológicos de enfermidades sejam subestimados, são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite e de derivados contaminados, exigindo cuidados para se assegurar a

integridade e qualidade dos produtos lácteos destinados ao consumo humano, sob o ponto de vista de saúde pública (MONDAINI, 1996).

O potencial risco zoonótico devido à possibilidade da transmissão de estafilococos e/ou das suas toxinas termo-resistentes aos consumidores de leite e laticínios constitui sério risco à saúde pública. A multiplicidade e diversidade de espécies do género *Staphylococcus* associadas à etiologia da mastite bovina evidenciam a necessidade da identificação, caracterização do perfil virulência e a resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de casos de mastite bovina, para permitir um melhor dimensionamento do problema e equacionamento de adoção de medidas preventivas factíveis.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

A mastite é uma enfermidade complexa e de etiologia múltipla (LANGONI et al. 1998). Pode ser de ordem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica, hormonal e, principalmente, infecciosa. A doença impacta negativamente a pecuária leiteira, tanto pelos prejuízos econômicos, como pela redução na produção e comprometimento da qualidade do leite. Preocupa também pelos graves reflexos em saúde pública devido à transmissão de agentes etiológicos de zoonoses tradicionais e emergentes (COSTA et al., 2000, SÁ et al., 2004, GUIMARÃES; LANGONI, 2009).

Staphylococcus spp. são os agentes etiológicos mais frequentemente isolados de mastites em animais (BERGONIER et al. 2003; UNAL; YILDIRIM, 2010). O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococaceae* e é composto por 50 espécies e subespécies (HENNEKINNE et al., 2010).

S. aureus tem sido considerado um dos principais patógenos causador de mastites subclínicas em rebanhos leiteiros (ZAFALON et al., 2007). Esse micro-organismo expressa grande variedade de fatores de virulência, os quais contribuem para a invasão, colonização e persistência deste patógeno no hospedeiro, como a produção de biofilme, cápsula, entre outros. A maioria das linhagens do micro-organismo produz exotoxinas ou citolisinas, incluindo hemolisinas, enterotoxinas, toxina da síndrome do choque tóxico e toxinas exfoliativas, além de nucleases, proteases, lipases, coagulases, hialuronidase e collagenase (TODAR, 2002). A ação combinada destes fatores de virulência determina efeitos deletérios às células do hospedeiro, e o estabelecimento de infecções em humanos e animais, bem como síndromes tóxicas em pacientes suscetíveis. A importância dessa bactéria está relacionada à virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, oportunistas e intoxicação alimentar (LOWY, 1998).

Enquanto *S. aureus* tradicionalmente é considerado importante agente de doenças em humanos e nos animais, os SCN e os demais SCP, eram considerados saprófitas ou raramente patogênicos (KLOOS e SCHLEIFER, 1975). Entretanto, verifica-se crescente preocupação com o aumento das

infecções por esses micro-organismos tanto nos humanos como nos animais (CUNHA et al., 2007, GUIMARÃES, 2011).

Os SCN são patógenos emergentes em mastite bovina (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Na atualidade, em muitos países, os SCN já figuram entre os principais patógenos causadores de mastite em ruminantes (ERGÜN et al. 2009; UNAL; YILDIRIM, 2010; KUNZ et al., 2011; GUIMARAES, 2011). São considerados menos patogênicos que *S. aureus*, embora as infecções por estes micro-organismos sejam comumente menos severas, ou subclínicas, acarretam prejuízos como o aumento do número de células somáticas (CCS) no leite e diminuição da produção (TAPONEN et al., 2006, GUIMARÃES, 2011).

As infecções pelos SCN são oportunistas, considerados pertencentes à microbiota da pele e mucosa de humanos e animais. Algumas espécies de SCN são capazes de produzir biofilme, que protege as células bacterianas do ataque de células do sistema imune, podendo causar infecções persistentes no tecido intramamário (SIMOJOKI et al., 2012)

A presença desses patógenos na mastite determina problema de extrema relevância em saúde pública devido ao risco potencial da transmissão destes micro-organismos e/ou toxinas para humanos pelo leite e/ou derivados lácteos. A capacidade de espécies de SCP e SCN de produzirem enterotoxinas é problema emergente em saúde pública (de FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante a multiplicação no alimento, constituindo risco para a população consumidora de leite e derivados provenientes de animais com mastite (ALCARÃS et al., 1997; SÁ et al., 2004). Menos de 1mg de toxina pura desencadeia os sinais característicos de intoxicação estafilocócica. Estima-se que seja necessário a ingestão de 10^5 UFC de *Staphylococcus* spp. por grama ou mililitro de alimento para provocar sinais de toxi-infecção (BERGDOLL, 1989).

As enterotoxinas são importantes fatores de virulência. São as principais desencadeantes da intoxicação de origem bacteriana nos humanos tendo sido relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos (CLIVER, 1994).

As enterotoxinas estafilocócicas podem permanecer viáveis mesmo após tratamento térmico comumente aplicado ao leite, como a pasteurização e esterilização, tornando-se risco em potencial para a saúde do consumidor e grave problema para a saúde pública (CARMO et al., 2002, BHATIA; ZAHOOOR, 2007).

As intoxicações alimentares causadas por enterotoxinas estafilocócicas têm evolução aguda com rápida manifestação dos sinais, que incluem náuseas e emese grave, acompanhada ou não de diarreia (CARMO, 1997, BHATIA; ZAHOOOR, 2007). A doença é usualmente auto-limitante, mas ocasionalmente pode ser grave e necessitar de hospitalização.

Entre as enterotoxinas, a enterotoxina A (SEA) é mundialmente a mais frequente toxina relacionada à intoxicação estafilocócica, embora haja registros do envolvimento de outras enterotoxinas (ARGUDÍN et al., 2010).

As enterotoxinas estafilocócicas clássicas foram nomeadas de SEA a SEE (BERGDOLL et al., 1973). Posteriormente, novos genes que codificam a produção de enterotoxinas foram descobertos incluindo *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr*, *sels*, *selt*, *selu* e *selv* (CREMONESI et al., 2005; AYDIN et al., 2011). A maioria dessas toxinas é designada como SE-like (SEL), uma vez que suas propriedades eméticas ainda não foram caracterizadas, com exceção de SEG, SEH, SEI, que já comprovadamente causaram quadros de intoxicação (LINA et al., 2004).

Estudos mostraram o envolvimento de SCN (VERNOZY-ROZAND et al., 1996) em casos de intoxicação alimentar. Foram relatados vários surtos de intoxicação estafilocócica associados com espécies de estafilococos coagulase negativa (OMORI; KATO, 1959; BRECKINRIDGE; BERGDOLL, 1971; VERAS et al., 2003).

Brabes et al. (1999) analisaram 127 amostras de leite em propriedades nos estados de São Paulo e Minas Gerais e encontraram prevalência de 40,15% de *S. aureus* e isolaram 16 cepas produtoras de enterotoxinas, indicando assim risco potencial à saúde humana associado ao consumo do leite, uma vez que a maioria dos casos diagnosticados de mastite era do tipo subclínico, e o leite era liberado para consumo.

Em estudo realizado em 2013 foram avaliados, por PCR, 263 linhagens de estafilococos isolados de mastite bovina, para detecção de genes

codificadores das enterotoxinas clássicas. Entre os 128 SCN foram detectados: *sea* (35,5%) *seb* (7,1%), *sec* (6,5%), *sed* (1,8%) e associações destes genes. Em SCP foram detectados: *sea* (9,5%) *seb* (4,4%), *sec* (5,0%) e *sed* (1,9%). A porcentagem de genes codificadores de enterotoxinas detectados em SCN (66,4%) foi superior à detectada em SCP (34,8%). Ao se comparar a capacidade de produção de enterotoxinas entre as principais espécies de SCN e *S. aureus* verificou-se, que as espécies de SCN apresentaram genes codificadores em quantidade superior aos isolados de *S. aureus*. As espécies com maior potencial enterotoxigênico foram: *S. hyicus* (81,3%), *S. warneri* (70%), *S. epidermidis* (63,1%) entre os SCN e *S. aureus* (32,2%) e *S. hyicus* (47,4%) entre SCP (de FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

Pesquisas com amostras de casos clínicos em neonatos hospitalizados verificaram a predominância de SCN (CUNHA et al., 2004). A espécie mais frequente dentre as linhagens isoladas foi *S. epidermidis* (40%), seguido por *S. warneri* (20%), *S. xylosus* (20%), *S. saccharolyticus* (15%) e *S. hominis* (5%).

Freitas Guimarães et al. (2013), detectaram, pela técnica de PCR, alto potencial enterotoxigênico em 19 linhagens de *S. epidermidis* isolados no leite em casos de mastite bovina. Nesse estudo os genes produtores de enterotoxinas encontrados foram *sea* (42,1%), *seb* (5,3%), *sed* (5,3%), *sec* e *sed* (5,3%), e *sea*, *sec* e *sed* (5,3%).

A detecção de genes codificadores das enterotoxinas tem sido verificado usualmente por PCR, que reflete o potencial toxigênico dessas linhagens. Entretanto para evidenciar a expressão gênica é utilizada a RT-PCR. Essa técnica foi utilizada por Lee et al. (2007) para detectar a expressão dos genes codificadores de enterotoxinas em quatro linhagens de *S. aureus*, sendo detectados vários genes com diferentes níveis de expressão. Os pesquisadores concluíram que o risco de intoxicação por *S. aureus* pode ser melhor avaliado pela RT-PCR.

Derzelle et al. (2009) desenvolveram um protocolo de RTq-PCR para determinar a expressão gênica de enterotoxinas. Dentre 28 linhagens de *S. aureus*, foram selecionados isolados que apresentam múltiplos genótipos produtores de enterotoxina foram selecionados, e o estudo mostrou que todas as linhagens eram capazes de produzir enterotoxinas.

Duquenne et al. (2010) aprimoraram método eficiente para extrair RNA bacteriano acessível para RT-qPCR de queijo adaptando um método simples, sensível e reprodutível, para quantificar os níveis de transcrição ao avaliar a expressão do gene produtor de enterotoxina em *S. aureus* durante a fabricação de queijo.

No Brasil, os padrões legais para alimentos, como enfatizado por Lamaita (2003), especificam apenas a presença de espécies coagulase positiva, havendo a necessidade de revisão da legislação brasileira, para incluir os coagulase negativa dada a importância assumida por estes micro-organismos, sob ponto de vista de segurança alimentar.

Guimarães (2011), ao estudar o tema, reiterou a assertiva de Lamaita (2003) uma vez que a constatação da capacidade enterotoxigênica de cepas de estafilococos coagulase negativa, demonstrou ser essencial e urgente uma revisão da atual legislação sanitária de alimentos pelos órgãos oficiais brasileiros, para incluir padrões para estafilococos coagulase negativa, objetivando resguardar a saúde pública.

Espécies do gênero *Staphylococcus* além de serem responsáveis por casos de intoxicações de origem alimentar desencadeadas pelas enterotoxinas apresentam diversos fatores de virulência, como outras toxinas extracelulares relacionadas às toxi-infecções, ao agravamento e à persistência de infecções em humanos e nos animais, fatores que determinam insucesso de tratamentos pela resistência aos antimicrobianos (KONEMAN, 2008).

A resistência bacteriana é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação de diversos fármacos, que também constitui relevante problema de saúde pública pela transmissão cruzada interespecíficas de linhagens resistentes via consumo de alimentos de origem animal (STÖHR; WEGENER, 2001).

Stöhr e Wegener (2001) referiram que o problema do aumento da resistência bacteriana em humanos, não é somente devido ao uso intenso e indevido destes fármacos pelos profissionais de saúde, mas também pela transmissão via alimentos de origem animal. Este último aspecto evidencia a importância em saúde pública na ocorrência de alta resistência entre estafilococos isolados de mastite bovina.

Em 1942, apenas dois anos após a introdução da penicilina para uso médico, foi isolada a primeira cepa hospitalar de *S. aureus* resistente a esse antimicrobiano. Após esse episódio, cepas resistentes à penicilina também foram observadas na comunidade. Desde 1960, cerca de 80% das cepas de *S. aureus* são resistentes à penicilina. Dois anos após a introdução da meticilina, em 1961, cepas de *S. aureus* resistente a esse antibiótico foram detectadas, devido à presença do gene *mecA*. Vários clones de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) foram associados a infecções hospitalares (DEURENBERG, 2008).

S. aureus é responsável por causar diversos tipos de infecção em humanos e animais. Nas últimas cinco décadas, *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) vem se disseminando como agentes de infecções hospitalares em humanos (HA-MRSA, do inglês: *hospital-acquired*) em todo o mundo (BARDIAU et al., 2013). Mais recentemente, vem ganhando destaque causando infecções comunitárias, não-hospitalares (CA-MRSA, *community-acquired*) e em animais de produção (LA-MRSA, *livestock-associated*). Isolamento de MRSA em animais de produção (suínos, bovinos e aves) tem sido amplamente reportado e o risco de transmissão zoonótica já foi comprovado (LOWY, 2003; VAN CLEEF et al. 2011, SILVA et al., 2014).

No estado de São Paulo a resistência apresentada pelos micro-organismos causadores de mastite é alta. Esta resistência aos antimicrobianos apresentada pelos principais agentes etiológicos de mastite já fora detectada e registrada por vários pesquisadores (SCHOCKEN-ITURRINO; NADER FILHO, 1984; COSTA et al., 1985; LANGONI et al., 1991; COSTA, 1999).

A utilização inapropriada e indiscriminada de antimicrobianos no tratamento de mastite é um dos fatores responsáveis pelo aumento da resistência. Foi referido que a terapia de vaca seca administrada ao final da lactação, como medida profilática à mastite, quando não realizada adequadamente, pode contribuir para o desenvolvimento da resistência bacteriana e aumenta a pressão de seleção de bactérias com múltipla resistência (HAMMERUM; HEUER, 2009).

Linhagens de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos representam um problema mundial. Há numerosos relatos da disseminação de linhagens resistentes aos betalactâmicos, anteriormente eficazes no tratamento das

infecções estafilocócicas. Nestas, a modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), sintetizadas pelo gene *mecA*, é um dos principais mecanismos de resistência descritos (AARESTRUP et al., 1998).

O mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. está associado, em parte, à expressão da proteína de ligação à penicilina, PBP2a (PBP, penicillin binding protein), cuja característica principal é a ligação alterada às penicilinas. Os beta-lactâmicos se ligam às proteínas PBP, transpeptidases integrais de membrana que participam da fase inicial de síntese da parede celular, mudando sua conformação e desencadeando um processo, ainda não esclarecido, que leva à morte dos cocos. A proteína PBP2a substitui as PBP que exibem ligação normal às penicilinas, conferindo uma defesa eficiente contra esses medicamentos. PBP2a é o produto do gene *mecA*, que está ausente em cepas susceptíveis à meticilina (MOUSSALLEM et al., 2007).

Mesmo sendo um pré-requisito para a resistência à meticilina, o gene *mecA* não é o único responsável pela expressão da resistência. Outros fatores cromossomicamente determinados, tais como o operon *femAB*, que atua como gene regulador, são essenciais para a expressão da resistência à meticilina em *S. aureus* (SUZUKI et al, 1993).

Por outro lado, verificou-se também, crescente resistência aos antimicrobianos entre SCN. A associação de métodos fenotípicos e genotípicos na identificação do perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas de humanos e animais fornece subsídios para o diagnóstico mais acurado, capaz de determinar a prevalência destes estafilococos como agentes de infecções e de proporcionar o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação das linhagens resistentes. Isolados clínicos mostraram elevada proporção de SCN que possuem o gene *mecA*, associado à resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, dificultando a escolha dos antimicrobianos de eleição (KREDIET et al., 2001).

S. aureus resistentes à meticilina são responsáveis por 40 a 70% das infecções em neonatos em UTI (SAHM et al., 1999). Entretanto, são os SCN os micro-organismos mais comumente encontrados colonizando a pele e as mucosas de recém-nascidos e representam hoje uma importante causa de infecções nosocomiais, particularmente nas UTI neonatais.(BOGADO et al.,

2002). A septicemia tardia nosocomial neonatal (>72 h após o nascimento) por *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à meticilina permanece causa de morbidade e mortalidade entre estes recém-nascidos, correspondendo a mais de 50% dos casos registrados (STOLL et al. 2002).

Santos et al. (2005) estudaram 17 isolados de *S. aureus* de casos de mastite bovina resistentes à oxacilina (1µg) no teste de difusão em disco em ágar Müller-Hinton, com o objetivo de analisar por PCR-Multiplex a presença dos genes *mecA* e *femB*. Como resultado observaram a amplificação do gene *femB* em todos os isolados de *S. aureus*, sugerindo síntese equilibrada da parede celular, com formação da ponte de pentaglicina característica da espécie. A amplificação do gene *mecA* não foi observada nos isolados de *S. aureus*, indicando que não adquiriram este gene de resistência. Os resultados sugeriram que a resistência de *S. aureus* à oxacilina foi decorrente da hiperprodução de β -lactamases e do gene *femB* em detrimento de fatores ligados ao gene *mecA*.

Em estudo realizado no estado de São Paulo foi avaliado por PCR o gene *mecA*, codificador da resistência à meticilina em diversas espécies de SCN e SCP. A maior porcentagem de isolados *mecA* positivos entre os SCN foi detectada em *S. hyicus* (56,3%), *S. epidermidis* (31,6%) e *S. warneri* (32,5%). Entre os SCP detectou-se *mecA* em 45,6% de *S. aureus*, em 42,1% de *S. hyicus* e em 38,2 % de *S. intermedius* (GUIMARÃES, 2011).

Com o aumento de linhagens resistentes à oxacilina, são poucas as alternativas para o tratamento das infecções causadas por esses patógenos. Um dos antimicrobianos de escolha tem sido a vancomicina. Porém, já são relatados casos de resistência a este fármaco por linhagens de origem humana. A vancomicina foi introduzida na clínica em 1958. A utilização deste antimicrobiano aumentou nos últimos 20 anos, em razão da maior ocorrência de *S. aureus* e SCN resistentes à oxacilina (CDC, 2002).

A utilização da vancomicina não é permitida em animais. Entretanto, pesquisadores vêm relatando resistência ao antimicrobiano, suscitando grande preocupação entre os veterinários e demais profissionais da saúde. Guimarães (2011) observou que 3,7% dos isolados de *S. aureus* e 1,6% das amostras de SCN foram resistentes a este antimicrobiano. Essa resistência emergente à vancomicina em estafilococos originários de mastite bovina foi registrada por

Costa et al. (2004) e também por Nader Filho et al. (2007). Uma das prováveis causas dessa resistência foi a ocorrência detectada desde a 1988 de enterococos resistentes à vancomicina e o potencial de transferência da resistência para outras bactérias. Estudos têm mostrado que o gene *vanA*, mediador da resistência à vancomicina, pode ser transferido de enterococos para uma variedade de bactérias gram-positivas incluindo *S. aureus* (NOBLE et al., 1992).

Em virtude da importância destes micro-organismos, as principais características epidemiológicas, ocorrência e transmissão (prevalência, incidência e vias de transmissão), de estafilococos em rebanhos de produção leiteira, a pesquisa de fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos em propriedades leiteiras no Brasil com diferentes manejos tem sido objeto de numerosos estudos (SANTOS, 2009; GUIMARÃES, 2011; SIQUEIRA, 2011).

Os relevantes resultados das pesquisas recentes evidenciaram a necessidade de se ampliar o conhecimento relacionando-se técnicas fenotípicas e genotípicas na identificação, na produção de enterotoxinas por SCN e SCP e resistência aos antimicrobianos, particularmente ante à perspectiva de resistência à vancomicina. Desta forma propôs-se a presente pesquisa cujos objetivos estão apresentados a seguir.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Geral:

Identificação das espécies SCP e SCN isoladas de casos de mastite e pesquisa de enterotoxinas e resistência aos antimicrobianos.

Específicos:

Identificar linhagens do gênero *Staphylococcus* isoladas do leite de casos de mastite bovina;

Caracterizar fenotípica e genotipicamente as espécies de SCN e SCP isoladas;

Determinar a sensibilidade microbiana *in vitro* das linhagens de SCN e SCP aos diferentes fármacos;

Avaliar a concentração inibitória mínima para vancomicina e oxacilina em linhagens de *Staphylococcus* resistentes a estes fármacos;

Detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de SCN e SCP isoladas de casos de mastite bovina;

Avaliar a expressão gênica dos genes codificadores de enterotoxinas nas linhagens de SCN e SCP, isoladas de casos de mastite bovina;

Investigar a resistência genotípica à vancomicina e à oxacilina pela pesquisa dos genes *vanA* e *mecA* em linhagens de SCN e SCP, isoladas de casos de mastite bovina;

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas e moleculares foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP- Campus de Botucatu, SP.

4.1. Amostras

Foram utilizadas 150 linhagens de SCP e 150 linhagens de SCN isoladas do leite em casos de mastite bovina em 12 propriedades do estado de São Paulo. Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentadas as principais características da produção, do rebanho e manejo das propriedades leiteiras estudadas.

4.2. Coleta do leite dos animais

Foram colhidas as amostras de leite das glândulas mamárias com mastite clínica e subclínica. Após realização da anti sepsia do óstio do teto com álcool iodado (2,5%) foram colhidas as amostras em tubos de ensaio esterilizados para realização dos exames microbiológicos e transportadas ao laboratório sob refrigeração (4-8°C) em caixas isotérmicas com gelo reciclável (NMC, 1999). Paralelamente, das glândulas dos mesmos animais, foram colhidas amostras individuais de 25 mL de leite de todos os quartos mamários para realização da Contagem de Células Somáticas (CCS), em frascos contendo o conservante celular Bromopol (Bertrand, 1996). As análises de CCS foram realizadas por citometria fluxométrica em equipamento Bentley Somacount 300 (Bentley®).

4.3. Diagnóstico do Processo Inflamatório

A metodologia utilizada para triagem e diagnóstico de campo de mastite clínica e subclínica foram, respectivamente, exame dos animais antes de cada ordenha pelos testes da caneca telada de fundo preto (RADOSTITS et al., 2007) California Mastitis Test - CMT (SCHALM e NOORLANDER, 1957). As glândulas mamárias que apresentaram alterações visíveis (grumos, filamentos,

pus ou sangue) nos primeiros jatos de leite ao exame da caneca telada de fundo preto e/ou, alterações visíveis da glândula mamária (edema, calor, dor e rubor), foram classificadas como casos de mastite clínica. As glândulas mamárias sem alterações visíveis e com leite de característica normal, porém positivos ao teste de CMT (escores 1 a 3+), foram classificadas como mastite subclínica.

Quadro 1. Principais características de produção, rebanho bovino e instalações das fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2015.

[illegible]

Quadro 2. Principais características de manejo de ordenha de vacas em fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2015.

CARACTERÍSTICAS DAS FAZENDAS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Nº de ordenhas	2	3	3	3	3	3	2	2	1	2	2	2
Alimentação pós ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Tipo secagem:	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Intermitente	Abrupta	Abrupta	Abrupta
Ordenha mecânica	Duplo 4	Carrossel	Duplo 20	Linha 5	Duplo 5	Duplo 16	Duplo 4	Duplo 6	Balde ao pé 4 conjuntos	Duplo 5	Duplo 4	Duplo 5
Higiene equipamento	Boa	Boa	Excelente	Regular	Regular	Excelente	Boa	Boa	Ruim	regular	Boa	Boa
Qualidade mão de obra	Regular	boa	Boa	regular	Ruim	Boa	boa	boa	ruim	ruim	Boa	Boa
Assistência veterinária	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Frequência dos testes para diagnóstico de Mastite												
• Tamis	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Não faz	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas
• CMT	trimestral	bimestral	Mensal	Mensal	trimestral	Mensal	Trimestral	Trimestral	Não faz	Bimestral	Bimestral	Bimestral
• CCS	trimestral	bimestral	Mensal	Mensal	trimestral	Mensal	Trimestral	Trimestral	Não faz	Bimestral	Bimestral	Bimestral

4.4. Identificação de SCN e SCP

Após a análise morfo-tintorial, os cocos gram positivos foram submetidos às provas de catalase e coagulase (KONEMAN et al., 2008). O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, resistência à bacitracina (0,04 U) e sensibilidade à furazolidona (100 mg). Foram considerados resistentes à bacitracina (0,04 U) quando da ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm, enquanto a sensibilidade à furazolidona (100 mg) foi caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (BAKER, 1984).

Na identificação das espécies de SCN e SCP foi utilizado o método de Kloos e Schleifer (1975), modificado por Cunha et al. (2004), que consiste na fermentação de açúcares (xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol), produção de hemolisina e multiplicação em condições de anaerobiose em caldo tioglicolato. Para confirmar a classificação das demais espécies e subespécies de SCN e SCP, quando necessário, foram empregadas outras provas bioquímicas, como: redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de β -D-frutose e resistência à novobiocina.

As seguintes cepas de referência internacional foram utilizadas como controle: *S. auriculares* (ATCC 33753), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *urealyticus* (ATCC 49325) *S. caprae* (ATCC 35538), *S. cohnii* (ATCC49330), *S. cohnii* subsp. *cohnii* (ATCC 29974), *S. epidermidis* (ATCC12228 e 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobioceticus* (ATCC 700237), *S. lentus* (ATCC 700403), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062) *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. xylosus* (ATCC 29979) adquiridas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Laboratório de Micro-organismos de referência, Rio de Janeiro.

4.5. Sensibilidade microbiana *in vitro*

Os perfis de sensibilidade dos estafilococos isolados foram analisados pelo método descrito por Bauer et al. (1966), utilizando-se placas de ágar Mueller Hinton e discos dos seguintes antimicrobianos: gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), penicilina G (10 U.I.), neomicina (30µg), ampicilina (10µg), cotrimoxazol (25µg), oxacilina (10µg), ciprofloxacino (10µg), enrofloxacino (10µg), vancomicina (10µg), novobiocina (5µg), cefoxitina (10µg) e cefalexina (30µg). A interpretação dos halos de inibição foi realizada de acordo com National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2012).

Os controles utilizados foram: *S. aureus* ATCC 25923 (sensível à oxacilina, gene *mecA* negativo), ATCC 33591 (resistente à oxacilina, gene *mecA* positivo), *S. epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecium* ATCC 51559 (resistente à vancomicina, gene *vanA* positivo).

4.6. Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados para vancomicina e oxacilina

A CIM dos isolados foi avaliada pelo Kit comercial E-test™ realizados em ágar Mueller-Hinton nos isolados que se mostraram resistentes à vancomicina e/ou oxacilina nos testes de difusão (BAUER et al., 1966). Um volume de 0,2 ml da suspensão de micro-organismo em solução fisiológica com densidade equivalente a 0,5 na escala McFarland foi distribuído, com auxílio de pipetas estéreis no ágar Mueller-Hinton. A seguir foram dispostas fitas impregnadas com vancomicina e oxacilina em concentração decrescente, utilizando-se pinças estéreis. As placas foram incubadas por 48 horas a 35°C. As elipses de inibição foram avaliadas após 24 e 48 horas, de acordo com a recomendação do fabricante (Oxoid do Brasil, São Paulo, SP). Os critérios utilizados para a determinação da sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos foram: SCN oxacilina $\leq 0,25\mu\text{g/mL}$ (sensível), $\geq 0,5\mu\text{g/mL}$ (resistente), *S. aureus* e *S. lugdunensis* $\leq 2\mu\text{g/mL}$ (sensível) e $\geq 4\mu\text{g/mL}$ (resistente); *S. aureus* vancomicina $< 2\mu\text{g/mL}$ (sensível), 4-8µg/mL (intermediário), $\geq 16\mu\text{g/mL}$ (resistente); SCN vancomicina $< 4\mu\text{g/mL}$ (sensível), $> 32\mu\text{g/mL}$ (resistente) (CLSI, 2012). Foram utilizados os mesmos controles descritos no item 4.5.

4.7. Extração do DNA

O ácido nucleico total foi extraído dos 300 isolados de *Staphylococcus* spp. As linhagens foram cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e incubadas à temperatura de 37°C por 24 h. A extração foi realizada com *kit* Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare), que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir 400 µL do tampão de extração foram adicionados à mistura. Em seguida foi centrifugada à velocidade de 11.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 11.000 x g por 1 min. A fração líquida foi descartada e foram adicionados 500 µL de tampão de extração à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido, 500 µL da solução de lavagem foram adicionados à coluna, submetendo-se o material à nova centrifugação a 11.000 x g por 3 min. A coluna foi então transferida para um microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 200 µL de tampão de eluição aquecido a 70°C. As amostras foram centrifugadas a 11.000 x g por 1 minuto e a coluna GFX foi desprezada. O DNA extraído foi mantido a -80°C.

4.8. Primers utilizados

Foram utilizados *primers* específicos (Quadro 3) para os genes codificadores de cada enterotoxina, de acordo com Derzelle et al. (2009).

Quadro 3. Sequência das bases, localização dentro dos genes e tamanhos dos produtos amplificados pelos *primers* oligonucleotídeos toxina-específicos utilizados na reação de PCR para detecção de genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *seu* codificadores de enterotoxinas, Botucatu-SP, 2015.

Primers	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produto Amplificado
SEA	CCTTTGGAAACGGTTAAAAC	128 pb
	CTCTGMACTTYCCATCAAA	
	CGTAATTAAACCGAAGGYTCTGT	
SEB	GGGTATTTGAAGATGGTAAAAAT	140 pb
	AGGCGAGTTGTATAAATTCATAGAGTT	
	CATGTCTATCCAAAAGCTATTCTCA	
SEC	TGTACTTRTAAGAGTTTATGAAAAATA	104 pb
	TCCTAGCTTTTATGTCTAGTTCTTGAG	
	ATCATACCAAAAAGTATTGCCGTTA	
SED	TCAATTTGTGGATAAAATGGTGTAC	154 pb
	TTTCCTCCGAGAGTATCATTAT	
	GGGAAAATCACCTTAACATC	
SEE	CCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	116 pb
	ACCGCCAAAAGCTGTCTGAG	
	ATAACTTACCGTGGACCTTC	
SEG	TTACAAAGCAAGACACTGGCTCA	73 pb
	TCCAGATTCAAAYGCAGAACMAT	
	ATATGGAAACAAAAGGTAAGTTTC	
SEH	TGAATGTCTATATGGAGGTACAAC	80 pb
	CTACCCAAAACATTAGCACCAA	
	GACCTTACTTATTTGCTGTC	
SEI	GGTAYCAATGATTTGATCTCAGAAT	147 pb
	GTATTGTCTGATAAAGTGGCC	
	TTTACCAKTGTTATTAAGACCATAT	
SEJ	CTGCAATGAAAACAATCAACTTTATG	79 pb
	GAACAACAGTTCTGATGCTATC	
	CAAAGGTACTAGGTTGTATAA	
SEK	GTCAACGCTACTAACGAATATC	193 pb
	TAGTGCCGTTATGTCCATAAATG	
	ACCCATCATCTCTGTGTAG	
SEL	TAGATTGCGCAAGAAATAATACC	176 pb
	CTTTACCAAGTATCATTTGTGTCC	
	CGAGAAATTAGAACCATCATTCAT	
SEM	TCATATCGCAACCGCTGATGATG	150 pb
	TCAGCWGTTACTGTGGAATTAT	
	AYTTCTCTAAAATAATCACCYGTAA	
SEM	GATGAAGAGARAGTTATAGGCGT	167 pb
	ATGTTACCGGTATCTTTATTTGTAT	
	AACTCTGCTCCYACTGAACC	
SEO	GTGTAAGAAAGTCAAGTGTAGAC	163 pb
	CAGCAGATWTTCCATCTAAACC	
	GTACAGGCAGTWTYCACTTG	
SEP	GGAGCTAGACCTTCAGTCAAGA	115 pb
	ACCAGAAAGAGGGTGAAACTCA	
	TATCCTCAACTGTGTATCTGGA	
SEQ	GGAATTACGTTGGCGAATCAA	221 pb
	TGATATCCATAATCCTGACC	
	AAAACCTCTGCTTGACCAATT	
SER	TCCTATTCTTTATTCAGAAATACA	102 pb
	GGGTATTCCAAACACATCTAAC	
	CTCTTGATTCAATCTTAGGTAAT	
SEU	AATGGCTCTAAAATTGATGGTTTC	105 pb
	GTTTGTCCCAAACAAATCTAYG	
	CCATATTATCCGCTGAAAAATAG	

4.9. Detecção dos genes codificadores de enterotoxinas

As reações de PCR para detecção dos genes das enterotoxinas foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson et al. (1991) e Omoe et al. (2002, 2005). As reações foram realizadas em micro-tubos de 0,5mL em volumes totais de 25µL, contendo 10pmol de cada primer (Quadro 3), 2,5U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), 200µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL DNA da amostra. Em todas as reações realizadas foi utilizado controle negativo, substituindo ácido nucléico por água.

A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), empregando-se inicialmente os parâmetros descritos por Johnson et al. (1991) com algumas modificações de padronização e adaptação para laboratório, conforme quadro 4.

Quadro 4. Condições para PCR de genes codificadores de enterotoxinas de estafilococos isolados de leite em casos de mastite bovina. Botucatu-SP,2015.

<i>Primers (sequência 5'→3')</i>	<i>Condições</i>	<i>Referencia</i>
<i>sea</i>	94°C/5 min (1 ciclo)	Johnson et al. (1991)
<i>seb</i>	94°C/2 min	
<i>sec</i>	50°C/30 seg (30 ciclos)	
<i>sed</i>	72°C/1 min	
<i>see</i>	72°C/4 min (1 ciclo)	
<i>seg</i>	94°C/5 min (1 ciclo)	Omoe et al. (2002)
<i>seh</i>	94°C/30 seg	
<i>sei</i>	55°C/30 seg (30 ciclos)	
<i>sej</i>	72°C/1 min 72°C/4 min (1 ciclo)	
<i>sek</i>		Omoe et al. (2005)
<i>sel</i>		
<i>sem</i>		
<i>sen</i>		
<i>seo</i>		
<i>sep</i>		
<i>seq</i>		
<i>ser</i>		
<i>seu</i>		

4.10. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose a 2% preparado em tampão de TBE 1,0 X (89 nM Tris-HCl, 89 μ M ácido bórico e 20 μ M EDTA) e corado com 1,0 μ L/ml de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão 100 pb e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

4.11. Extração do RNA

Um mL da solução de cultura em BHI foi centrifugado a $10.000 \times g$ a 4°C por 5 min e lavados duas vezes com água DEPC. O *pellet* foi ressuspensão em 40 mg /mL de lisozima. A extração de RNA foi efetuada utilizando o *kit* Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare e consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com tampão TE (10mM de Tris, 1mM EDTA[pH 8,0]) contendo 2 mg/ml de lisozima. Adicionaram-se a seguir 350 μ L de Buffer RA1 e 3,5 μ L de β -mercaptoetanol. A amostra foi filtrada em filtros RNAspin Mini Filter units e em seguida adicionaram-se 350 μ L de etanol 70%. Nesta etapa, a amostra foi transferida para os filtros RNAspin Mini Column para ajustar as condições de ligação no filtro, e logo em seguida adicionaram-se 350 μ L de MDB (*membrane desalting buffer*) para ocorrer a ligação do RNAm na membrana do filtro. Na sequência realizaram-se duas etapas de lavagem com 600 μ L e 250 μ L de Buffer RA3. Em seguida, o RNAm foi eluído em 45 μ L de H₂O RNA-free acrescido de 5 μ L de RNA guard. A seguir realizou-se o tratamento do RNAm com DNase para eliminar qualquer contaminação com DNA. O tratamento de 8 μ L de RNAm se iniciou adicionando 2 μ L de DNase Buffer e 2 μ L de DNase e que foi incubado a 37 °C por 60 minutos. Logo a seguir adicionaram-se 2 μ L de Stop DNase, incubando-se a 65 °C por 10 minutos.

4.12. Obtenção do cDNA

Após o tratamento com DNase, a amostra de RNAm foi convertida a cDNA. Adicionaram-se a amostra de RNAm tratada com DNase (12 μ L), 1 μ L de random primer a 75ng/ μ L, juntamente com 6 μ L de H₂O nuclease-free e 1

μL de dNTP (200 μM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados). Em seguida, a mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação do RNA e ligação do primer. Posteriormente adicionaram-se à mistura 4 μL do tampão para a transcriptase reversa (5X First-Strand Buffer), 1 μL de dietiltreitol (DTT) e 1 μL de SuperScript™ III (200 U/ μL) e levou-se a mistura ao termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Para obtenção do cDNA, foram utilizados ciclos de 25 °C por 5 minutos, 50 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos, resfriando-se em seguida a 4 °C. O cDNA obtido foi submetido à amplificação pela técnica de PCR e eletroforese para visualização dos produtos amplificados.

4.13. Detecção do gene *rpob*

Todas as amostras foram submetidas a detecção do gene *rpob* que codifica a subunidade β da RNA polimerase para a confirmação das espécies de SCN e SCP pelo sequenciamento da região amplificada. As reações foram realizadas utilizando os primers descritos por Mellmann et al. (2006) com 899 pb, *rpob*1418for 5'-CAATTCATGGACCAAGC-3' e *rpob*3554rev 5'-CCGTCCAAGTCATGAAAC-3' e consistiram em 25 μL contendo 10 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 μM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCL (pH 8,4), 0,75mM de MgCl₂ e 3 μL de DNA. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) empregando-se os seguintes parâmetros: um primeiro ciclo a 94 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento dos primers a 52 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minutos e 30 segundos. Ao final dos 35 ciclos foi seguido de uma extensão a 72 °C por dez minutos. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe.

4.14. Sequenciamento

Os amplicons das regiões do gene *rpob* das respectivas espécies de SCN e SCP foram submetidos à purificação utilizando o kit GFX PCR e Gel Band Purification (GE Healthcare) para posterior sequenciamento em sequenciador de DNA ABI (Applied Biosystems) Prism model 377. O programa

Mega 5.2 foi utilizado para alinhar as sequências de nucleotídeos que foram analisadas no GenBank usando a ferramenta Blast para comparar as sequências de enterotoxinas obtidas nesse estudo com as sequências publicadas

4.15. Pesquisa do gene *vanA*

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* spp. conforme descrito no item 5.

As reações foram realizadas em micro-tubos de 0,5mL em volumes totais de 25µL, contendo 10pmol de cada primer (Quadro 3), 2,5U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), 200µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL DNA da amostra. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), utilizando os *primers* *vanA1* (5'- GGGAAAACGACAATTGC -3') e *vanA2* (5'- GTACAATGCGGCCGTTA-3'), que amplificam 732pb, empregando os parâmetros descritos por Dutka-Malen et al. (1995): 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe. Em todas as reações foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*E. faecium* ATCC 51559) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

4.16. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com GRAPHPAD INSTAT software (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS. 1990-1993), utilizando os testes de Kruskal-Wallis (ANOVA) não paramétrica, teste de Mann-Whitney, para comparar resistência fenotípica aos antimicrobianos apresentada por SCN e SCP e teste exato de Fisher, que foi utilizado para comparar a presença de genes codificadores de enterotoxinas nos SCN e SCP, assim como a associação entre gene *mecA* e resistência à oxacilina.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Identificação fenotípica e genotípica de SCP e SCN

Na presente pesquisa foram identificadas por testes bioquímicos e moleculares 22 espécies do gênero *Staphylococcus* (Tabelas 1, 2 e Figuras 1, 2).

As 150 linhagens de SCN foram identificadas como sendo: 48 (32%) *S. warneri*, 22(15%) *S. epidermidis*, 20(13%) *S. hyicus*, 10(7%) *S. xylosus*, 7(5%) *S. haemolyticus*, 6(4%) *S. simulans*, 6(4%) *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, 6(4%) *S. hominis*, 5(3%) *S. pasteurii*, 4(2,7%) *S. cohnii*, 3(2%) *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* 3(2%) *S. chromogenes* 3(2%) *S. sciuri*, 2(1%) *S. saccharolyticus*, 2(1%) *S. lugdunensi*, 1(0,7%) *S. auricularis*, 1(0,7%) *S. saprophyticus* subsp. *bovis*, 1(0,7%) *S. capitis* como ilustrado na Figura 1.

A concordância na identificação fenotípica e genotípica das espécies de SCN foi de 96,7%. Entre os SCP foi de 98,7%. A correlação entre os métodos foi de 0,9977. Entre os SCP foram isolados: 105 (70%) *S. aureus*, 21(14%), *S. hyicus*, 19(13%), *S. intermedius* e 5(3%) *S. schleiferi* subsp *coagulans*. Os resultados da identificação fenotípica e genotípica estão apresentados na Tabela 3 e ilustrados na figura 2 onde se observa a correlação entre os dois métodos, que apresentaram concordância de 96,7%.

Tabela 1. Resultados bioquímicos e do sequenciamento do gene *rpob* nas 150 linhagens de SCN isolados de leite em casos de mastite bovina. Botucatu-SP, 2015.

Espécies	Bioquímico	Sequenciamento
<i>S. auriculares</i>	1	1
<i>S. capitis</i>	1	1
<i>S. chromogenes</i>	1	3
<i>S. cohnii</i> subsp <i>cohnii</i>	4	4
<i>S. epidermidis</i>	22	22
<i>S. haemolyticus</i>	7	7
<i>S. hominis</i>	6	6
<i>S. hyicus</i>	22	20
<i>S. lugdunensis</i>	2	2
<i>S. pasteurii</i>	5	5
<i>S. saccharolyticus</i>	2	2
<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>	1	1
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	3	3
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>schleiferi</i>	5	6
<i>S. sciuri</i> subsp <i>sciuri</i>	3	3
<i>S. simulans</i>	4	6
<i>S. warneri</i>	50	48
<i>S. xylosus</i>	11	10
Total	150	150

Concordância = 96,7%

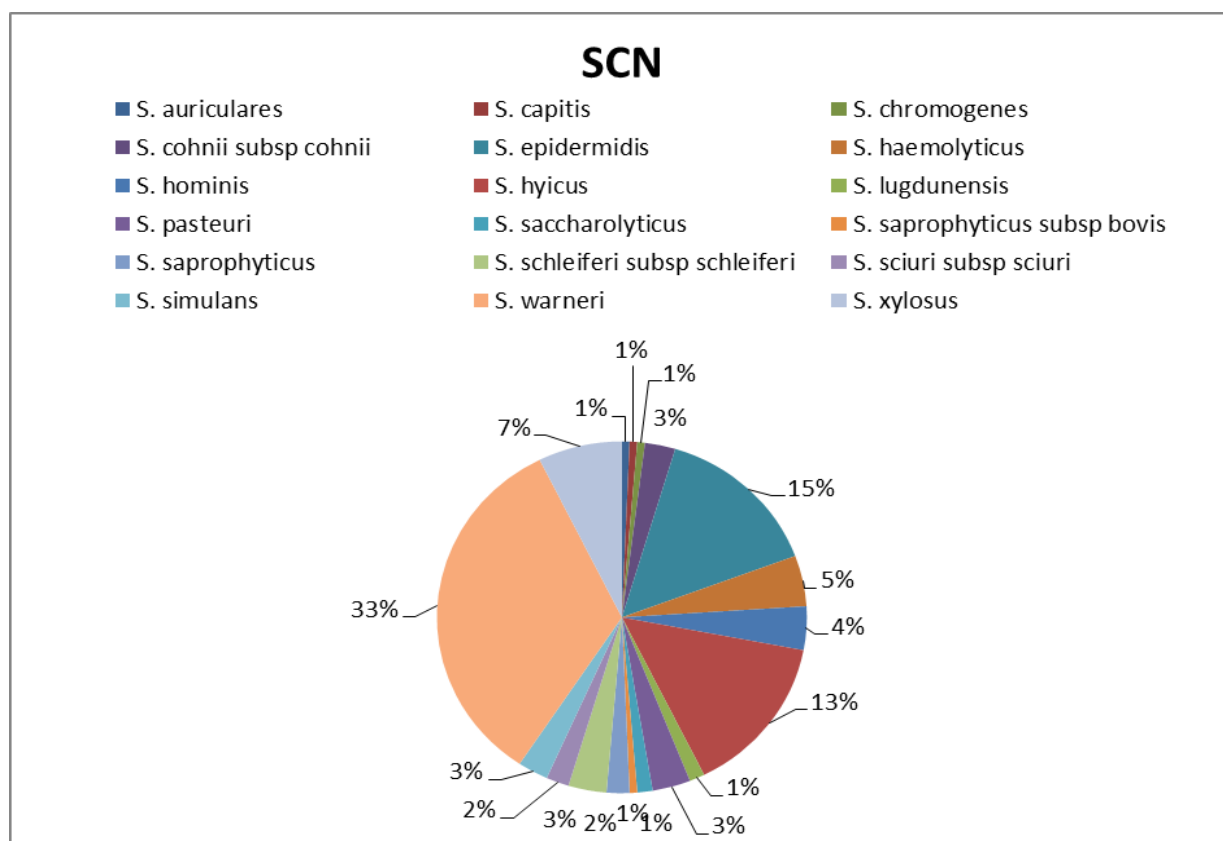


Figura 1. Espécies SCN isoladas de casos de mastite bovina identificadas e apresentadas em porcentagem. Botucatu-SP. 2015.

Tabela 2. Resultados bioquímicos e do sequenciamento do gene *rpob* nas 150 linhagens de SCP isoladas de casos de mastite bovina. Botucatu-SP, 2015

Espécies	Bioquímico	Sequenciamento
<i>S. hyicus</i>	21	19
<i>S. intermedius</i>	19	21
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	5	5
<i>S. aureus</i>	105	105
Total	150	150

Concordância=98,7%

A distribuição das linhagens de SCP encontra-se ilustrada na figuras 2.

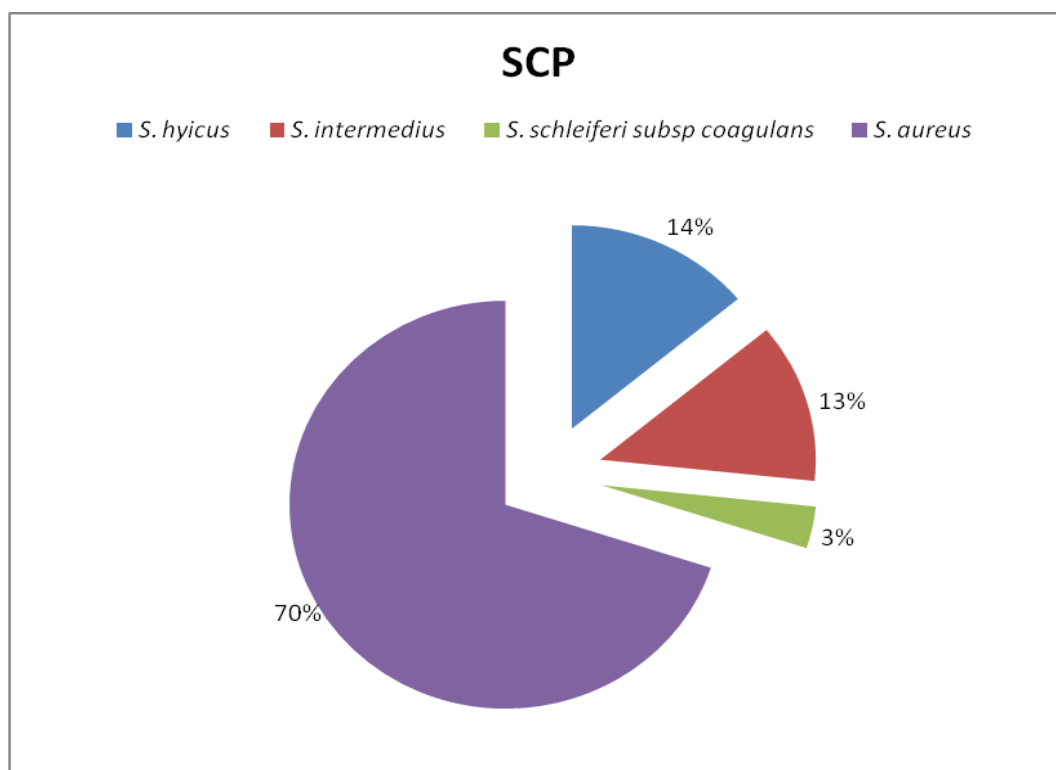


Figura 2. Espécies SCP isoladas de casos de mastite bovina identificadas e apresentadas em porcentagem. Botucatu-SP. 2015.

5.2. Resistência aos antimicrobianos

Nas tabelas 3 e 4 estão apresentados os resultados da resistência “in vitro” aos antimicrobianos em testes de difusão com discos apresentados por SCP e SCN isolados de casos de mastite. A tabela 5 apresenta a resistência e a sensibilidade de SCP e SCN aos antimicrobianos em número e porcentagem. Nos testes de disco difusão as linhagens de SCP e de SCN apresentaram maior resistência a betalactâmicos. A resistência dos isolados SCP e SCN à penicilina G foi de 36,0% e 24,7%; à ampicilina de 34,0% e 22,7% e à oxacilina de 16,7% e 13,3%, respectivamente. Entre os antimicrobianos testados aos quais não se detectou resistência entre os diferentes isolados de estafilococos estudados foram: enrofloxacino, cefoxitina e cefalotina.

Tabela 3. Resistência “in vitro” aos antimicrobianos dos 150 isolados de estafilococos coagulase negativa (SCN) de casos de mastite bovina avaliados no teste de difusão com discos. Botucatu, SP, 2015.

Espécies SCN	N	AMP	PEN	COT	OXA	TET	CIP	NEO	GEN	CFE	ENO	VAN	FOX	CEF
<i>S. warneri</i>	48	13	16	1	8	7	1	7	2	1	0	4	0	0
<i>S. epidermidis</i>	22	4	4	1	4	3	1	3	2	0	0	2	0	0
<i>S. hyicus</i>	20	4	4	0	2	2	0	3	0	1	0	2	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	7	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>S. schleiferi</i>	6	2	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. saccharolyticus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. cohnii</i>	4	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. hominis</i>	6	2	2	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0
<i>S. lugdunensi</i>	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>S. pasteurii</i>	5	2	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	10	2	2	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>S. sciuri</i>	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>S. simulans</i>	6	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. auricularis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus bovis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	150	34	37	2	20	17	2	18	6	2	0	14	0	0
		22,7%	24,7%	1,3%	13,3%	11,3%	1,3%	12,0%	4,0%	1,3%		9,3%		

Legenda: AMP=ampicilina, PEN=penicilina, COT=cotrimoxazol, OXA=oxacilina, TET=tetraciclina, CIP=ciprofloxacino, NEO=neomicina, GEN=gentamicina, CFE=cefalexina, ENO=enrofloxacino, VAN=vancomicina, FOX=cefoxitina, CEF=cefalotina
N=número de isolados

Tabela 4. Resistência “in vitro” aos antimicrobianos dos 150 isolados de estafilococos coagulase positiva (SCP) de casos de mastite bovina avaliados no teste de difusão com discos. Botucatu, SP, 2015.

Espécies SCP	N	AMP	PEN	COT	OXA	TET	CIP	NEO	GEN	CFE	ENO	VAN	FOX	CEF
<i>S. aureus</i>	105	44	48	3	20	4	0	11	0	2	0	6	0	0
<i>S. intermedius</i>	21	4	3	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>S. hyicus</i>	19	3	3	0	2	0	1	1	1	2	0	0	0	0
<i>S. schleiferi subsp coagulans</i>	5	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Total	150	51	54	3	25	6	1	12	3	4	0	6	0	0
(%)		34,0%	36,0%	2,0%	21,3%	4,0%	0,7%	8,0%	2,0%	2,7%		3,7%		

Legenda: AMP=ampicilina, PEN=penicilina, COT=cotrimoxazol, OXA=oxacilina, TET=tetraciclina, CIP=ciprofloxacino, NEO=neomicina, GEN=gentamicina, CFE=cefalexina, ENO=enrofloxacino, VAN=vancomicina, FOX=cefoxitina, CEF=cefalotina, N=número de isolados

Na Tabela 5 observa-se os resultados de resistência e sensibilidade em porcentagem frente aos antimicrobianos utilizados, tanto nas linhagens de SCP como SCN. Em relação a sensibilidade entre os SCN e SCP, $P = 0,7173$, considerado não significativo (Teste Mann-Whitney).

Tabela 5. Resistência e sensibilidade em linhagens de SCP e SCN aos antimicrobianos. Botucatu-SP, 2015

Antimicrobiano	SCP		SCN	
	N	%	N	%
AMPICILINA				
S	99	66,0%	116	77,3%
R	51	34,0%	34	22,7%
PS	0	0,0%	0	0,00%
CEFALEXINA				
S	146	97,3%	145	96,7%
R	4	2,7%	2	1,3%
PS	0	0,0%	3	2,0%
COTRIMOXAZOL				
S	147	98,0%	147	98,0%
R	3	2,0%	2	1,3%
PS	0	0,00%	1	0,7%
GENTAMICINA				
S	147	98,0%	144	96,0%
R	3	2,0%	6	4,0%
PS	0	0,0%	0	0,0%
NEOMICINA				
S	138	92,0%	132	88,0%
R	12	8,0%	18	12,0%
PS	0	0,00%	0	0,0%
OXACILINA				
S	124	82,7%	130	86,7%
R	25	16,7%	20	13,3%
PS	1	0,7%	0	0,0%
TETRACICLINA				
S	144	96,0%	133	88,7%
R	6	4,0%	17	11,3%
PS	0	0,0%	0	0,0%
CIPROFLOXACINO				
S	149	99,3%	148	98,7%
R	1	0,7%	2	1,3%
PS	0	0,0%		0,0%
PENICILINA				
S	96	64,0%	113	75,3%
R	54	36,0%	37	24,7%
PS	0	0,0%	1	0,7%
VANCOMICINA				
S	144	96,0%	136	90,7%
R	6	4,0%	14	9,3%
PS	0	0,0%	0	0,00%

5.3. Resistência à vancomicina e oxacilina e pesquisa do gene *mecA* e *vanA*

As tabelas 6 e 7 contém os resultados do estudo da concentração inibitória mínima à vancomicina e oxacilina, respectivamente, em diferentes linhagens de *Staphylococcus* spp. e o número de linhagens e respectivos CIM.

Foi observada resistência frente à oxacilina em 20 (19%) linhagens de *S. aureus*. Em relação aos SCN, 18 linhagens foram resistentes à oxacilina, sendo 6 (12,5%) *S. warneri*, 4 (18,2%) *S. epidermidis*, 3 (30,0%) *S. xylosus*, 2 (10,0%) *S. hyicus*, 1(14,3%) *S. haemolyticus*, 1(33,3%) *S. sciuri subsp sciuri*, 1(50,0%) *S. lugdunensis*.

Tabela 6. Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) à Vancomicina de acordo com as espécies de estafilococos isolados do leite em vacas. Botucatu-SP, 2015

Espécie	Número de linhagens para as CIM					
	0.25	0.5	1.0	2.0	6.0	16.0
<i>S. aureus</i>	1	1	2	0	2	0
<i>S. warneri</i>	1	1	3	1	0	2
<i>S. epidermidis</i>	0	0	1	0	0	1
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i>	0	0	0	1	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	0	0	0	1	0	1
<i>S. hyicus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	0	0	0	0	0	2
<i>S. lugdunensis</i>	0	1	0	0	0	0

S. aureus Vancomicina < 2µg/ml (sensível), 4-8µg/ml (intermediário), ≥16µg/ml (resistente); SCN Vancomicina <4µg/ml (sensível), >32µg/ml (resistente) (CLSI, 2012).

Tabela 7. Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) à Oxacilina de acordo com as espécies de estafilococos isolados do leite de vacas. Botucatu-SP, 2015

Espécie	Número de linhagens para as CIM				
	0.12	0.25	0.50	1.0	≥4.0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	20
<i>S. intermedius</i>	2	1	0	0	0
<i>S. hyicus CP</i>	1	1	0	0	0
<i>S. warneri</i>	1	1	3	2	1
<i>S. epidermidis</i>	0	0	2	2	0
<i>S. sciuri subsp sciuri</i>	0	0	0	1	0
<i>S. haemolyticus</i>	0	0	0	1	0
<i>S. hyicus</i>	1	0	1	0	0
<i>S. xylosus</i>	0	0	2	1	0
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	0	1	0

S. aureus e *S. lugdunensis* ≤2µg/ml (sensível) e ≥4µg/ml (resistente), SCN Oxacilina ≤0,25µg/ml (sensível), ≥0,5µg/ml (resistente) (CLSI, 2012).

Foi detectado o gene *mecA* 17 (11%) dos isolados das seguintes espécies de SCN, sendo: 8 (16,7%) *S. warneri*, 4 (18,2%) *S. epidermidis*, 1 (14,3%) *S. haemolyticus*, 1 (10,0%) *S. xylosus*, 1 (5,0%) *S. hyicus*, 1 (30,0%) *S. sciuri subsp sciuri*, 1 (50,0%) *S. lugdunensis*. Nas linhagens de SCP, apenas *S. aureus* apresentou o gene em 44 (42%) isolados.

Tabela 8. Associação entre a presença do gene *mecA* e resistência a oxacilina nas linhagens de SCN e SCP isolados de leite em casos de mastite bovina. Botucatu-SP, 2015.

SCN ¹	<i>mecA</i> positivo	<i>mecA</i> negativo	n.
Oxacilina Resistente	15 (83%)	3 (16,6%)	18 (12%)
Oxacilina Sensível	2 (1,5%)	130 (87%)	132 (88%)
Total	17 (11,3%)	133 (88%)	150
SCP ²	<i>mecA</i> positivo	<i>mecA</i> negativo	n.
Oxacilina Resistente	16(80%)	4(20%)	20(13%)
Oxacilina Sensível	28(21,5%)	102 (78,5%)	130 (87%)
Total	44(29%)	106(71%)	150
SCP e SCN ³	<i>mecA</i> positivo	<i>mecA</i> negativo	n.
Oxacilina Resistente	31(82%)	7(18 %)	38(13%)
Oxacilina Sensível	30(11,5%)	232(88,5%)	262 (87%)
Total	61(20%)	239(80%)	300

¹ SCN P < 0,0001, associação é estatisticamente significativa. Teste de Fisher (IC 95%)

² SCP: P < 0,0001, associação é estatisticamente significativa. Teste de Fisher (IC 95%)

³ SCP: P < 0,0001, associação é estatisticamente significativa. Teste de Fisher (IC 95%)

A análise da Tabela 8, demonstrou que a associação entre presença de *mecA* e resistência *in vitro* à oxacilina (CIM), entre os SCN isolados de mastite bovina foi estatisticamente significativa (P < 0,0001, teste de Fisher, intervalo de confiança[IC] de 95%), assim como nos SCP. Também, foi detectada associação estatisticamente significativa (P < 0,0001), quando se

analisou a ocorrência de *mecA* e resistência *in vitro* à oxacilina nos 300 *Staphylococcus* spp. isolados (SCP e SCN). Foi verificado que 82% dos isolados que carregavam o gene *mecA* expressavam resistência à oxacilina. Entre os SCP, somente em *S. aureus* foi detectado o gene *mecA* e, destes, 80% expressavam a resistência, ou seja, eram MRSA.

O presente estudo apresentou linhagens que apresentaram resistência frente à vancomicina no teste de disco difusão (9,3% SCN e 3,7% SCP), porém não foi detectada essa resistência na realização da CIM. Foi verificado a presença de 2 linhagens de *S. aureus* e 6 linhagens de SCN apresentando resistência parcial a vancomicina. Não foi detectado o gene *vanA* codificador da resistência à vancomicina.

5.4. Genes codificadores de enterotoxinas:

Foram detectados genes codificadores para enterotoxinas clássicas (*sea.seb,sec,sed*) e demais enterotoxinas (*see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq*) em 175 (58,3%) das 300 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina. SCN apresentaram estes genes em 109 (73%) das linhagens sendo significativamente maior (0,0001, teste de Fisher) se comparado com as linhagens de SCP, com 66 (44%) produtoras destes genes (Tabela 9). Entre as espécies SCN que apresentaram genes codificadores de enterotoxinas com maior frequência foram: *S. warneri*, *S. epidermidis* e *S. hyicus*. Entre SCP, *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*.

Quadro 5. Frequência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em linhagens de SCP e SCN isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2015.

	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sej</i>	<i>sen</i>	<i>sea seb</i>	<i>sea sec</i>	<i>seb sec</i>	<i>sec sed</i>	<i>sea see</i>	<i>sea sei</i>	<i>seb sej</i>	<i>sea seb sec</i>	<i>sea sec sed</i>	<i>sea seg sei</i>	<i>sec sed sei sen</i>	<i>sea sem sen seo</i>	<i>sec sed sem sen seo</i>	<i>sea seb sec sej</i>	<i>see seg sem sen seo</i>	T O T A L	
SCN																										
<i>S. epidermidis</i>	7	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. hyicus</i>	8	4	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16
<i>S. haemolyticus</i>	3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>S. warneri</i>	22	1	1	1	1	1	0	0	0	1	3	1	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	37
<i>S. hominis</i>	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>S. capitis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. chromogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. cohnii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. pasteurii</i>	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>S. schleiferi</i>	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>S. saprophyticus</i>	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. sciuri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. simulans</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>S. xylosum</i>	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	5
Total	50	11	12	2	4	3	1	1	0	4	7	1	4	0	1	0	0	6	0	0	1	1	0	0	0	109
SCP																										
<i>S. aureus</i>	10	7	6	3	3	1	0	0	1	2	3	0	2	2	0	1	2	1	1	1	0	0	1	1	0	48
<i>S. intermedius</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>S. hyicus</i>	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>S. schleiferi</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	16	9	10	3	3	1	0	0	1	2	3	0	7	2	0	1	2	2	1	1	0	0	1	1	0	66

As Figuras 3 e 4 ilustram distribuição da presença dos genes codificadores de enterotoxinas nas linhagens de SCN e SCP, respectivamente.

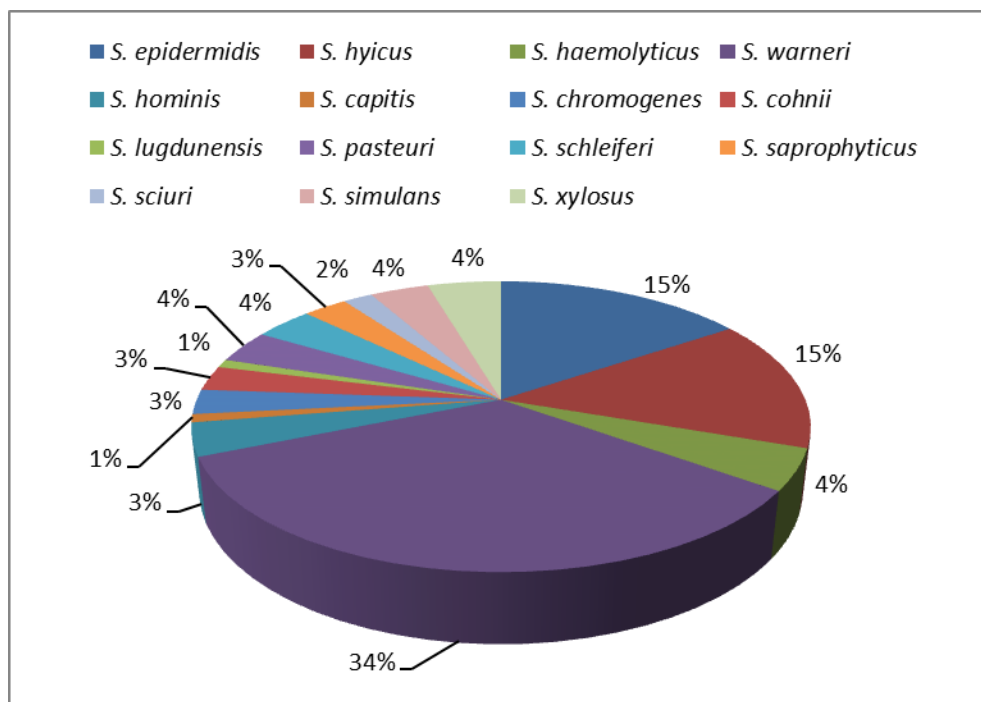


Figura 3. Genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de SCN isoladas de mastite bovina. Botucatu-SP.2015.

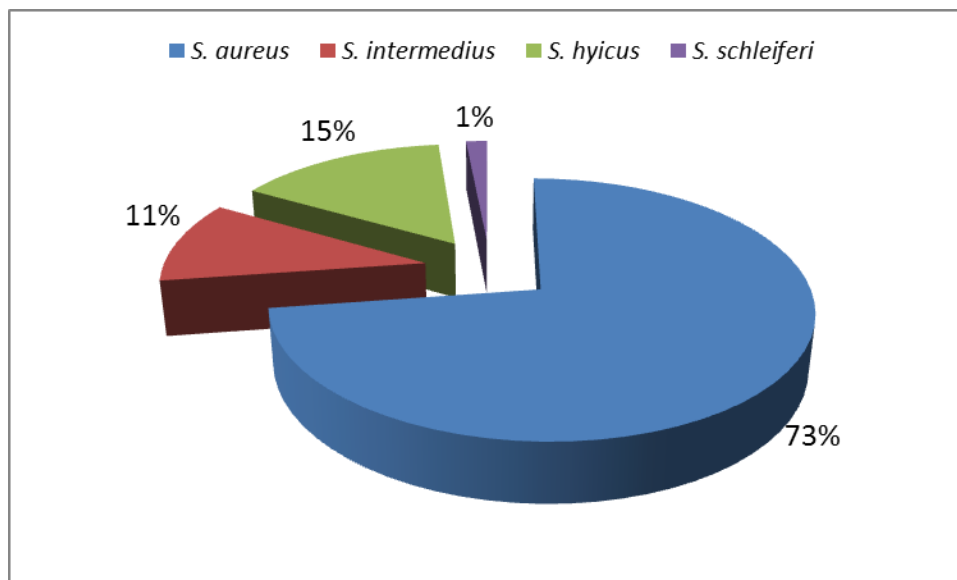


Figura 4. Genes codificadores de enterotoxinas linhagens de SCP isoladas de mastite bovina. Botucatu-SP.2015.

A tabela 9 exibe os resultados referentes à detecção de genes codificadores de enterotoxinas nas linhagens de SCN e SCP analisadas. Verifica-se que foram detectados genes codificadores para enterotoxinas em 175 (58,3%) das 300 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina. SCN apresentaram estes genes em 109 (73%) das linhagens em frequência significativamente maior (0,0001, teste de Fisher) se comparado com as linhagens de SCP, com 66 (44%) produtoras destes genes.

Tabela 9. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de SCP e SCN isoladas de casos de mastite bovina. Botucatu-SP. 2015.

Gene codificador de enterotoxinas	Gene positivo	Gene negativo	Total
SCN	109 (72,7 %) ^a	41	150
SCP	66 (44,0 %) ^b	84	150
Total	175 (58,3 %)	121	300

^a $P < 0,0001$, significativo (Teste de Fisher) a presença de genes codificadores em SCN foi superior aos SCP.

Nas Tabelas 10 e 11 verifica-se as frequências da presença de genes codificadores de diferentes enterotoxinas estafilocócicas para as principais espécies de SCN e SCP, respectivamente. Entre as espécies SCN que apresentaram com mais frequência genes codificadores de enterotoxinas foram: *S. warneri* 37(77,1%), *S. epidermidis* 17(77,3%) e *S. hyicus* 16(80,0%). Observou-se que dois isolados de *S. warneri* apresentaram mais de três genes.

Tabela 10. Frequência de genes codificadores de diferentes enterotoxinas estafilocócicas nos principais espécies SCN isoladas de casos de mastite. Botucatu-SP, 2015.

Genes Codificadores Enterotoxinas	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa							
	<i>S.warneri</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. hyicus</i>		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>sea</i>	22	59,4	7	41,2	8	50,0	37	52,8
<i>seb</i>	1	2,7	1	5,9	4	25,0	6	8,6
<i>sec</i>	1	2,7	0	0	1	6,2	2	2,8
<i>sed</i>	1	2,7	1	5,9	0	0	2	2,8
<i>see</i>	1	2,7	1	5,9	1	6,2	3	4,3
<i>seg</i>	1	2,7	1	5,9	0	0	2	2,8
<i>seh</i>	0	0	1	5,9	0	0	1	1,4
<i>sej</i>	0	0	1	5,9	0	0	1	1,4
<i>sea + seb</i>	1	2,7	1	5,9	2	12,5	4	5,7
<i>sec + sed</i>	2	5,4	1	5,9	0	0	3	4,3
<i>sea + sec</i>	3	8,1	1	5,9	0	0	4	5,7
<i>seb + sec</i>	1	2,7	0	0	0	0	1	1,4
<i>sea + sei</i>	1	2,7	0	0	0	0	1	1,4
<i>sea + sec + sed</i>	0	0	1	5,9	0	0	1	1,4
<i>sea + sem + sen + seo</i>	1	2,7	0	0	0	0	1	1,4
<i>sec + sed + sem + sen + seo</i>	1	2,7	0	0	0	0	1	1,4
Positivos	37	77,1	17	77,3	16	80,0	70	77,8
Negativos	11	22,9	5	22,7	4	20,0	20	22,2
Total	48	100	22	100	20	100	90	100

Na tabela 11 verifica-se que espécies SCP que apresentaram genes codificadores de enterotoxinas com mais frequência foram: *S. aureus* em 48(45,7%), *S. intermedius* em 7(33,3%) e *S. hyicus* em 10(52,6%) linhagens. Observou-se em três linhagens de *S. aureus* apresentaram, simultaneamente, mais de três genes.

Tabela 11. Frequência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas nas principais espécies SCP isolados de casos de mastite. Botucatu-SP, 2015.

Genes Codificadores Enterotoxinas	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva							
	<i>S. aureus</i>		<i>S. intermedius</i>		<i>S. hyicus</i>		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>sea</i>	10	20,8	1	41,2	4	40,0	15	23,1
<i>seb</i>	7	14,6	1	5,9	1	10,0	9	13,8
<i>sec</i>	6	12,5	1		3	30,0	10	15,4
<i>sed</i>	3	6,2	0	0	0	0	3	4,6
<i>see</i>	3	6,2	0	0	0	0	3	4,6
<i>seg</i>	1	2,1	0	0	0	0	1	1,5
<i>sea + seb</i>	2	4,2	0	0	0	0	2	5,7
<i>sec + sed</i>	2	4,2	4	5,9	1	10,0	7	4,3
<i>sea + sec</i>	3	6,2	0	5,9	0	0	3	4,6
<i>seb + sec</i>	1	2,1	0	0	0	0	1	1,5
<i>sea + see</i>	2	4,2	0	0	0	0	2	3,1
<i>seb + sej</i>	1	2,1	0	0	0	0	1	1,5
<i>sea + seb + sec</i>	2	4,2	0	0	0	0	2	3,1
<i>sea + sec + sed</i>	1	2,1	0	0	1	10,0	2	1,5
<i>sea + seg + sei</i>	1	2,1	0	0	0	0	1	
<i>sea + seb + sec + sej</i>	1	2,1	0	0	0	0	1	1,5
<i>sec + sed + sei + sen</i>	1	2,1	0	0	0	0	1	1,5
<i>see + seg + sem + sen + seo</i>	1	2,1	0	0	0	0	1	1,5
Positivos	48	45,7	7	33,3	10	52,6	65	44,8
Negativos	57	54,3	14	66,7	9	47,4	80	55,2
Total	105	100	21	100	19	100	145	100

5.5. Expressão das enterotoxinas

Não foi verificada a expressão de genes para a produção de enterotoxina pela técnica de RT-PCR nas linhagens de SCN, bem como, nas de SCP. Os controles positivos utilizados expressaram suas toxinas, validando a sensibilidade das técnicas utilizadas no presente estudo.

5.6. Relação da Intensidade da reação inflamatória entre SCN e *S. aureus*

Na Tabela 12 podem ser avaliados os resultados referentes à CCS em amostras de leite provenientes de mastite bovina subclínica causadas por linhagens de *S. aureus* e das espécies mais isoladas de SCN. Detectaram-se altos valores de CCS (células por mL x 10³), não só apresentado por *S. aureus*,

mas também pelas espécies de SCN. Valores superiores a dois milhões de células por mililitro de leite foram observados em glândulas mamárias infectadas tanto por espécies de SCP como de SCN.

Tabela 12. Linhagens de SCN e *S. aureus* em relação à CCS (mediana) das amostras de leite dos casos de mastite bovina e das quais foram. Botucatu-SP, 2015.

Espécies	N	CCS (células por mL x 10 ³)		
		Mediana	Mínima	Máxima
<i>S. warneri</i>	28	439.50	45.000	5904.0
<i>S. epidermidis</i>	18	317.00	19.000	2492.0
<i>S. hyicus</i>	13	339.00	24.000	2196.0
<i>S. aureus</i>	83	850.00	10.000	8650.0

P= 0,0089, significativa (Teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica))

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Identificação fenotípica e genotípica de SCP e SCN

Na presente pesquisa foram identificadas por testes bioquímicos e moleculares 22 espécies do gênero *Staphylococcus* o que confirma a pluralidade e heterogeneidade deste gênero na etiologia das mastites, também assinalado em pesquisas anteriores (SIQUEIRA, 2011; GUIMARÃES, 2011; de FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

Ao se analisar a correlação entre os métodos fenotípico e genotípico, utilizados na identificação das espécies dos 300 *Staphylococcus* isolados dos casos de mastite bovina, observou-se alta concordância, SCN foi de 96,7% e em SCP foi de 98,7.%.

Em 300 linhagens de SCN isolados de hemoculturas de humanos, Pereira (2014) verificou também alta concordância entre os métodos fenotípicos e genotípicos na identificação das espécies.

O menor custo da caracterização fenotípica na rotina de diagnóstico, possibilita um maior acesso à maioria dos laboratórios, embora mais trabalhosa e demorada. Em contraposição, a identificação genotípica exige recursos laboratoriais mais sofisticados, possibilita a obtenção de resultados mais rápidos e em alguns casos, mais precisos.

A caracterização molecular de patógenos é importante considerando, muitas vezes, as diferenças sutis entre as espécies, proporcionando esclarecimento da epidemiologia da infecção. A alta concordância detectada entre os métodos no presente estudo é importante uma vez que faculta à adoção de qualquer uma das metodologias no diagnóstico das espécies do gênero *Staphylococcus*, de acordo com as características do laboratório.

Em relação aos SCP isolados de casos de mastite bovina verificou-se o predomínio de 105 (70 %) *S. aureus*, (14%) *S. hyicus* e (13%) *S. intermedius*, resultado condizente com o encontrado por outros pesquisadores que também referiram essas espécies como as mais importantes na etiologia das mastites (SIQUEIRA, 2011; de FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

Entre as linhagens SCN isoladas de casos de mastite bovina *S. warneri* foi prevalente ($P = 0,0004$, significante, Teste de Fisher, IC =95%)

correspondendo a 33% dos isolados, seguido por *S. epidermidis* (15%) e *S. hyicus* (15%). Em estudos anteriores, Brabes et al. (1999) isolaram: *S. chromogenes* (11,8%), *S. sciuri* (9,5%), *S. simulans* (7,8%), *S. hyicus* (6,3%), *S. xylosum* (4,7%), *S. warneri* (2,36%), *S. epidermidis* (0,8%), *S. saprophyticus* (0,8%), *S. caprae* (0,8%) e *S. hominis* (0,8%) de 127 amostras de leite de animais com mastite de propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais. Costa et al. (2008) identificaram as seguintes espécies de SCN: *S. warneri* (45,5%), *S. hyicus* (18,2%), *S. chromogenes* (14,3%), *S. epidermidis* (5,2%), *S. saprophyticus* (5,2%), *S. haemolyticus* (52%), *S. capitis* (2,6%); *S. simulans* (1,3%), *S. xylosum* (1,3%), *S. hominis* (1,3%).

As espécies mais frequentemente isoladas em diversos países foram: *S. chromogenes* e *S. epidermidis* de acordo com estudos referidos por Carillo-Casas e Miranda-Morales (2012). Os resultados destes estudos destacam o aumento da ocorrência de mastites bovinas por SCN em vários países como Argentina (CALVINHO et al., 2001), Hungria (JANOSIL; BALTAY, 2004), Holanda (SAMPIMON et al., 2009), e Alemanha (SCHWARZ et al., 2010).

Em pesquisa realizada no estado de São Paulo em amostras de leite de animais em propriedades leiteiras do sistema orgânico de produção, Siqueira (2011) identificou quatro espécies de SCP, *S. intermedius* (46,56%), *S. aureus* (22,42%), *S. schleiferi coagulans* (5,18%), *S. hyicus* (1,72%) incluindo uma subespécie do *S. aureus* [*S. aureus anaerobius* (6,88%)] e três espécies de SCN, *S. warneri* (13,80%), *S. capitis* (1,72%), *S. epidermidis* (1,72%).

Estudo realizado em fazendas da região noroeste do estado de São Paulo em amostras de leite de casos de mastite bovina de 1148 vacas em lactação, identificaram quatro espécies de SCP e 18 espécies SCN. Entre essas, as mais prevalentes foram *S. aureus* (68%) entre as SCP e *S. warneri* (31%), *S. epidermidis* (14,8%) entre os SCN (de FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

Em humanos, SCN constituem a maior causa de bacteremia em infecções nosocomiais, na maioria dos casos em pacientes mantidos em unidades de tratamento intensivo. Em hemoculturas de casos clínicos de pacientes, no Hospital das Clínicas de Botucatu, entre os 300 SCN isolados foi verificado que a espécie mais frequente foi *S. epidermidis* (74,3%), seguida por *S. haemolyticus* (9,0%), *S. hominis* (7,3%), *S. warneri* (4,7%), *S. lugdunensis*

(3,0%) e *S. capitis* (1,7%) (PEREIRA, 2014). Em isolados de materiais clínicos de origem humana (artrites sépticas, sepses) tem se verificado o predomínio de *S. epidermidis* entre os SCN (CUNHA et al., 2007, VASCONCELOS et al., 2011).

As espécies de SCN diferem em relação aos fatores de virulência, à susceptibilidade aos antimicrobianos e à resposta do hospedeiro à infecção de acordo com vários autores (BIRGESSION et al., 1992; DEVRIESE et al., 2002; de FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

Zaddocks e Schukken, (2006) ressaltaram as diferenças significativas em relação à patogenicidade de várias espécies de SCN, as quais estudaram com técnicas de diagnóstico molecular. E, consideraram ser extremamente relevante a identificação das espécies de SCN em inquéritos epidemiológicos, para o melhor conhecimento da patogenicidade e para o desenvolvimento de práticas de manejo específicas, a fim de prevenir a mastite por estes micro-organismos. Ainda, esses autores destacaram a importância do estudo dessas espécies de forma mais individualizada.

Esta assertiva foi corroborada pelos resultados obtidos em relação a algumas espécies, como *Staphylococcus chromogenes*, que de acordo com diversos autores está bem adaptado à glândula mamária e tem sido isolado da pele do úbere e do canal do teto (BODDIE et al., 1987; MATTHEWS et al., 1992; TAPONEN et al., 2008). Taponen et al. (2008) detectou os mesmos pulsotipos (PFGE) de *S. chromogenes* da pele do úbere e do leite de casos de mastite, o que suporta a hipótese de que linhagens de *S. chromogenes* que colonizam a pele podem constituir patógenos da glândula mamária. Estudos dessa natureza permitem elucidar aspectos epidemiológicos importantes tais como estabelecer portadores e vias de transmissão.

S. epidermidis, é outra espécie que tem sido frequentemente isolada de casos de mastite bovina. Em pesquisa realizada em duas fazendas com alta ocorrência de infecções intramamárias por *S. epidermidis*, os isolados do leite foram comparados com estirpes da pele de ordenhadores por PFGE, sendo encontrado o mesmo padrão genotípico, indicando que as infecções intramamárias por *S. epidermidis* poderiam ser de origem humana (THORBERG et al., 2006).

Por outro lado, SCN estão frequentemente associados às infecções nosocomiais e os profissionais da saúde podem ser portadores e disseminá-los no hospital e na comunidade. Rosa et al. (2009) investigou as espécies de SCN de 100 isolados da saliva de profissionais da enfermagem, determinar o perfil de resistência e detectar o gene *mecA*. Os autores identificaram 41% *S. epidermidis*, 25% *S. saprophyticus*, 18% *S. haemolyticus*, 8% *S. cohnii*, 4% *S. lugdunenses*, 3% *S. capitis*, e 1% *S. simulans*. Desses, 32% apresentaram resistência à oxacilina, 32% à cefoxitina, e todos foram sensíveis à vancomicina, ainda nesse estudo o gene *mecA* foi detectado em 75%.

Ao se comparar os resultados obtidos por Rosa et al. (2009), com a presente pesquisa, pode-se verificar que muitas espécies isoladas em humanos, foram também isoladas causando mastite nos animais, o que ressalta a importância na identificação dessas espécies. Muitas vezes as linhagens oriundas de animais podem causar agravos em humanos. No entanto, ao contrário, bovinos podem estar se infectando com linhagens de origem humana.

6.2. Genes codificadores de enterotoxinas:

Foram detectados genes codificadores para enterotoxinas clássicas (*sea.seb,sec,sed*) e demais enterotoxinas (*see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq*) em 175 (58,3%) das 300 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina. SCN apresentaram estes genes em 109 (73%) das linhagens sendo significativamente maior (0,0001, teste de Fisher) se comparado com as linhagens de SCP, com 66 (44%) destes genes (Tabela 9). Entre as espécies SCN que apresentaram genes codificadores de enterotoxinas com maior frequência foram: *S. warneri*, *S. epidermidis* e *S. hyicus*. Entre SCP, *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*.

Cunha et al. (2007) pesquisando SCN isolados de amostras clínicas de recém nascidos, detectaram 40% de positividade em pelo menos um gene codificador de enterotoxinas. Pereira (2014) obteve 90,7% de positividade, para pelo menos um dos genes pesquisados, em linhagens SCN isolados de amostras de hemoculturas humanas. No mesmo estudo, verificou-se que entre os genes clássicos, *sea* foi o frequente em 172 (57,3%) linhagens, seguido por

sec em 105 (35,0%), *seb* em 70 (23,3%) e *sed* em 7 (2,3%). Calsolari et al. (2011) observaram em linhagens de SCN isoladas de neonatos 18,6% de positividade para o gene *sea*. Os resultados desses estudos reforçam o papel dos SCN como portadores de genes para diferentes enterotoxinas e a possibilidade de constituírem agentes tanto em infecções como toxi-infecções alimentares.

No presente estudo, *sea* (que codifica a enterotoxina A ou SEA) predominou tanto entre as linhagens SCN como SCP com 45,9% e 24,2% de positividade, respectivamente. Entre todas as espécies, *S. warneri* foi o que apresentou maior número de genes codificadores para esta toxina (20,2%).

O gene *sea* pode ser facilmente disseminado entre as linhagens de *Staphylococcus*, enquanto a enterotoxina A, é a mais relacionada com intoxicações alimentares, por ser tóxica mesmo em baixas concentrações (BALABAN; RASOOLY, 2000).

O gene *sec* foi o segundo mais detectado entre as enterotoxinas clássicas nas vacas amostradas encontrado em 12 (11,0%) linhagens de SCN. Resultado similar foi obtido por Pereira (2014) em isolados de hemoculturas em pacientes humanos.

Deve-se ressaltar, ainda, no presente estudo a detecção concomitante de dois ou mais genes em diversos isolados dos casos de mastite. Entre os SCN, uma linhagem de *S. warneri* apresentou concomitantemente cinco genes (*sec, sed, sem, sem, seo*). Entre os SCP, uma linhagem de *S. aureus* também apresentou simultaneamente cinco genes diferentes (*see, seg, sem, sem, seo*).

Outros genes como *seg* e *sei* têm sido detectados com alta frequência em linhagens de SCN de origem humana (PEREIRA, 2014). Paralelamente foram detectados em alta porcentagem em *S. aureus* de origem humana (VARSHNEY et al., 2009). Entretanto, no presente estudo, ocorreram em baixa frequência. Nos SCN foram identificados 2,8% *seg* e 1% *sei*, enquanto SCP foram 4,5% *seg* e 3% *sei*.

6.3. Expressão das enterotoxinas

Não foi comprovada a expressão de genes para a produção de enterotoxina pela técnica de RT-PCR nas linhagens de SCN, bem como, nas

de SCP. Os controles positivos utilizados expressaram toxinas, validando a sensibilidade das técnicas utilizadas no presente estudo. Resultados similares em SCN foram verificados por Pereira (2014), que identificaram apenas cinco linhagens de *S. epidermidis* expressando, os genes, das quais uma foi positiva para SEA, duas para SEC, uma para SEI e uma concomitantemente para SEG e SEI. Apesar de não ter sido detectada a expressão dos genes codificadores, deve-se ressaltar a relevância dessas bactérias, pelo potencial de produção de enterotoxinas outros fatores de virulência e resistência como *mecA*, *vanA*, além da possibilidade de transferência e disseminação entre espécies do gênero, como ressaltado por Ibrahim (2010).

6.4. Relação da intensidade da reação inflamatória entre SCN e *S. aureus*

As linhagens de estafilococos avaliadas no presente estudo foram isoladas de casos de mastite bovina, diagnosticados pelos testes de CMT e CCS, que refletem a elevação de células somáticas por mililitro de leite em decorrência do processo inflamatório. Foram verificados altos níveis de CCS tanto em amostras de leite de glândulas infectadas por linhagens de SCN, como linhagens de SCP. As medianas de CCS mais elevadas foram detectadas nas glândulas mamárias infectadas com *S. aureus* entre os SCP e com *S. warneri* entre os SCN (Tabela 12) No entanto, foram verificados altos valores de CCS também em amostras de leite de glândulas mamárias infectadas por outras espécies de SCP e de SCN, valores superiores a dois milhões de células por mL de leite. Ainda, em alguns casos de mastite, foi observada CCS com valores superiores a 10 milhões de células por mL de leite.

Na Suécia, Persson et al. (2011) referiram que SCN são o segundo agentes etiológicos mais frequentes de mastite subclínica. Nesse estudo foram detectados em 16% das amostras de leite de glândulas mamárias com alto CCS.

Em geral, a redução na produção está diretamente relacionada ao aumento de CCS. As perdas na produção são de 375 kg por caso de mastite clínica e, em casos de mastite subclínica, aproximadamente de 0,5 kg a cada duas vezes o aumento de CCS, de acordo com referido por Seegers et al. (2003). Ao se considerar a redução da produção leiteira a mastite subclínica

causa o maior impacto, devido ao caráter crônico da evolução, permanecendo, muitas vezes, não detectada por longos períodos por não apresentar sinais visíveis (SEEGERS et al., 2003). Por estas características, combinado à sua alta prevalência, SCN representam considerável prejuízo à produção leiteira de um país (HALASA et al., 2007; TESFAYE et al., 2010).

Alguns autores descreveram a ação das enterotoxinas no desencadeamento de resposta inflamatória exacerbada com liberação de citocinas, que ativam grande quantidade de células T e macrófagos, lesando o tecido (BREMELL; TARKOWSKI, 1995; MICHELIN, 2005). Entretanto, no presente estudo, não foram detectadas diferenças significantes, ao se comparar a CCS/mL no leite de glândulas mamárias infectadas com linhagens carreando genes codificadores de enterotoxina, com aquelas infectadas por linhagens que não os carreavam, o que pode ser explicado por não estarem expressando esses genes. Estes resultados refletem também a existência de outros fatores de virulência relacionados à resposta inflamatória na infecção mamária por estafilococos.

6.5. Resistência aos antimicrobianos

A resistência de bactérias isoladas de leite aos antimicrobianos é observada com frequência em diferentes estudos. Tal fato foi observado por vários pesquisadores tanto em amostras clínicas de humanos como nas de animais (NADER FILHO et al., 2007, RIBEIRO et al., 2009, GUIMARÃES, 2011, SIQUEIRA, 2011). DEURENBERG (2008) referiu que cerca de 80% de *S. aureus* são resistentes à penicilina. No presente estudo, nos testes de difusão com discos, as linhagens de SCP e de SCN apresentaram resistência mais alta aos betalactâmicos. A resistência dos SCP e SCN à penicilina G foi de 36,0% e 24,7%; à ampicilina de 34,0% e 22,7% e à oxacilina de 16,7% e 13,3%, respectivamente.

Em vários países do norte do continente europeu a resistência de *S. aureus*, isolados de mastite bovina, à penicilina tem se mostrado mais baixa que a observada em SCN (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). Em relação à resistência a outros antimicrobianos, *S. aureus* têm sido considerados mais suscetíveis em geral que a maioria dos isolados SCN, que são resistentes a um ou mais antimicrobianos (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). Em contraposição,

outros estudos referiram que a resistência à penicilina é mais observada em *S. aureus* isolados de casos de mastite que entre isolados de SCN (BOTREL et al., 2010; PITKÄLÄ et al., 2004; ABRAHAMSÉN, 2012).

Ribeiro et al. (2009) além da resistência para às penicilinas em estafilococos de vacas em sistema orgânico de produção verificaram uma alta resistência à neomicina. No presente estudo a resistência à neomicina apresentada pelos isolados foi a quarta entre a mais elevadas, nos antimicrobianos avaliados, sendo que 8,0% em linhagens de SCP e 12,0% em linhagens de SCN foram resistentes.

Os únicos antimicrobianos para os quais não se detectou resistência entre os diferentes isolados de estafilococos estudados foram: enrofloxacino, cefoxitina e cefalotina. De maneira geral, tais antimicrobianos têm-se mostrado efetivos nos casos de mastite por SCN e SCP (COSTA et al., 2004; NADER FILHO et al., 2007; GUIMARÃES, 2011; SILVA et al., 2014).

6.6. Resistência à Vancomicina e Oxacilina e pesquisa do gene *mecA* e *vanA*

Os resultados obtidos, quando se analisou a resistência *in vitro* à oxacilina em SCN e SCP isolados de mastite bovina e a presença de *mecA*, demonstraram elevada associação (estatisticamente significativa).

Foi observada resistência frente à oxacilina em 20 (19%) linhagens de *S. aureus*. Em relação aos SCN, 18 linhagens foram resistentes à oxacilina, sendo 6 (12,5%) *S. warneri*, 4 (18,2%) *S. epidermidis*, 3 (30,0%) *S. xylosus*, 2 (10,0%) *S. hyicus*, 1(14,3%) *S. haemolyticus*, 1(33,3%) *S. sciuri subsp sciuri*, 1(50,0%) *S. lugdunensis*.

A CIM foi avaliada pela técnica de E-test frente a oxacilina e vancomicina dois dos principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções por estafilococos.

A resistência à oxacilina e, por consequência, à meticilina, como esperado, é mais alta em amostras nosocomiais de origem humana, que nos isolados de animais, uma vez que tem sido o antimicrobiano de primeira escolha no tratamento das infecções estafilocócicas. Fato evidenciado em pesquisas de autores como Moussallem et al. (2007), que diagnosticaram uma frequência 88,6% de infecções por SCN em pacientes admitidos na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal, dos quais 79,5% das linhagens eram

resistentes à oxacilina. E, a análise das amplificações por PCR do gene *mecA* indicou que 62,8% das linhagens fenotipicamente resistentes à meticilina possuíam o gene *mecA*. Similarmente, Pereira (2014) detectou 68% de resistência à oxacilina em SCN isolados de amostras de hemocultura em pacientes humanos.

No presente estudo *mecA* foi detectada em 44 (42%) das linhagens de *S. aureus*. As CIMs apresentaram resistência à oxacilina em apenas 20 (19%) das linhagens, sendo que destas, 16 carregavam gene *mecA*. Ainda, quatro isolados apresentaram resistência mas foram *mecA* negativo, o que pode ser explicado devido à outros mecanismos de resistência, como produção de betalactamases por exemplo.

Nas linhagens de SCN, foi detectado o gene *mecA* em 17 (11%) nas seguintes espécies: 8 (16,7%) *S. warneri*, 4 (18,2%) *S. epidermidis*, 1 (14,3%) *S. haemolyticus*, 1 (10,0%) *S. xylosus*, 1 (5,0%) *S. hyicus*, 1 (30,0%) *S. sciuri subsp sciuri*, 1 (50,0%) *S. lugdunensis*.

Foi verificado nos 300 *Staphylococcus* spp. (SCP e SCN) que 82% dos isolados que carregavam o gene *mecA* expressavam resistência à oxacilina, sendo que entre os SCP, como só em *S. aureus* foi detectado o gene *mecA*, 80% expressavam a resistência, isto é eram MRSA.

S. aureus meticilina resistentes continuam a ser um grave problema em humanos durante a hospitalização e na atualidade tem se disseminado na comunidade não hospitalar (VOYICH et al., 2006; OTTO et al., 2013). A ocorrência de MRSA em hospitais, bem como na comunidade é uma preocupação significativa e dispendiosa à saúde pública.

Paralelamente, linhagens de MRSA têm sido detectadas em várias espécies de animais domésticos em todo o mundo (TENHAGEN et al., 2014).

Zadoks et al. (2000) e Kaszanyitzky et al. (2004) ressaltaram que linhagens *Staphylococcus* spp. meticilina-resistente passaram a ser problema relevante na etiologia da mastite bovina. LEE (2003) referiu que estes micro-organismos constituem um risco para a saúde humana.

Os resultados obtidos na presente pesquisa referendam o descrito por Kaszanyitzky et al. (2004) e corroboram com a assertiva enunciada por Lee (2003) ao evidenciar que não só *S. aureus*, mas outras linhagens de *Staphylococcus* spp. meticilina-resistentes constituem problema relevante não

somente na etiologia da mastite bovina, como também representam risco potencial para a saúde humana.

Em razão da crescente resistência à oxacilina, passou a ser utilizada a vancomicina como medicamento de segunda escolha. Portanto, considerou-se importante avaliar a resistência a este antimicrobiano entre os isolados de estafilococos nos casos de mastite bovina.

No presente estudo foi detectada resistência frente à vancomicina no teste de disco difusão (9,3% SCN e 3,7% SCP). No entanto é importante referir que esse teste não é o adequado para a verificação da resistência frente à vancomicina, mas foi utilizado como critério de triagem para posterior realização da avaliação de CIM, não sendo entretanto demonstrada resistência entre os isolados avaliados. Ressalta-se, contudo, a detecção de linhagens com resistência parcial à vancomicina. Este fato é extremamente preocupante, uma vez que esse antimicrobiano não é utilizado na medicina veterinária, mas é o fármaco de escolha para casos de infecções nosocomiais por estafilococos resistentes a meticilina.

A detecção de linhagens com resistência intermediária à vancomicina vem despertando atenção internacionalmente. Howden et al. (2010) ressaltaram que emergência destas linhagens VISA (*S. aureus* resistência intermediária à vancomicina) desde a década passada tem constituído verdadeiro desafio para o diagnóstico, tratamento e estudos sobre os mecanismos de resistência desta cepas. Howden et al. (2010) também referiram que estas cepas tem sido recentemente detectadas globalmente e, na maioria dos casos associadas com falha do tratamento com vancomicina.

Não foi detectado gene *vanA* codificador da resistência à vancomicina, o que confirma os resultados da CIM onde nenhum isolado apresentou resistência a este antimicrobiano. Pereira (2014) encontrou resultados similares, pois não detectou resistência à vancomicina entre as 300 linhagens de SCN isoladas de origem humana.

Novas estudos devem ser realizadas com o intuito de pesquisar o gene *vanA* e outros genes relacionados à codificação de resistência à vancomicina, uma vez que já foi comprovada a possibilidade do gene *vanA* ser transferido de enterococos para uma variedade de bactérias gram-positivas, incluindo *S. aureus* (NOBLE et al., 1992). Deve-se considerar que as interações entre

patógenos que podem suscitar a transferência de genes de resistência aos antimicrobianos são factíveis de ocorrer em diversas situações. Isto se evidencia na etiologia de alguns casos de mastite em que podem estar associados mais de um patógeno na mesma glândula mamária. E, ainda, há a possibilidade de transferência desses genes e de genes responsáveis por outros fatores de virulência, pela exposição ao grande número de bactérias presentes em latões, tanques de refrigeração e caminhões de entrega.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a importância dos cuidados no manejo dos rebanhos, diagnóstico e controle de mastite e ainda, a necessidade da adequação na legislação e uma criteriosa fiscalização para garantir a qualidade do leite, pois foram identificadas 22 diferentes espécies do gênero *Staphylococcus* isolados de casos de mastite bovina. Tradicionalmente apenas *S. aureus* tem sido considerado relevante em relação à saúde pública, entretanto foram detectadas, não só em linhagens de *S. aureus*, mas também outras espécies SCP e SCN uma vasta gama de genes codificadores de enterotoxinas, sendo esses genes evidenciados em maior frequência em linhagens de SCN que em SCP. A detecção de SCN e SCP portadores de genes para diferentes enterotoxinas reflete a possibilidade de servirem como agentes tanto em infecções como toxi-infecções alimentares.

Destaca-se ainda a resistência a vários antimicrobianos, ressaltando-se a presença de cepas com sensibilidade parcial à vancomicina demonstrada pela concentração inibitória mínima em SCN, tanto em *S. aureus* quanto em SCN, a emergência destas linhagens VISA (*Staphylococcus aureus* resistência intermediária à vancomicina) vem suscitando atenção internacionalmente pelo risco à saúde pública.

A alta concordância entre os métodos fenotípicos e genotípicos na identificação das espécies de SCN permitiu concluir ser suficiente a utilização de qualquer uma dessas metodologias. A caracterização fenotípica é mais acessível à maioria dos laboratórios, por outro lado, a identificação genotípica quando já padronizada em laboratórios equipados permite uma execução mais rápida, precisa e menos laboriosa.

Foram verificados altos valores de CCS nas amostras de leite de glândulas mamárias infectadas por *S. aureus*, por outras espécies de SCP e por espécies de SCN, sendo verificados valores superiores a dois milhões de células por mililitro de leite. E, em alguns casos de mastite por espécies de SCN foram constatados CCS com valores superiores a 10 milhões de células por mL de leite.

Não foi comprovada a expressão de genes para a produção de enterotoxina, mas deve-se ressaltar a relevância dessas bactérias,

potencialmente capazes de produzir enterotoxinas e outros fatores de virulência e resistência, como foi demonstrada fenotípica e genotipicamente pela detecção de *mecA*, pela possibilidade de transferência e disseminação entre espécies deste e de outros gêneros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAERESTRUP, F.M.; BAGER, F.; JENSEN, N.E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.C. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: A baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, v.106, p.745-70, 1998.

ABRAHAMSEN, M. (2012). Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda, Master of Science Thesis. Uppsala, Sweden: Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences.

ALCARÁS, L.E.; SATORRES, S.E.; SEPULVEDA, L.; CENTORBI, O. N. P. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. *La Alimentación Latino Americana*, n.219, p.44-47, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE LEITE. O Estado de São Paulo, São Paulo, 19 maio 1999. Supl Agríc, n. 2271, p. 12-13, 1999.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, v.2, n.7, p.1751-1773, 2010.

AYDIN, A.; SUDAGIDAN, M.; MURATOGLU, K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, v. 148, p. 99–106, 2011.

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J. Clin. Microbiol.* v.19, p.875-79, 1984.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins (review). *Int. J. Food Microbiol.* v.61, p.1-10, 2000.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W.; ZHAO, X.; HOPE, J.C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* v.11, n.3, p.463–472, 2004.

BARDIAU, M.; YAMAZAKI, K. DUPREZ, J.N.; TAMINIAU, B. MAINIL, J.G.; OTE, I. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Lett Appl Microbiol.* v. 57, n. 3, p.181-6, 2013.

BARHEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* v.89, p.1877–1895, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BERTRAND, J.A. Influence of shipping container preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. *Journal of Dairy Science*, v.6, n.1, p.145-148, 1996.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, p.463-523, 1989.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N.; WEISS, K.; BORJA, C.R.; HUANG, Y.; CHU, F.S. The staphylococcal enterotoxins: similarities. *Contrib Microbiol Immunol.*, v.1, p.390-6, 1973.

BERGONIER D, de CRÉMOUX R, RUPP R, LAGRIFFOUL G, BERTHELOT X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res.* v. 34 n. 5, p.689-716, 2003.

BHATIA, A.; ZAHOR, S. Staphylococcus aureus Enterotoxins: A Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, v.1, n. 3, p.188-197, 2007.

BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; WATTS, J.L. Udder microflora in nonlactating heifers. *Agri-Practice*, v.8, p.22–25, 1987.

BOGADO, I.; LIMANSKY, A.; SUTICH, E.; MARCHIARO, P.; MARZI, M.; PUTERO, J.; VIALE, A. Molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.23, p.447–451, 2002.

BOTREL, M.A.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J.Y.; CALAVAS, D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in RhôneAlpes, France. *Journal of Dairy Research*, v. 65, p.139–142, 2010.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO Jr, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero Staphylococcus na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Rev. NAPGAMA. São Paulo, n.2, p. 4-11, 1999.

BRECKINRIDGE, J.C.; BERGDOLL, M.S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase negative enterotoxin producing Staphylococcus. N. Engl. J. Med. Boston. v.284, n.10, p.541-543, 1971.

BREMELL, T.; TARKOWSKI, A. Preferential induction of septic arthritis and mortality by superantigen-producing staphylococci. *Infect Immun.*, v.63, p. 4185-4187, 1995.

CALSOLARI, R.A.O.; PEREIRA, V.C.; ARAÚJO Jr. J.P., CUNHA, M.L.R.S.. Determination of Toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain

reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. Microbiol. Immunol. v. 55, p. 394-407, 2011

CALVINHO, L.F.; TIRANTE, L. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE*, v.4, n.1-2, p.29–40, 2005.

CARMO, L.S. Produção e purificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D. 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. Food Microbiol. v.19, p.9-14, 2002.

CARRILLO-CASAS, E. M.; MIRANDA-MORALES, R. E. (2012). Bovine mastitis pathogens: Prevalence and effects on somatic cell count, In: Narongsak Chaiyabutr (ed.) (Chulalongkorn University, Thailand) Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health, chapter 17. (ISBN 978-953-51-0765-1).

CDC. Center for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. MMWR, v.51, p.565-67, 2002.

CLIVER, D.O. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker, 613p. 1994.

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

CONAB. Conjuntura mensal Leite e Derivados. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_11_17_46_54_leite_marco_2013.pdf> acesso em 14/05/2014

COSTA, E. O. Uma contribuição da pesquisa para melhorar a produção de leite. Notícias FAPESP, n.40, p.14-16, 1999.

COSTA, E.O. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite (PNMQL). Revista Napgama, São Paulo, v.8, n.2, p.18-21, 2005.

COSTA, E.O.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C.M. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. Pesq. Vet. Bras. v. 5, p.65-69, 1985.

COSTA, E.O.; GARINO JR, F., RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R.; BUENO, J.A. Staphylococcus ISOLADOS DE MASTITE BOVINA NO DECÊNIO DE 1992 A 2001. Rev.Napgama, v.7,n.2, 2004.

COSTA, E.O.; GARINO JR.F.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; WATANABE, E.T.; VALLE, C.R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. Revista Napgama, v.3, n.4, p.6-13, 2000.

COSTA, E. O.; GUIMARÃES, F. F.; FACCIOLI, P. Y.; SANTOS, F.; LANGONI, H.; ARCARO, J.; PERES, A.; CUNHA, M. L. Identification the coagulase-negative staphylococci isolates from bovine mastitis and evaluation of the inflammatory Process. In: XXV JUBILEE WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2008, Budapeste. Oral and Poster Abstracts XXV Jubilee World Buiatrics Congress. Budapeste: Alapfotta, v.130. p.73-73, 2008.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol. Cell. Probes, v. 19, p. 299-305, 2005.

CUNHA, M.L.R.S, CALSOLARI R.A., Júnior J.P.. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol.* v.51, n. 4 p.381-90, 2007

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.* v.37, n.1, p.70-74, 2006.

CUNHA, M.L.R.S.; SINZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-negative Staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.99, n.8, p.855-60, 2004.

de FREITAS GUIMARÃES F, NÓBREGA DB, RICHINI-PEREIRA VB, MARSON PM, de FIGUEIREDO PANTOJA JC, LANGONI H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* v. 96, n. 5, p. 2866-72, 2013.

DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol.*, 26, 896–904, 2009.

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

DUQUENNE, M.; FLEUROT, I.; AIGLE, M.; DARRIGO, C.; BOREZÉE-DUPONT, E.; DERZELLE, S.; BOUX, M.; DEPERROIS-LAFARGE, V.; DELACROIX-BUCHET, A. Tool for Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression in Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1367–1374, 2010.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 24-27, 1995.

EMBRAPA. 2008. Produção Anual Leite por Estado no Brasil, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/>>

Acesso em: 11 de abril de 2014

ERGÜN, Y.; ASLANTAŞ, Ö.; DOĞRUER, G.; KIREÇCI, E.; SARIBAY, M. K.; ATEŞ, C. T.; ÜLKÜ, A.; DEMİR, C. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 33, n. 6, 477- 483, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). About EFSA. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa.htm>, 2011

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FOX, L.K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Veterinary Microbiology*, v.134, n.1-2, p.82–88, 2009.

GUIMARÃES, F.F. Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à metilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isoladas de mastites bovinas. 2011.147p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

GUIMARÃES, F.F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. *Revista Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.1, p.38-5, 2009.

HAMMERUM, A.M.; HEUER, O.E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, v.48, n.7, p.916-921, 2009.

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

HENNEKINNE, J.-A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A.-L.; DRAGACCI, S. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. *Toxins*, v.2, p.2106-2116, 2010.

HOWDEN, B.P.; DAVIES, J.K.; JOHNSON, P.D.; STINEAR, T.P.; GRAYSON, M.L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Rev. Clin Microbiol* v.23, n.1, p.99-139, 2010.

IBRAHEM, S. Methicillin Resistance in Staphylococci: Horizontal Transfer of Mobile Genetic Element (SCCmec) between Staphylococcal Species. Academic dissertation. National Institute for Health and Welfare, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland, 2010.

JÁNOSI, S.; BALTAY, Z. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. *Acta Vet. Hung.*, v.52, p.173–183, 2004.

JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASHTON, F.E., POLLARD, D.R., ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.29, n.3, p.426-430, 1991.

KASZANYITZKY, E.J.; EGYED, Z.; JANOSI, S.; KESERU, J.; GAL, Z.; SZABO, I.; VERES, Z.; SOMOGYI, P. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Vet. Hung.*, v.52, p.7-17, 2004.

KEIN, L.S. Mapeamento dos estafilococos coagulase-negativos no hospital iniversitário Antonio Pedro da Universidade Federal Fluminense, no período de 1998 a 2002 [Dissetação]. Niterói, RJ. Universidade Federal Fluminense, 2005.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. Tenover, F.C. editors. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society Microbiology, Washington 1995, p. 282-298.

KLOOS W.E.; SCHLEIFER K.H. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*. *Int J System Bacteriol.*, v.25, p.62-79, 1975.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas colorido. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2008. 1760p.

KREDIET, T.G.; JONES, M.E.; JANSSEN, K.; GERARDS, L.J.; FLEER, A.
Prevalence of Molecular Types and mecA Gene Carriage of Coagulase-
Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care Unit: Relation to
Nosocomial Septicemia. *J. Clin. Microbiol.* v.39, p.3376-3378, 2001.

KUNZ, F., CORTI, S., GIEZENDANNER, N., STEPHAN, R., WITTENBRINK, M., ZWEIFEL, C., Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from mastitis milk samples from sheep and goats, *Schweiz Arch Tierheilkd*, v. 153, n. 2, 63-69. 2011.

LAMAITA, H.C. Frequência de espécies de *Staphylococcus*, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, UFMG. Belo Horizonte. 2003. 74p.

LANGONI, H., SILVA, A.V., CABRAL, K.G., DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *rev. Bras. Med. Vet.* v.20, n.5, p.204-209, 1998.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PINTO, M. P.; LISTONI, F.J. P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.43, p.507-515, 1991.

LEE J.H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 69, p. 6489-6494, 2003.

LEE, Y.D.; MOON, B.Y.; PARK, J.H.; CHANG, H.I.; KIM, W.J. Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.17, 461–467, 2007.

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

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. v.339, p.520-532, 1998.

LOWY FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. v. 111, n. 9, p.1265-73, 2003.

MATTHEWS, K.R.; HARMON R.J.; LANGLOIS, B.E. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.1835–1839, 1992.

MELLMANN, A.; BECKER, K.; von EIFF, C.; KECKEVOET, U.; SCHUMANN, P.; HARMSSEN, D.. Sequencing and *Staphylococci* Identification. *Emerg. Infec. Dis.* v. 12, n. 2, p.333-336, 2006.

MICHELIN, A.F. Interação das enterotoxinas estafilocócicas com o sistema imune do hospedeiro. *rev. Ciênc. Farm.*, v.24, p. 83-95, 2003.

MILKPOINT. Produção de leite no Brasil deve ser de 37 bilhões de litros em 2014. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/producao-de-leite-no-brasil-deve-ser-de-37-bilhoes-de-litros-em-2014-86951n.aspx>> acesso em 14/05/2014

MONDAINI, I. A rentabilidade da atividade leiteira: um caso de produtores no médio Paraíba do Estado do Rio de Janeiro. Lavras: UFLA, 1996. 83 p. (Dissertação de Mestrado em Administração Rural).

MOUSSALLEM, B. C.; KURY, C. M.H.; ACOSTA, E.M. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. Isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. *Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos*, 3ª ed., v. 2. Rio de Janeiro, 2007

NADER FILHO, A; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.74, n. 1, p.1-4, 2007.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL, (1999). Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection. National Mastitis Council. 3rd ed. Arlington, Virginia, USA.

NOBLE, W.C.; VIRANI, Z.; CREE, R. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 93, p. 195-198, 1992.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and

determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, and *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* v.40, p.857-862, 2002.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKAME, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 246, p. 191-198. 2005.

OMORI, G.; KATO, Y. A. staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase-negative strain. *Biken's J. Berlin*, v.2, p.92- 92, 1959.

OTTO M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* v.64, p,175–188, 2013.

PANTOJA, J.C.; HULLAND, C.; RUEGG, P.L. Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. *Preventive Veterinary Medicine* v. 90, n.1-2, 43-54, 2009.

PEREIRA, V.C. Evidencia da presença do sistema agr, expressão de toxinas e resistência aos antimicrobianos em estafilococos coagulase-negativa isolados de hemoculturas. 2014.134p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

PERSSON, Y.; NYMAN, A.K.; GRÖNLUND-ANDERSSON, U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* v.53, p.36, 2011

PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTHER, J.; YANG, W.; SEYFERT, H.M.; NÜRNBERG, G.; SCHUBERTH, H.J. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary Research* v.39, n.2, p.18, 2008.

PYÖRÄLÄ, S.. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* v.43, n.s2, p.252–259, 2008.

PYÖRALA, S.; TAPONEN S. Coagulase-negative staphylococci emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v. 134, p. 3–8, 2009.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine Mastitis in Finland 2001 –prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.2433-2441, 2004.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 10ed. 2007.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B., SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n.1, p.52-58, 2009.

ROSA, J.O.; MOURA, J.P.P.; MARINÉSIA, A.P.; GIR E.R.; CLEÔMENES, K.A.; CANINI S.R.M.S., BELISSIMO-RODRIGUES, F.; PIMENTA F.C. Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes à oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.4, p.398-403, 2009.

ROWLINSON, M.C.; LeBOURGEOIS, P.; WARD, K.; SONG, Y.; FINEGOLD, S.M.; BRUCKNER, D.A.. Isolation of a Strictly Anaerobic strain of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 857-860, 2006.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de

enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 41, n. 5, 2004.

SABOUR, A.K.R.; GILL J.J.; LEPP, D.; PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* isoletes in eastern Canadian dairy herds. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.3449-3455, 2004.

SAHM, D.F. MARSILIO, M.K. PIAZZA, G. Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates: electronic surveillance with the surveillance network database-USA. *Clin Infect Dis.*, v.29, p.259–63, 1999.

SAMPIMON, O.; BARKEMA, H.W.; BERENDS, I.; SOL, J.; LAM, T. Prevalence of intramammary infection in dutch dairy herds. *Journal of Dairy Research*, v.76, n.2, p.129–136, 2009.

SANTOS, F. G. B.; OLIVEIRA, W. L. M.; GARINO JÚNIOR, F.; LEAL, N. C.; COSTA, E. O. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *S. aureus* isolados de casos de mastite. *Revista NAPGAMA*. v.8, n.2, p.14-17, 2005.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.139, p. 199-204, 1957.

SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; NADER FILHO, A. Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos da mastite bovina. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.39, n.233, p.29-33, 1984.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, n.34, v.5, p.475–491, 2003.

SCHWARZ, D.; DIESTERBECK, U.S.; FAILING, K.; KÖNIG, S.; BRÜGEMANN, K.; ZSCHÖCK, M.; WOLTER, W.; CZERNY, C.P. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany—a longitudinal study. *Journal of Dairy Science*, v.3, n.12, p.5716-5728, 2010.

SIMOJOKI, H.; HYVÖNEN, P.; PLUMED FERRER, C.; TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Microbiol*, v. 158, p.344-52, 2012.

SILVA, N.C.C.; GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; GÓMEZ-SANZ E.; GÓMEZ, P.; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; LANGONI, H.; RALL, V.L.M.; TORRES C.. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.106, n.2 p.227-233, 2014.

SIQUEIRA, A.K. Indicadores de qualidade, pesquisa de marcadores de virulência e multirresistência aos antimicrobianos em estirpes de *Staphylococcus* spp. em leite de origem bovina produzido no sistema orgânico.. 2011.154p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

SHIM, E.H.; SHANKS, R.D.; MORIN, D.E.; Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* v.87, n.8, p.2702–2708, 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS. 1990-1993. GRAPHPAD INSTAT software.2003.

STOLL. B.J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A.A.; WRIGHT, L.L.; CARLO, W.A.; EHRENKRANZ, R.A. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the

experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, v.110, p.285-91, 2002.

STÖHR, K.; WEGENER, H. C. Non-human antibiotic use and resistance. *Drug Resist Updat*. v.3, p.2007-2009, 2001.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J.F.; HIRAMATSU, K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother*. v.37, p.1219–1226, 1993.

TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H. D.; PYÖRÄLÄ, S.. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology*, v.115, p.199–207, 2006.

TAPONEN, S.; BJÖRKROTH, J.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal of Dairy Research*, v.75, p.422-429, 2008.

TESFAYE, G.Y.; REGASSA, F.G.; KELAY, B. Milk yield and associated economic losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows, *Tropical Animal Health and Production*, v.42, n.5, p. 925-931, 2010.

THORBERG, B.M.; AARESTRUP, F.M; BRANDSTROM, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON-THAM, M.L. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Veterinary Microbiology*, v.115, p.163–172, 2006.

TODAR, K. *Staphylococcus*. Todar's online textbook of bacteriology. Disponível em <<http://www.textbookofbacteriology.net>> 23/05/2002. Acesso em: março 2008.

UNAL, N., YILDIRIM, M.. Antibiotic resistance profiles of staphylococci species isolated from milks, teat skins and noses mucous of cows, The Journal of The Faculty Veterinary Medicine, v. 16, n. 3, 389-396, 2010.

VAN CLEEF, B.A.; MONNET, D.L.; VOSS, A.; KRZIWANEK, K.; ALLERBERGER, F.; STRUELENS, M.; ZEMLICKOVA, H.; SKOV, R.L.; VUOPIO-VARKILA, J.; CUNY, C.; FRIEDRICH, A.W.; SPILIOPOULOU, I.; PÁSZTI, J.; HARDARDOTTIR, H.; ROSSNEY, A.; PAN, A.; PANTOSTI, A.; BORG, M.; GRUNDMANN, H.; MUELLER-PREMUR, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; WIDMER, A.; HARBARTH, S.; SCHWEIGER, A.; UNAL, S.; KLUYTMANS, J.A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerg Infect Dis.* v. 17, n.3, p. 502-5, 2011.

VARSHNEY, A.K.; MEDIAVILLA, J.R.; ROBOU, N.; GUH, A. GIALANELLA, X.W.P., LEVI, M.H., KREISWIRTH, B.N., FRIES, B.C. Diverse Enterotoxin Gene Profiles among Clonal Complexes of *Staphylococcus aureus* Isolates from the Bronx, New York. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 75, n. 21, p. 6839-6849, 2009.

VASCONCELOS, N.G.; PEREIRA, V.C.; ARAÚJO Jr, J.P.; CUNHA, M.L.R.S.. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* v. 111, p. 749-762, 2011.

VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais. *Brasil. Hig. Alim.*, v.17, p.218, 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococcal isolated from goats and cheese. *Int. J. Food Microbiol. Amsterdam*, v.30, n.3, p.271-280, 1996.

VOYICH, J.M.; OTTO, M.; MATHEMA, B.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R.; WELTY, D.; LONG, R.D.; DORWARD, D.W.; GARDNER, D.J.; LINA, G.; KREISWIRTH, B.N.; DELEO, F.R. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J. Infect. Dis.* v.194, p.1761–1770, 2006.

ZADOKS, R.; VAN LEEUWEN, W.; BARKEMA, H.; SAMPIMON, O.; VERBRUGH, H.; Y.H. SCHUKKEN, Y.H.; BELKUM, V. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal Clinical Microbiology*, v.38, n.5, p.1931-1939, 2000.

ZADOKS, R.N.; SCHUKKEN, Y.H. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, v.22 p.229–261, 2006.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D.. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.577-585, 2007.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

9. TRABALHOS CIENTÍFICOS

Toxins — Instructions for Authors

Preparation of a Manuscript

General Considerations

- Research manuscripts should comprise:
 - Front matter: Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords
 - Research manuscript sections: Introduction, Results, Discussion, Conclusions (optional), Materials and Methods, Supplementary Materials
 - Back matter: Acknowledgments, Author Contributions, Conflict of Interests, References.
- Review manuscripts should comprise the front matter, literature review sections and the back matter. The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure.
- Abstract Graphic: Authors are encouraged to provide a graphical abstract to display on the website alongside the textual abstract. It should be a self-explanatory snapshot of your article giving a view on its rationale, study design, and/or conclusions. The graphic should not exceed 550 pixels. When prepared in Adobe Photoshop or Microsoft PowerPoint, the frame should be 5–15 cm in width and height. The text should be kept to a minimum and the font size comprised between 10 pt and 14 pt to ensure readability. The graphic should be provided as a JPG, TIFF, PNG or GIF file.
- "Data not shown" should be avoided in research manuscripts. We encourage our authors to publish all observations related to the submitted manuscript as Supplementary Materials. "Unpublished data" intended for publication in a different manuscript, *i.e.*, in a manuscript that is either planned, "in preparation" or that have been "submitted" but not yet accepted, should be cited in the text and a reference should be added in the References section. "Personal Communications" should also be cited in the text and reference added in the References section. (see also the MDPI reference list and citations style guide).
- Abbreviations should be defined in parentheses the first time they appear in the abstract, main text and in figure captions.
- SI Units (International System of Units) should be used for this journal. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible before submission of a manuscript to the journal.
- Accession numbers of RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Please also read the Guidelines for Deposition of Sequences and of Expression Data

- **Equations:** If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on in your paper. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.
- **Supplementary Materials and Research Data:** To maintain the transparency and reproducibility of research results, authors are encouraged to make their experimental and research data openly available either by depositing into data repositories or by publishing the data and files as "Supplementary Materials". Large datasets and files should be deposited in specialized data repositories. Small datasets, spreadsheets, images, video sequences, conference slides, software source code, etc. can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will also be made available to the referees during the peer-review process and be published online alongside the manuscript. Please read the information about Supplementary Materials and Data Deposit for additional guidelines.

Dear Dr. Guimarães,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission and editorial system at www.mdpi.com. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Toxins

Manuscript ID: toxins-78101

Type of manuscript: Article

Title: Enterotoxins codifying genes in *S. aureus* isolated from bovine mastitis cases

Authors: Felipe Freitas Guimarães *, Marcela Pinho Manzi, Rodrigo Costa Silva, Sâmea Fernandes Joaquim, Helio Langoni

Received: 9 February 2015

E-mails: felipefreitasguimaraes@hotmail.com, marcela.pmanzi@gmail.com, silva_rcd@yahoo.com.br, sameajoaquim@gmail.com, hlangoni@fmvz.unesp.com.br

Submitted to section: Bacterial Toxins,

<http://www.mdpi.com/journal/toxins/sections/bacterial-toxins>

Enterotoxins: Microbial Proteins and Host Cell Dysregulation

http://www.mdpi.com/journal/toxins/special_issues/enterotoxins_2013

Kind regards,

MDPI AG

--

Toxins Editorial Office

Postfach, CH-4005 Basel, Switzerland

Office: Klybeckstrasse 64, CH-4057 Basel

Tel. +41 61 683 77 34 (office)

Fax +41 61 302 89 18 (office)

E-mail: toxins@mdpi.com

<http://www.mdpi.com/journal/toxins/>

Artigo 1. redigido de acordo com as normas do periódico científico "Toxins"

Enterotoxins codifying genes in *S. aureus* isolated from bovine mastitis cases

Felipe de F. Guimarães², Marcela Manzi², Rodrigo C. Silva², Sâmea Fernandes Joaquim², Hélio Langoni^{2*}

Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University UNESP -Botucatu-SP-Brazil.

* Address: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu – Distrito de Rubião Jr., S/N, Botucatu, S.P., Brazil, 18618-970

E-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br. Phone: (+55) 14 3880-2090

Mastitis caused by *Staphylococcus aureus* is worldwide one of the main diseases in dairy herds. It is responsible for serious economical losses and public health risk. The purpose of this study was to verify the presence of some virulence factors among the *Staphylococcus aureus* isolates from milk of bovine mastitis cases. A total of 105 isolates were evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR), using the Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin® Kit (GE Healthcare), and primers previously described. The amplification was performed in a DNA thermal cycler (Mastercycler® eppendorf, Hamburg, Germany), and the amplicons were visualized by electrophoresis in 2% agarose with SYBR® safe DNA gel stained. PCR assay was used to determine the presence of enterotoxin codifying genes. The occurrence of enterotoxin genes was determined as 20.8% for *sea*, 14.6% for *seb*, 12.5% for *sec*, 6.2% for *sed*, 6.2% for *see*, 2.1% for *seg*, and 35.4% for isolated that have more than one gene related, respectively. These results demonstrated that *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis have a high enterotoxigenic potential, and therefore, represent hazard to consumer's health, particularly to children, immune compromised patients and to elders.

INDEX TERMS: *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, enterotoxin genes, PCR

INTRODUCTION

Mastitis is the most important disease in dairy milk production worldwide (Kossaibati & Esslemont 1997), and it is notoriously difficult to estimate the losses associated with clinical and sub-clinical mastitis, which arise from the costs of treatment, culling, death and decreased milk production and constituent quality (Bradley 2002). Mastitis caused by *Staphylococcus aureus* is worldwide one of the main diseases in dairy herds.

The quality of dairy products has become an issue over the last decades due to various outbreaks of food-borne, and therefore the consumer concern is increasing. Food-borne diseases are of major concern worldwide. To date, around 250 different food-borne diseases have been described, and bacteria are the causative agents of two thirds of food-borne disease outbreaks. Among the predominant bacteria involved in these diseases, *Staphylococcus aureus* is a leading cause of gastroenteritis resulting from the consumption of contaminated food. Staphylococcal

food poisoning is due to the absorption of staphylococcal enterotoxins preformed in the food (Le Loir et al. 2003).

Staphylococcus aureus is an important pathogen due to a combination of toxin-mediated virulence, invasiveness, and antibiotic resistance. This bacterium is a significant cause of nosocomial infections, as well as community-acquired diseases.

In spite of, not be considered a highly lethal agent due to the low mortality associated with the illness, staphylococcal enterotoxins are considered a potential biological threat because of their stability at high temperatures (100°C for 1 h) and ability to incapacitate individuals for several days to two weeks. (Bhatia & Zahoor 2007). Symptoms are usually of rapid onset and include nausea and violent vomiting, with or without diarrhea. The illness is usually self-limiting and only occasionally it is severe enough to warrant hospitalization.

Staphylococcal food borne diseases caused by the ingestion of one or more preformed toxins are one of the most common causes of reported food-borne illnesses (Garthright et al. 1988; Le Marc et al. 2009). In recent years, *Staphylococcus aureus* has been responsible for several outbreaks involving dairy products. In June and July 2000, more than 14,700 people became ill after consuming dry skim milk powder contaminated with staphylococcal enterotoxin A (Stewart et al. 2002; Le Marc et al. 2009). Another outbreak occurred in Osaka, Japan, among patients who ingested dairy products (Asao et al. 2003; Le Marc et al. 2009). An outbreak of large proportion of staphylococcal food poisoning in Minas Gerais, southwest Brazilian region, in which 8.000 persons became ill, and from these sixteen died (Carmo et al. 2004).

Bovine mastitis caused by staphylococci determines relevant economical losses, compromises milk quality. Considering that milk and dairies have great nutritional relevance and, staphylococcal food poisoning is of major concern in public health programs worldwide, research is also needed for the identification of new potentially enterotoxigenic staphylococci. The purpose of this study was to verify the presence enterotoxin codifying genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of bovine mastitis cases.

MATERIALS AND METHODS

Herd Selection and Sampling Strategy

A convenience sample of 12 dairy herds in São Paulo state was used for the study. Herds were included in the study based on size (at least 80 lactating cows), and use of milking technology (machine-milked cows). Farms were visited once during the study. For each farm, all mammary glands of all lactating cows were screened using the California Mastitis Test (CMT) and a strip cup. A single aseptic milk sample (20 mL) was collected from all CMT-positive quarters (even when visible abnormalities in milk were present) after udder preparation was performed by farm personnel.

Laboratory Methods

Isolates obtained from milk samples were plated (10 µL) onto blood agar and incubated up to 72 h. at 37 °C. Only colonies from plates with at most two bacterial species were used. Samples were defined as contaminated if there were > two bacterial species on a plate. Initial identification of *Staphylococcus* spp was based on Gram staining and the catalase reaction. Isolates were then inoculated into Brain-Heart-Infusion (BHI) broth, as described by Kloos and Schleifer (1975) [10]. After incubation in BHI (24 h), staphylococcal species were determined using a series of biochemical tests.

Staphylococcus spp. were differentiated from *Micrococcus* spp based on oxidation and fermentation of glucose, resistance to bacitracin (0.04 U), and susceptibility to furazolidone (100 µg) (Baker, 1984). A total of 105 isolates were identified biochemically based on the utilization of different sugars, production of hemolysin, nitrate reduction, presence of urease and ornithine decarboxylase, and resistance to novobiocin. The *Staphylococcus* spp identification reference method of proposed by Kloos & Schleifer (1975) and Bannerman (2003) were adopted. To confirm the identification of individual species, the following international reference strains were used as controls: *S. aureus* (ATCC 33591 and ATCC 25923). To confirm the identification of *S. aureus*, the primers *Staur 4* e *Staur 6* were used, as described by Straub et al. (1999).

Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to determine the presence of enterotoxin codifying genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *seu*). Extraction of DNA was carried out using Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). PCR reactions were performed using primers previously described Derzelle et al. (2009). The amplification was performed in a DNA thermal cycler (Mastercycler, ep eppendorf, Hamburg, Germany), and the amplicons were visualized by electrophoresis in 2% agarose gel with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, California, USA), in concentration of 1 µL in 10 mL of gel. *S. aureus* (ATCC 33591 and ATCC 25923).were used as a positive control. Thermocycler parameters were stated in table 1.

Table 1. Thermocycler parameters used in this study.

Primers (sequência 5'→3')	Condições	Referencia
<i>Sea</i>	94°C/5 min (1 ciclo)	Johnson et al. (1991)
<i>seb</i>	94°C/2 min	
<i>sec</i>	50°C/30 seg (30 ciclos)	
<i>sed</i>	72°C/1 min	
<i>see</i>	72°C/4 min (1 ciclo)	
<i>Seg</i>	94°C/5 min (1 ciclo)	Omoe et al. (2002)
<i>seh</i>	94°C/30 seg	
<i>sei</i>	55°C/30 seg (30 ciclos)	
<i>sej</i>	72°C/1 min 72°C/4 min (1 ciclo)	
<i>Sek</i>		Omoe et al. (2005)
<i>sel</i>		
<i>sem</i>		
<i>sen</i>		
<i>seo</i>		
<i>sep</i>		
<i>seq</i>		
<i>ser</i>		
<i>Seu</i>		

RESULTS

The occurrence of enterotoxin genes was determined as 20.8% for *sea*, 14.6% for *seb*, 12.5% for *sec*, 6.2% for *sed*, 6.2% for *see*, 2.1% for *seg*, and 35.4% for isolated that have more than one gene related respectively (Table 3).

Table 2. Enterotoxin genes *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis cases

Enterotoxin Genes	<i>S. aureus</i>	
	Nº	%
<i>Sea</i>	10	20,8
<i>Seb</i>	7	14,6
<i>Sec</i>	6	12,5
<i>Sed</i>	3	6,2
<i>See</i>	3	6,2
<i>Seg</i>	1	2,1
<i>sea + seb</i>	2	4,2
<i>sec + sed</i>	2	4,2
<i>sea + sec</i>	3	6,2
<i>seb + sec</i>	1	2,1
<i>sea + see</i>	2	4,2
<i>seb + sej</i>	1	2,1
<i>sea + seb + sec</i>	2	4,2
<i>sea + sec + sed</i>	1	2,1
<i>sea + seg + sei</i>	1	2,1

<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sec</i> + <i>sej</i>	1	2,1
<i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>sei</i> + <i>sen</i>	1	2,1
<i>see</i> + <i>seg</i> + <i>sem</i> + <i>sen</i> + <i>seo</i>	1	2,1
Positivos	48	45,7
Negativos	57	54,3
Total	105	100

DISCUSSION

In the present study, 36 (40.0%) of 90 *S. aureus* isolates, from bovine mastitis cases from dairy herds of the state of São Paulo, presented enterotoxin codifying genes and, therefore they are potentially SE producers. The occurrence of enterotoxin genes was determined as 14.4% for *sea*, 11.1% for *seb*, 11.1% for *sec*, 5.5% for *sed*, 3.3% for both *sea*, *seb* and *sec*, 2.2% for *sec* and *sed*, 2.2% for both *sea* and *sec*, 1.1% for *sea* and *seb*, respectively. A previous study in Minas Gerais, Brazil, it was observed that 43% of 127 *S. aureus* isolates from bovine mastitis were found to be SE producers (Cardoso et al. 1999). While in Denmark, on 414 strains isolated from cows with mastitis only 1 of *S. aureus* isolates carried a *se* gene (Larsen et al. 2000). In other Brazilian study, was Silva et al. (1999) detected in 30% of *S. aureus* isolated from bovine mastitis the capability of enterotoxin production (19% SED, 8%SEB, 8% SEC e 3% SEA).

In Germany, strains isolated from the milk of cows with mastitis showed that up to 72.8% of the strains were enterotoxigenic (Akineden et al. 2001).

The occurrence enterotoxin codifying genes in *S. aureus* isolated from bovine mastitis reported in the literature varied in the studied regions as well as from country to country. It can be explained by the fact that the genes encoding SEs have different genetic supports, most of which are mobile genetic elements. For example, *sea* is carried by a family of temperate phages (Coleman et al. 1989). *Seb* is chromosomally located in some clinical isolates (Shafer & Iandolo 1978), whereas it has been found in a 750-kb plasmid in other *S. aureus* strains (Shalita et al. 1977). SEC_{bovine} is encoded by a gene located on a pathogenicity island (Fitzgerald et al. 2001). The mobile genetic elements favor the transmission not only in microorganisms of the same species as well as among different species.

Nevertheless, the presence of enterotoxin codifying genes calls attention to the potential risk represented to these microorganisms, mainly considering that many different foods can be a good substrate growth medium for *S. aureus*, and have been implicated in staphylococcal food poisoning, including milk and cream, cream-filled pastries, butter, ham, cheeses. In all cases of staphylococcal food poisoning, the foodstuff or one of the ingredients, was contaminated with an SE-producing *S. aureus* strain and was exposed, at least for a while, to temperatures that allow *S. aureus* growth. The foodstuff reaches this temperature due to failure in the refrigeration

process or a delay in the refrigeration a very often situation in tropical countries. It can also happen when a growth-permissive temperature is required during processing, as for instance, in some cheese making process.

Various examples of staphylococcal food poisoning are described in the literature, in one case, cheese was involved in an outbreak because it had been made from milk contaminated after pasteurization and before inoculation with lactic starter culture (Bergdoll 1989). In this particular case, the starter culture did not grow properly, resulting in a deficient fermentation that allowed the *S. aureus* strain to develop and produce SE. In 1985, chocolate milk was the origin of a staphylococcal food poisoning in the Kentucky, USA. This milk was contaminated and stored at too high a temperature for 4 to 5 h, before pasteurization (Bergdoll 1989).

In the United Kingdom, 53% of the staphylococcal food poisonings were reported between 1969 and 1990 (Wieneke et al. 1993). In France, milk and dairies in a ten-year period (1988-1997) were connected with 59% of food-borne disease outbreaks and *S. aureus* was the microorganism most frequently associated with these outbreaks (De Buyser 2001).

In Brazil, many studies demonstrated a high level of cheese contamination Reibnitz et al. (1998) verified that 95% of cheese samples analyzed, in Blumenau, a located in Southern region were contaminated with *S. aureus*. In Rio de Janeiro, RJ, Southeast region, 77% of cheese samples analyzed were contaminated (ARAÚJO et al. 2002). In Poços de Caldas, MG, Southeast region, 50% cheese samples analyzed presented *S. aureus* in an average of 10^5 UFC/g, considering that inoculums of 10^3 UFC/g are enough to enterotoxin detection, these finds were of great public health relevance (Almeida Filho & Nader Filho, 2000). Dantas et al. (2006) in Goiás, located in the middle west region, analyzed 24 samples of raw milk (non-pasteurized milk) and 24 samples of soft cheese (Frescal type), it was detected *S. aureus* in 75% of the milk samples, in a level of 1.1×10^5 UFC/ml and, in 70.8% of the cheese samples in average level of 3.8×10^4 UFC/ml, above of the level allow by the Brazilian norms (10^3 UFC/g).

European legislation stipulates the obligation of testing for the presence of enterotoxins in dairy products if *S. aureus* is detected at concentrations over 10^5 CFU g⁻¹. Some studies showed that *S. aureus*, even when present at low levels in milk, can reach these concentrations during the early stages of cheese making (Meyrand et al. 1998, Le Marc et al. 2009). It must be pointed out that pasteurization is able to kill the staphylococci but had no effect on the SEs, that are extremely heat resistant, as they can endure boil temperature for several minutes.

According to Le Loir et al. (2003) in many cases, the sources of contamination can be humans, as for instance, when the handlers contaminate food via manual contact or via the respiratory tract by coughing and sneezing. Nevertheless, in foods such as raw meat, sausages,

raw milk, and raw milk cheese, contaminations from animal origins are more frequent and due to animal carriage or to infections, as mastitis.

There are many examples in literature concerning strains isolated from cows with mastitis and milk products. In France, among 61 strains isolated from raw milk cheeses, 15.9% were enterotoxigenic (Rosec et al. 1997).

SEA is the most common cause of staphylococcal food poisoning worldwide, but the involvement of other classical SEs has been also demonstrated (Argudín et al. 2010). Most of the studies on SEA to SEE demonstrate a good correlation between the occurrence of the *sea* to *see* genes and the production of the corresponding SEs. This is not so clear for other SEs (Le Loir et al. 2003).

In spite of the illness is usually self-limiting and only occasionally it is severe enough to warrant hospitalization.

CONCLUSIONS

These results demonstrated that *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis have a high enterotoxigenic potential, and therefore, represent hazard to consumer's health, particularly to children, immune compromised patients and to elders. As a consequence, it can be concluded that milk and dairies produced from mastitis cases, may be discarded to prevent outbreaks of staphylococcal food poisoning.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by FAPESP (The São Paulo State Official Foundation to Support Research) (Grant number 2008/11614-1 and 2011/21323-7) F.F. Guimarães (Grant number 2008/08780-7 and 2011/21142-2) is grateful for the grant and the financial support received for this research.

REFERENCES

- Akineden, O., Annemüller, C., Hassan, A.A., Lämmner, C., Wolter, W., Zschöck, M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8:959-964.
- Almeida Filho, E.S., Nader Filho, A. 2000. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". Rev. Saúde Pública, 34:578-580.
- Araújo, V.S., Pagliares, V.A., Queiroz, M.L., Freitas-Almeida, A.C. 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J. Appl. Microbiol., 92(6):1172-1177.
- Argudín, M.Á., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R. 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins, 2(7):1751-1773.

- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.*, 130:33–40.
- Bannerman, T.L., Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically*. Am. Soc. Microbiol., 384-404.
- Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle, M.P., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA., pp. 463-523.
- Bhatia, A., Zahoor, S. 2007. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. *J. Clin Diag Research*, 3:188-197.
- Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.*, 164:116-128.
- Cardoso, H.F., Silva, N., Sena, M.J., Carmo, L.S. 1999. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29:347-349.
- Carmo, L.S., Cummings, C., Linardi, V.R., Dias, R.S., Souza, J.M., Sena, M.J., Santos, D.A., Shupp, J.W., Pereira, R.K.P., Jett, M. 2004. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incidente. *Foodborne Pathog. Dis.*, 1(4):241-246.
- Coleman, D.C., Sullivan, D.J., Russel, R.J., Arbuthnott, J.P., Carey, B.F., Pomeroy, H.M. 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of ϕ -lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen. Microbiol.* 135:1679-1697.
- Dantas, M.C., André, P.B., Santos, P.P., Campos, M.R H., Borges, L.J., Serafini, A.B. 2006. Utilização do antibiograma como ferramenta de tipagem fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores , leite cru e queijo minas frescal em laticínio de Goiás, Brasil. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, 43:102-108.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 67:1-17.
- Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smith, C.J. 2001. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.*, 183:63-70.
- Garthright, W.E., Archer, D.L., Kvenberg, J.E. 1988. Estimates of and costs of intestinal infectious diseases in the United States. *Public Health Rep.*, 103:107–115.
- Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R., Rozee, K.R. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29(3):426-430.
- Kloos WE, Schleifer KH. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*, 1:82-88.
- Kossaibati, M.A., Esslemont, R.J. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.*, 154:41-51.
- Larsen, H.D., Huda, A., Eriksen, N.H.R., Jensen, N.E. 2000. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet. Microbiol.*, 76:153-162.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning . *Genet. Mol. Res.*, 2(1):63-76.

- Le Marc, Y., Valik, L., Medvedová, A. 2009. Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *Int J. Food Microbiol.*, 129:306–311.
- Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats milk. *J. Appl. Microbiol.*, 85:537–544.
- Reibnitz, M. G., Tavares, L. B., Garcia, J. A. 1998. Presence of fecal coliforms, *Escherichia coli* and DNase and coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, in “colonial” cheese sold in the city of Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brazil. *Rev. Argentina de Microbiologia*, 30(1):8-12.
- Rosec, J.P., Guiraud, J.P., Dalet, C., Richard, N. 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.*, 35:213-221.
- Shafer, W.M.; Iandolo, J.J. 1978. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.*, 20:273-278.
- Shalita, Z., Hertman, I., Sand, S. 1977. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 129:317-325.
- Silva, N., Cardoso, H.F.T., Sena, M.J., Carmo, L.S. 1999. Produção de toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados do leite bovino em Minas Gerais. *Rev. Napgama*, 2(5):12-14.
- Stewart, C.M., Cole, M.B., Legan, J.D., Slade, L., Vanderven, M.H., Schaffner, D.W. 2002. *Staphylococcus aureus* growth boundaries: moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:1864–1871.
- Straub, J. A., Hertel, C., Hammes, W. P. 1999. A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products. *J. Food Prot.*, 62:1150-1156.
- Wieneke, A.A., Roberts, D., Gilbert, R.J., 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90, *Epidemiol. Infect.*, 110:519–53.

Artigo 2. redigido de acordo com as normas do periódico científico "Veterinary Microbiology"

Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis

GUIMARÃES, F.F.¹, MANCILLA, P.I.T.¹, JOAQUIM, S.F.¹, LANGONI, H.*¹

¹Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University- UNESP Botucatu- SP- Brazil

* Address: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu – Distrito de Rubião Jr., S/N, Botucatu, S.P., Brazil, 18618-970
E-mail address: hlangani@fmvz.unesp.br. Phone: (+55) 14 3880-2090

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are among the most frequent hospital infections around the world. Currently, these infections are increasing, both in hospitals and the community, and are associated with a significant rise in the use of vancomycin. The involvement of these pathogens in bovine mastitis and the possibility of milk transmission to humans justified the need to investigate the antimicrobial resistance. Therefore the objective of this study was to determine the occurrence of methicillin and vancomycin-resistance (VR) among *Staphylococcus aureus* isolated from milk of mastitic cows in Brazil and to characterize the antimicrobial resistance phenotype/genotype. A total of 105 *Staphylococcus aureus* isolates was identified based on both biochemical and molecular methods. Susceptibility testing for eleven antimicrobials was performed by disk-diffusion agar (DDA). Antimicrobial resistance genes *mecA* and *vanA* were investigated by specific PCRs. The main antimicrobial observed resistance among them was toward the betalactams: penicillin 48 (46%); ampicillin 44(42%); oxacillin 20 (19%). A high resistance to oxacillin is important considering that it is the first choice antimicrobial to human staphylococcal infections therapy, when this treatment was unsuccessful, the second choice was vancomycin, therefore it was researched among the MRSA and MSSA (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) isolates the *vanA* gene, that codify vancomycin resistance, it was not detected. However, the results of the E-test to verify oxacillin and vancomycin MICs among the isolates demonstrated did not showed vancomycin resistance, however, was detected intermediate resistance among 2 (1.9%) *Staphylococcus aureus* isolates.

Introduction

Mastitis is economically the most relevant disease of dairy cattle. *Staphylococcus aureus* is a common etiologic agent of bovine mastitis. *S. aureus*-related bovine mastitis is a common reason for therapeutic and/or prophylactic use of antibiotics on dairy farm (Haran et al., 2012).

45 On the other hand, the risk of *S. aureus* infections is high in hospitals,
46 nursing homes, and other health care facilities. Antimicrobial resistance in
47 *Staphylococcus aureus* is a major public health threat (Howden et al., 2011).

48 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) remains a major
49 problem in humans during the hospitalization, and it is now spreading in the
50 community (Voyich et al., 2006; Otto et al., 2013). The emergence of methicillin-
51 resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals as well as the community
52 is a significant and costly public health concern.

53 Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-
54 MRSA) have been found in various farm animal species throughout the world
55 (Tenhagen et al., 2014).

56 Recently, another group of LA-MRSA strains was discovered in humans
57 and dairy cattle in Europe. This group carries a divergent *mecA* gene and
58 includes a number of *S. aureus* lineages (CC130, ST425, and CC1943) that
59 were hitherto thought to be bovine-specific but are now also found as carriage
60 or clinical isolates in humans (Holmes & Zadocks, 2011).

61 Vancomycin is the drug of choice for therapy of infections due to
62 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), but increase in vancomycin use has led
63 to the emergence of two types of glycopeptide-resistant *S. aureus*. The first
64 one, designated vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*, is associated
65 with a thickened and poorly cross-linked cell wall, resulting in accumulation of
66 acyl-d-alanyl-d-alanine (X-d-Ala-d-Ala) targets in the periphery that sequester
67 glycopeptides. The second type, vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA), is
68 due to acquisition from *Enterococcus* spp. of the *vanA* operon, carried by
69 transposon Tn1546, resulting in high-level resistance.

70 The involvement of these pathogens in bovine mastitis and the possibility
71 of milk transmission to humans justified the need to investigate the antimicrobial
72 resistance, therefore the objective of this study was to determine the occurrence
73 of methicillin and vancomycin-resistance (VR) among the *S. aureus* isolates
74 obtained from milk of Brazilian mastitic cows and to characterize the
75 antimicrobial resistance phenotype/genotype.

76

77 Material and Methods

78 *Samples*

79 A total of 1171 cows from 11 different farms in the state of São Paulo,
80 Brazil (figure 1), were evaluated. In total, 4684 milk samples (one per mammary
81 gland) were obtained and 1484 of them were positive for mastitis. The
82 methodology and interpretation criteria used for diagnosis of clinical and
83 subclinical mastitis were based on examination of animals before each milking
84 by the California Mastitis Test - CMT (Schalm and Noorlander, 1957). Samples
85 were collected in sterile tubes after sterilization of the zone (ostium) with iodized
86 alcohol (2.5%), and they were transported to the laboratory under refrigeration
87 (4-8 °C) in cool boxes with ice packs.

88 *Bacterial isolates*

89 The samples were plated on blood agar (5%) (Oxoid) and incubated
90 under aerobic conditions at 37° C, and readings were performed after 24, 48
91 and 72 hours of incubation. Identification of *S. aureus* was based on colony
92 morphology, Gram staining, catalase, coagulase and DNase activities
93 (Koneman et al., 2008). To confirm the identification of *S. aureus* we used the
94 primers *Staur 4* e *Staur 6* previously described by Straub et al. (1999).

95 Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to determine resistance
96 genes by amplification of staphylococcal methicillin resistance (*mecA*) primers
97 *mecA1* (5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG-3') e *mecA2* (5'-AGT TCT GCA
98 GTA CCG GAT TTG-3'), Murakami et al. (1991) and vancomycin (*vanA*) using
99 primers *vanA1* (5'- GGGAAAACGACAATTGC -3') and *vanA2* (5'-
100 GTACAATGCGCCGTTA-3') Dutka-Malen et al. (1995). Positive and negative
101 controls were used in each PCR assay.

102 *Antimicrobial susceptibility testing and detection of resistance genes*

103 Antimicrobial susceptibility testing to oxacillin, cefoxitin, tetracycline,
104 erythromycin, clindamycin, gentamicin, tobramycin, streptomycin, trimethoprim-
105 sulphametoxazole, ciprofloxacin, and chloramphenicol was performed by disk-
106 diffusion agar method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards
107 Institute recommendations (CLSI, 2012).

108 *Standard Etest*

Vancomycin and oxacillin MICs were determined by standard Etest methods using a 0.5 McFarland standard inoculum on Mueller-Hinton agar (MHA) plates (Remel, Lenexa, KA), according to the manufacturer's manual (EAS 003; AB Biodisk, Solna, Sweden), using vancomycin and oxacillin Etest strips (bioMérieux, Durham, NC). MIC endpoints were read according to the manufacturer's recommendations. MIC values were evaluated at the actual endpoint and also after rounding up to the next highest doubling dilution, which is recommended by the manufacturer for results reporting.

117

118 Results

The results of the *in vitro* antimicrobial resistance among *S.aureus* bovine mastitis cases isolates tested by disk-diffusion agar were presented in table 1, the higher resistances observed were toward the betalactamics penicillin (46%) and ampicillin (42%), and none of the isolates were resistant to ciprofloxacin, enrofloxacin, ceftiofur, cefazolin. Twenty (19%) of 105 *S.aureus* bovine mastitis cases isolates showed oxacillin resistance in the disk diffusion test from these 14(70%) showed on E-test MIC higher than ≥ 4.0 , consider as resistant (Table 2). Six (5.7%) of *S.aureus* bovine mastitis cases isolates showed vancomycin resistance in the disk-diffusion test from these 2 (33.3%) showed on E-test MIC higher than ≥ 16.0 , consider intermediate resistance, none of them showed the MIC consider representative of vancomycin resistance.

The *mecA* genes were detected by PCR in 44 (42%) of 105 *S. aureus* bovine mastitis cases isolates from these 16 (36.4%) showed oxacillin resistance in the disk diffusion test. Among *S. aureus* bovine mastitis cases isolates *vanA* gene was not detected.

135

136

137

138

139

140

Table 1. "In vitro" disk-diffusion antimicrobial resistance agar among *S. aureus* bovine mastitis cases isolates. 2014.

	N	AMP	PEN	COT	OXA	TET	CIP	NE O	GEN	CFE	EN O	VAN	FOX	CEF
<i>S. aureus</i>	105	44	48	3	20	4	0	11	0	2	0	6	0	0
%		42	46	2.9	19	3.8	0	10.5	0	1.9	0	5.7	0	0

N=number of isolates; AMP=ampicillin, PEN=penicillin, COT=cotrimoxazol, OXA=oxacillin, TET=tetracyclin, CIP=ciprofloxacin, NEO=neomicin, GEN=gentamicin, CFE=cefalexin, ENO=enrofloxacin, VAN=vancomycin, FOX=cefoxitin, CEF=cefalotin,

Table 2. E-test oxacillin MIC of *S.aureus* bovine mastitis isolates, among the twenty oxacillin-resistant in disk-diffusion test.

	MIC (µg/ml)				
	0.12	0.25	0.50	1.0	≥4.0
<i>Number of isolates</i>	0	0	0	0	20

Interpretive criteria: S. aureus ≤2µg/ml (sensitive) and ≥4µg/ml (resistant)

Table 3. E-test Vancomycin MIC (VA MIC) of *S. aureus* of bovine mastitis cases isolates, among the six vancomycin-resistant in disk-diffusion test.

	MIC (µg/ml)				
Vancomycin	0.25	0.5	1.0	2.0	6.0
<i>Number of isolates</i>	1	1	2	0	2
%	16.7	16.7	33.3	0.0	33.3

Interpretive criteria: S. aureus vancomycin <4µg/ml (sensitive), >32µg/ml (resistant).

CLSI, 2006: vancomycin MIC breakpoints for *S. aureus* were lowered (from <or = 4 microg/mL to <or = 2 microg/mL for "susceptible," from 8-16 microg/mL to 4-

157 8 microg/mL for "intermediate," and from ≥ 32 microg/mL to ≥ 16
 158 microg/mL for "resistant")

159

160 Table 4. Oxacillin resistance (Disk-diffusion test) and *mecA* detection in
 161 *S.aureus* of bovine mastitis cases isolates

<i>S.aureus</i>	Oxacillin		Total
	<i>mec A</i> positive	<i>mecA</i> negative	n.
Resistance	16(36%)	4(20%)	20(19%)
Sensitive	28(64%)	57(67%)	85(81%)
Total	44(42%)	61(58%)	105

162

163 $P=0.0002$, considered significant.(association is statistically significant)Fisher's
 164 Exact Test

165 95% Confidence Interval; Sensitivity = 0.3636; Specificity= 0.9344

166 Positive Predictive Value=0.8000; Negative Predictive Value 0.6706

167

168 Discussion

169

170 The studied bovine mastitis isolates did not presented *in vitro* resistance
 171 toward ciprofloxacin, enrofloxacin, cefoxitin and cefalotin. Usually the
 172 therapeutic use of these antimicrobials in field mastitis cases with has been
 173 effective in Brazilian dairy herds (COSTA et al., 2004, NADER FILHO et al.,
 174 2007, GUIMARÃES, 2011, SILVA et al., 2014).

175 According to LANGE et. al. (1999), in southern region of Brazil, 48.5% of
 176 the bovine mastitis isolates were susceptible to all tested antimicrobials and
 177 43.9% of the isolates were resistant to penicillin and to ampicillin.

178 Haenni et al., (2011) studying 139 *S. aureus* isolates from bovine mastitis
 179 reported the proportion of penicillin-resistant isolates reached 41.0%, 10
 180 isolates (7.2%) resistant to tetracycline and 9 to macrolides/ lincosamides/
 181 streptogramin B (MLS_B phenotype; 6.5%). One isolate was resistant to
 182 penicillin, cefoxitin, kanamycin and tobramycin, but was susceptible to all other
 183 antibiotics, including gentamicin. The authors referred that methicillin-resistant
 184 *S. aureus* (MRSA) is very rare in cases of bovine mastitis in France.

Two primary resistance mechanisms to beta-lactams are noteworthy in *Staphylococcus* spp.: the expression of beta-lactamase enzymes encoded by the *blaZ* gene, and production of the penicillin-binding protein 2a resulting in a higher-level of resistance encoded by the *mecA* gene (Fuda et al. 2005).

High-level resistance of *S. aureus* to beta-lactams conferred by a *mecA* gene encoding a modified penicillin binding protein (PBP2a) was first observed in the early 1960's (Haran et al., 2012). In the present study *mecA* was detected in 44 (42%) *S. aureus* bovine mastitis isolates. However, the disk diffusion test showed resistance to oxacillin in only 20 (19%) bovine mastitis cases isolates, from these 16 harbored *mecA* gene, while four of them were *mecA* negative, may be due other mechanisms of resistance as betalactamases production. And analyzing the E-test only fourteen of them showed E-test MIC higher than ≥ 4.0 , consider as oxacillin-resistant. Therefore it can be conclude that in spite of harboring *mecA* gene only 32% among them were expressing the oxacillin-resistance. Taking into account the 105 *S. aureus* studied only 13% of these bovine mastitis cases isolates were MRSA.

Febler et al., 2010 pointed out that in contrast to the wealth of data on MRSA isolates from companion animals, horses and pigs comparatively little is known about MRSA isolates in cattle.

Tenhagen et al. (2014) estimated the prevalence of MRSA in different cattle food chains (milk, beef, and veal) in Germany, to analyze the MRSA diversity along each food chain and to compare the characteristics of the different subtypes. Samples were collected between 2009 and 2012 from dairy herds (bulk tank milk), veal herds (dust from the stables), veal calves, and beef cattle at slaughter (nasal swabs) and carcasses of veal calves (surface cuts) and beef as well as veal at retail. Sampling was proportionally distributed over the country according to the cattle population (on-farm sampling), slaughterhouse capacity (abattoir samples), and the human population (meat at retail). The lowest rate was detected in bulk tank milk in 2009 (14/388; 4.1%). These authors referred that antimicrobial resistance patterns differed between isolates from the different food chains and *spa* types. They concluded that there is substantial diversity in the MRSA prevalence across different cattle production sectors.

218 Haran et al., (2012) studied herd prevalence of *S. aureus*, including
 219 MRSA, was estimated from bulk tank milk (BTM) from Minnesota farms. A total
 220 of 150 pooled BTM samples from 50 farms, collected over 3 seasons (spring,
 221 summer, and fall of 2009), were assessed. Herd prevalence of methicillin-
 222 susceptible *S. aureus* (MSSA) was 84%, while MRSA herd prevalence was 4%.
 223 A total of 93 MSSA isolates and 2 MRSA isolates were recovered from 150
 224 BTM samples. Antibiotic susceptibility testing of *S. aureus* isolates showed
 225 susceptibility in 54 isolates, resistance to a single antibiotic class in 21 isolates,
 226 resistance to two antibiotic classes in 13 isolates, and resistance to ≥ 3
 227 antibiotics classes and thus multidrug resistance in 5 isolates. These authors
 228 concluded that the results suggest that MRSA genotypes associated with
 229 hospitals and community can be isolated from milk at very low rates.

230 Rabello et al. (2005) found high susceptibility among *S. aureus*
 231 subclinical mastitis cases isolates, referred high level of sensitivity of the
 232 isolates to oxacillin, kanamycin, gentamicin e vancomycin. Güler et al. (2005)
 233 studied two hundred *S. aureus* clinical mastitis cases isolates and did not
 234 detected oxacillin resistance among them. Pengov and Ceru (2003) isolated *S.*
 235 *aureus* from milk samples from intramammary infection in dairy cows and
 236 verified 100% of oxacillin sensitivity and 93.5% kanamycin among the isolates.

237 Zadoks et al. (2000) and Kaszanyitzky et al. (2004) referred that
 238 methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* as a relevant problem in bovine mastitis
 239 etiology as well as conclude that these microorganisms are also a potencial risk
 240 to human health (Lee, 2003).

241 Vancomycin has long been considered as an antibiotic of last resort for
 242 multi-drug-resistant staphylococci infections (Ludwicka et al., 1984; Mayhall,
 243 2004, Koksai et al., 2009).

244 The diffusion test performed showed that 6 (5,7%) of *S. aureus* bovine
 245 mastitis cases isolates were resistant to vancomycin.

246 Guta et al. (2002) studied *Staphylococcus spp.* in dairy herds and verified
 247 100% of susceptibility to vancomycin.

248 Lee et al. (2004) referred that options for treating multidrug-resistant *S.*
 249 *aureus* infection are few, and, as new strains emerge, the options are becoming
 250 even more limited. Further study of MRSA and evaluation of optimal practices to
 251 detect MRSA infections clearly are needed. Active screening and detection of

glycopeptide nonsusceptibility in MRSA will almost certainly result in more accurate representation of prevalence of hVISA and VISA strains and, possibly, VRSA strains. A rise in systemic infections caused by nonglycopeptide-susceptible *S. aureus* strains was be a very serious development indeed, leaving the clinician with very few therapeutic options.

Currently, hVISA and VISA strains are, according to de Lassence et al. (2006), being underreported because of nonstandard detection techniques. Appelbaum, [2006] considered that available automated methods, such as Vitek (bioMérieux) and Microscan (Dade Behring), do not identify all known strains of VRSA adequately and should not be used for the routine detection of hVISA and VISA. And also referred that in spite of disk-diffusion be the only method used in the clinical laboratory and may be acceptable for detection of VRSA, it is however not entirely satisfactory for detection of hVISA and VISA strains (Appelbaum, 2006).

The Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, the NCCLS) established the susceptibility and resistance breakpoints for minimal inhibitory concentration (MIC) and disk diffusion testing of vancomycin against isolates of *Staphylococcus aureus* >20 years ago. The disk diffusion breakpoints were modified in 1998 when it was recognized that vancomycin-intermediate *S. aureus* strains were not detected by this method. In 2006, the vancomycin MIC breakpoints for *S. aureus* were lowered (from ≤ 4 microg/mL to ≤ 2 microg/mL for "susceptible," from 8-16 microg/mL to 4-8 microg/mL for "intermediate," and from ≥ 32 microg/mL to ≥ 16 microg/mL for "resistant") to increase detection of heterogeneously resistant isolates of *S. aureus*. This decision reflected a growing amount of microbiological and clinical data indicating that isolates of *S. aureus* are less likely to respond to vancomycin therapy when the vancomycin MICs are ≥ 4 microg/mL (Tenover and Moellering, 2007).

Swenson et al. (2009) compared the results obtained with six commercial MIC test systems (Etest, MicroScan, Phoenix, Sensititre, Vitek Legacy, and Vitek 2 systems) and three reference methods (agar dilution, disk diffusion, and vancomycin [VA] agar screen [VScr]) with the results obtained by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution (BMD) reference method

for the detection of VA-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA). A total of 129 *S. aureus* isolates (VA MICs by previous BMD tests, ≤ 1 microg/ml [n = 60 strains], 2 microg/ml [n = 24], 4 microg/ml [n = 36], or 8 microg/ml [n = 9]) were selected from the Centers for Disease Control and Prevention strain collection. The results of BMD with Difco Mueller-Hinton broth were used as the standard for data analysis. Essential agreement ranged from 98 to 100% for all methods except the method with the Vitek Legacy system, for which it was 90.6%. Disk diffusion categorized all VISA strains as susceptible. No susceptible strains (MICs ≤ 2 microg/ml) grew on the VScr, but all strains for which the VA MICs were 8 microg/ml grew on the VScr. Only 12 (33.3%) strains for which the VA MICs were 4 microg/ml grew on VScr. These authors pointed out that differentiation of isolates for which the VA MICs were 2 or 4 microg/ml was difficult for most systems and methods, including the reference methods.

Using E-test the present study it was detected VA MICs only 2 *S. aureus* isolates with MIC were higher or equal to 16 microg/ml, being therefore classified as vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) on the other hand, none isolate presented MIC ≤ 2 microg/ml, the others tested isolates showed MICs below, thus consider vancomycin sensitive. The E-test oxacillin MICs fourteen of the *S. aureus* mecA positive isolates presented MIC equal or higher than four microg/ml ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$) consequently classified as oxacillin-resistant.

The emergence of *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin has caused considerable concern. Such strains are currently rare, although they have been isolated from many areas of the world (Walsh and Howe, 2002). In the United States it has been infrequently identified since 2002. Limbago et al. (2013) was reported the 13th U.S. VRSA isolate, and the first to be community associated. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) is an important multidrug-resistant organism of public health concern,

The Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens Study Group investigated the prevalence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin among methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains in Asian countries, a total of 1,357 clinical isolates of MRSA collected from 12 Asian countries were screened by using brain heart infusion agar plates containing 4 mg of vancomycin per liter. The presence of strains that were

heterointermediately resistant to vancomycin (hVISA) was confirmed by population analysis. Of 347 (25.6%) MRSA isolates that grew on the screening agar plates, 58 isolates (4.3%) were hVISA. hVISA strains were found in India, South Korea, Japan, the Philippines, Singapore, Thailand, and Vietnam. However, neither vancomycin-intermediate *S. aureus* nor vancomycin-resistant *S. aureus* isolates were found among MRSA isolates from Asian countries in this survey (Song et al., 2004).

Considering the clinical standpoint Sakoulas et al. (2004) attempted to find a relationship between the microbiological properties of bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the efficacy of vancomycin in the treatment of bacteremia. Vancomycin susceptibility testing was performed. Logistic regression found a statistically significant relationship between treatment success with vancomycin and decreases in vancomycin MICs (≤ 0.5 microg/ml versus 1.0 to 2.0 microg/ml; $P = 0.02$). For MRSA isolates with vancomycin MICs ≤ 0.5 microg/ml, vancomycin was 55.6% successful in the treatment of bacteremia whereas vancomycin was only 9.5% effective in cases in which vancomycin MICs for MRSA were 1 to 2 microg/ml. They concluded that a significant risk for vancomycin treatment failure in MRSA bacteremia begins to emerge with increasing vancomycin MICs still within the susceptible range.

The research of *vanA* by PCR in the 105 bovine mastitis isolates was fruitless. However, a number of studies have demonstrated the absence of the vancomycin resistance genes *vanA*, *vanB*, and *vanC1* to *vanC3* in hVISA and VISA strains (108, 121, 345), and the activated cell wall synthesis demonstrated for some hVISA and VISA strains (108).

Howden et al. (2010) pointed out that emergence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) over the past decade has provided a challenge to diagnostic microbiologists to detect these strains, clinicians treating patients with infections due to these strains, and researchers attempting to understand the resistance mechanisms. And also referred that recent data show that these strains have been detected globally and in many cases were associated with glycopeptide treatment failure; however, more rigorous clinical studies are required to clearly define the contribution of hVISA

to glycopeptide treatment outcomes. It is now becoming clear that sequential point mutations in key global regulatory genes contribute to the hVISA and VISA phenotypes, which are associated predominately with cell wall thickening and restricted vancomycin access to its site of activity in the division septum; however, the phenotypic features of these strains can vary because the mutations leading to resistance can vary. Interestingly, changes in the staphylococcal surface and expression of agr are likely to impact host-pathogen interactions in hVISA and VISA infections. It is essential that diagnostic laboratories use well-standardized methods for detecting reduced vancomycin susceptibility in *S. aureus*.

Conclusion

As an aggressive pathogen, *Staphylococcus aureus* represent a significant public health threat and is becoming increasingly resistant to currently available antibiotics, including vancomycin, the drug considered of last alternative for gram-positive bacterial infections. A rise in infections caused by non-glycopeptide-susceptible *S. aureus* strains was a very serious expansion of the problem, leaving very few therapeutic options, mainly in veterinary medicine, therefore the isolation of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) as well as vancomycin-intermediate-resistant (VISA) from bovine mastitis cases even in low level constitute a relevant find not only to veterinary point of view as to human health, due to the possibility of milk transmission to humans or acting as a reservoir.

Acknowledgements.- This study was funded by FAPESP (The São Paulo State Official Foundation to Support Research) grant number 2011/21323-7. Felipe de F. Guimarães (Grant number 2011/21142-2) is grateful for the grant and the financial received for this research.

References

- Cui, L., X. Ma, K. Sato, K. Okuma, F. C. Tenover, E. M. Mamizuka, C. G. Gemmell, M. N. Kim, M. C. Ploy, N. El-Solh, V. Ferraz, and K. Hiramatsu. 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 41:5-14.

- 386 Limbago BM, Kallen AJ, Zhu W, Eggers P, McDougal LK, Albrecht VS. Report of
387 the 13th vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the United
388 States. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):998-1002.
- 389 Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, Thompson A, McAllister SK,
390 Limbago BM, Carey RB, Tenover FC, Patel JB Accuracy of commercial and
391 reference susceptibility testing methods for detecting vancomycin-intermediate
392 *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2009 Jul;47(7):2013-7.
- 393 Tenover FC, Moellering RC Jr. The rationale for revising the Clinical and
394 Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration
395 interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2007;44(9):1208.
- 396 Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced
397 vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-
398 intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance
399 mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev.
400 2010 Jan;23(1):99-139.
- 401 Howden BP, McEvoy CR, Allen DL, Chua K, Gao W, Harrison PF, Bell J,
402 Coombs G, Bennett-Wood V, Porter JL, Robins-Browne R, Davies JK,
403 Seemann T, Stinear TP. Evolution of multidrug resistance during
404 *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two
405 component regulator WalKR. Pathog. 2011 Nov;7(11):e1002359. Epub 2011
406 Nov 10.
- 407 Walsh TR, Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin
408 resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Microbiol. 2002;56:657.
- 409 Song JH, Hiramatsu K, Suh JY, Ko KS, Ito T, Kapi M, Kiem S, Kim YS, Oh WS,
410 Peck KR, Lee NY Emergence in Asian countries of *Staphylococcus aureus* with
411 reduced susceptibility to vancomycin., Asian Network for Surveillance of
412 Resistant Pathogens Study Group. Antimicrob Agents Chemother.
413 2004;48(12):4926.
- 414 Voyich et al., 2006 J Infect Dis. (2006) 194 (12): 1761-1770
- 415 Otto et al., 2013 Antimicrob. Chemother. (2013) 68 (7): 1524-1532
- 416 Appelbaum PC . *MRSA—the tip of the iceberg*. Clin Microbiol Infect
417 2006;12(Suppl 2):3-10.
- 418 de Lassence A, Hidri N, Timsit JF, et al. *Control and outcome of a large*
419 *outbreak of colonization and infection with glycopeptide-intermediate*
420 *Staphylococcus aureus in an intensive care unit*. Clin Infect Dis 2006;42:170-8.
- 421 Ferreira L.M., Nader Filho A., Oliveira E., Zafalon L.F. & Souza V., 2006.
422 Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus*
423 isoladas em casos de mastite subclínica bovina. Ciência Rural, 36(4):1228-
424 1234.

- 425 Holmes ,M.A.; Zadocks, R.N. Methicillin resistant *S.aureus* in human and
426 bovine mastitis. J.Mammary Gland. Biol. Neoplasia (2011)16:373-382
- 427 Koksai, F., Yasar, H.; Samasti, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-
428 negative *staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic
429 patients in Turkey. Microbiological Research Volume 164, Issue 4, 2009, Pages
430 404–410
- 431 LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from
432 cases of bovine mastitis in Brazil. Vet Microbiol, Amsterdam, v.67, p.127-141,
433 1999.

Artigo 3. redigido de acordo com as normas do periódico científico
"Microbiology Methods"

**Phenotypic and genotypic identification of Genus *Staphylococcus* species isolated
from bovine mastitis**

Authors:

Felipe Freitas Guimarães, Samea Fernandes Joaquim, Rodrigo Costa da Silva, Ariane
Cristina Mendes de Oliveira Bruder Nascimento, Elizabeth Oliveira Costa, Hélio
Langoni.*

* Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine
and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University- Botucatu-SP- Brazil

Complete postal addresses of affiliations:

¹Hélio Langoni. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu –
Distrito de Rubião Jr., S/N, Botucatu, S.P., Brazil, 18618-970

E-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br. Phone: (+55) 14 3880-2090

ABSTRACT

In addition to *Staphylococcus aureus* other coagulase-positive staphylococci (CoPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS), earlier considered of minor importance, nowadays are considered very relevant in mastitis bovine etiology. The involvement of these pathogens in bovine mastitis and the possibility of milk transmission to humans justified the requirement of developing reliable methods for identification of the most frequent species among them. A total of 300 staphylococci isolates of bovine mastitis cases from several Brazilian dairy herds were studied, respectively: 150 CoPS and 150 CoNS strains. The purpose of this study was to compare phenotypic techniques with genotypic method carried out by sequencing of the *rpoB* gene in the identification of several species of the genus *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. A total of 22 different species were isolated. Among the CoNS the following species were identified by phenotypic and genotypic techniques: 48 (32%) *S. warneri*, 22(15%) *S. epidermidis*, 20(13%) *S. hyicus*, 10(7%) *S. xylosus*, 7(5%) *S. haemolyticus*, 6(4%) *S. simulans*, 6(4%) *S. schleiferi subsp schleiferi*, 6(4%) *S. hominis*, 5(3%) *S. pasteurii*, , 4(2.7%) *S. cohnii*, 3(2%) *S. saprophyticus subsp. saprophyticus* 3(2%) *S. chromogenes* 3(2%) *S. sciuri*, 2(1%) *S. saccharolyticus*, 2(1%) *S. lugdunensi*, 1(0,7%) *S. auricularis*, 1(70%) *S. saprophyticus subsp. bovis*, 1(0.7%) *S. capitis*. And among the 150 CoPS: 105 (70%) *S. aureus*, 21(14%), *S. hyicus*, 19(13%) *S. intermedius* e 5(3%) *S. schleiferi subsp coagulans*. The identification by phenotypic and genotypic tests showed a concordance of 96.7%, correlation coefficient (r) = 0.9977(Pearson), confidence interval 95%: 0.9938 a 0.9992 and in relation of the 150 CNS isolates and 98.7% CPS, correlation coefficient (r) = 0.9994 (Pearson), 95% confidence interval: 0.9681 to 1.0000.

Keywords: *Staphylococcus*, genotypic identification technique, phenotypic identification, coagulase positive *Staphylococcus* spp, coagulase negative *Staphylococcus* spp.

1. Introduction

Knowledge of the phenotypic, genotypic characteristics of a microorganism is imperative for the detection of the pathogenics and/or toxigenics that are detrimental to the health of plants, animals, humans and the environment. As such, accurate identification of the active microorganism is a fundamental component for the establishment of safety measures. The genus *Staphylococcus* currently includes about 50 species e subspecies (Hennekinne et al., 2010).

Mastitis is the inflammation of the mammary gland. Dairy cow mastitis is the most important disease in the dairy industry worldwide, and it is associated with pain and reduced well-being of affected animals (Halasa, 2007).

This disorder causes relevant economical losses, due to reduced milk production and poor milk quality, increasing the cost of treatment, and the premature disposal of cows (McDougall et al., 2009). One of the main agents of bovine contagious mastitis is *Staphylococcus aureus* (Capurro et al. 2010). Nowadays, the intramammary infections caused by other species of the genus *Staphylococcus* become a serious problem for dairy herds (Ergün et al., 2009; Kunz et al., 2011; Pyörala and Taponen, 2009; Unal and Yildirim, 2010; Guimarães, 2011; de Freitas Guimarães et al., 2013).

Furthermore the emergence of the species others than *Staphylococcus aureus* as human pathogens, as well as, reservoirs of antimicrobial resistance, increases the necessity of developing reliable methods for identification of the most frequent species,

to establish the pathogen-host relationship, as well, development of epidemiological approaches.

The coagulase negative *Staphylococcus* spp (CoNS) has become increasingly important to accurately identify these isolates to the species level in order to define the clinical significance of these bacteria, to carry out a proper epidemiological surveillance, and to manage patients infected with CoNS in case of relapse (Poyart et al., 2001).

The identification of staphylococci species other than *S.aureus* is not regularly made in clinical laboratories of microbiology, because it is expensive, even with automation, and is time-consuming when carried out manually (Edwards et al., 2001).

The purpose of this study was to compare phenotypic techniques with genotypic method in the identification of several different species of genus *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis cases using

2. Material and methods

A total of 300 staphylococci isolates of bovine mastitis cases collected from several Brazilian dairy herds were studied, respectively: 150 CoPS and 150 CoNS strains.

The methodology and interpretation criteria used for diagnosis of clinical and subclinical mastitis were based on examination of animals before each milking by the strip cup and the California Mastitis Test - CMT (Schalm and Noorlander, 1957). Samples were collected in sterile tubes aseptically, and they were transported to the laboratory under refrigeration (4-8 °C) in cool boxes with ice packs.

2.1. Bacterial isolates

The samples were plated on blood agar (5%) (Oxoid) and incubated under aerobic conditions at 37° C, and readings were performed after 24, 48 and 72 hours of incubation. Identification of staphylococci was based on colony morphology, Gram staining, catalase, coagulase and DNase activities (Koneman et al., 2008).

Staphylococcus spp were differentiated from *Micrococcus* spp based on oxidation and fermentation of glucose, resistance to bacitracin (0.04 U), and susceptibility to furazolidone (100 µg) (Baker, 1984).

Identification of *Staphylococcus* spp was carried out according to the criteria suggested by Kloos and Schleifer (1975) and modified by Cunha et al., (2004). Series of biochemical tests were performed such as sugar fermentation (xylose, arabinose, sucrose, trehalose, maltose, mannitol, lactose, xylitol, ribose, fructose, and mannose), production of hemolysin, nitrate reduction, presence of urease and ornithine decarboxylase, and resistance to novobiocin.

To confirm the identification of individual species, the following international reference CoNS strains were used as controls: *S. auricularis* (ATCC 33753), *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *urealyticus* (ATCC 49325) *S. caprae* (ATCC 35538), *S. cohnii* (ATCC49330), *S. cohnii* subsp. *cohnii* (ATCC 29974), *S. epidermidis* (ATCC12228 e 35983), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. lentus* (ATCC 700403), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062) *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) and *S. xylosus* (ATCC 29979), and *S. aureus* (ATCC 33591 and ATCC 25923).

2.2. Gene *rpoB* Detection

To confirm the CoNS and CoPS in all the isolates were performed the detection gene *rpoB*, the gene encoding the beta subunit of RNA polymerase, by sequencing amplified region, using the primers (Mellmann et al., 2006) the following parameters was used: 899 pb, *rpoB*1418 for 5'-CAATTCATGGACCAAGC-3' and *rpoB*3554 rev 5'-CCGTCCAAGTCATGAAAC-3', in 25 µL there was 10 pmol of each primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxirribonucleotides trifosfato, 20 mM de Tris-HCL (pH 8,4), 0,75mM de MgCl₂ e 3 µL de DNA. The amplification was performed by Mastercycler gradient® (Eppendorf) thermal cycler during 5 minutes at 94 °C, followed by 35-seconds cycles of denaturation at 94 °C during 45 minutes, and the primers annealing one minute at 52°C and, one minute and thirty seconds at 72 °C. The program was completed with an additional extension of 10 minutes at 72 °C. The efficiency of the amplifications was monitored by electrophoresis of the reaction in 2% Ultrapure™ agarose gel prepared in 0.5 Tris-Borate-EDTA(TBE) buffer. A marker with molecular weight of 100bp was used as a standard. DNA was stained by Saber Safe® and later photographed under ultraviolet transillumination.

2.3. Sequencing

The *rpoB* regions amplicons of CoNS and CoPS were first submitted to purification by GFX PCR kit and Gel Band Purification (GE Healthcare®), subsequently the sequencing reactions were carried out in DNA ABI (Applied Biosystems) Prism model 377. The *rpoB* sequences were aligned by using the

multisequence alignment Mega 5.2 program analyzed in GenBank using Blat tool in order of compare the sequences.

3. Results

Among the 150 CoNS eighteen isolates were identified respectively: 48 (32%) *S. warneri*, 22(15%) *S. epidermidis*, 20(13%) *S. hyicus*, 10(7%) *S. xylosus*, 7(5%) *S. haemolyticus*, 6(4%) *S. simulans*, 6(4%) *S. schleiferi subsp schleiferi*, 6(4%) *S. hominis*, 5(3%) *S. pasteurii*, , 4(2.7%) *S. cohnii*, 3(2%) *S. saprophyticus subsp. saprophyticus* 3(2%) *S. chromogenes* 3(2%) *S. sciuri*, 2(1%) *S. saccharolyticus*, 2(1%) *S. lugdunensi*, 1(0.7%) *S. auricularis*, 1(0.7%) *S. saprophyticus subsp. bovis*, 1(0,7%) *S. capitis*. The results of phenotypic and genotypic identifications were presented on Table 1, the methods showed a 96.7% of concordance.

And the 150 CoPS isolates identified were: 105 (70%) *S. aureus*, 21(14%), *S. hyicus*, 19(13%), *S. intermedius* e 5(3%) *S. schleiferi subsp coagulans*. The results of phenotypic and genotypic identifications were presented on Table 2, the methods showed a 98.7% of concordance.

4. Discussion

Since CoNS are the etiological agents of a series of infectious processes, identification of these microorganisms is important for the determination of their physiopathological characteristics. Their clinical and epidemiological importance, have led to the publication of various studies analyzing identification methods for these bacteria (Ieven et al., 1995; Monsen et al., 1998; Bannerman 2003; De Paulis et al., 2003).

In the last years, CoNS has been winning a larger importance due to her pathogenicity and involvement in human diseases. The importance of identifying all

species of CoNS in the clinical laboratories has been increasing; however it is not an easy task, since phenotypic tests can present similar results, hindering the obtaining of a result, as well as a great expense of time in the identification of the species than in commercial kits. Many clinical laboratories use automated systems for identification of the species of *Staphylococcus* spp although the reliability for certain species not always it is satisfactory, particularly for species of CoNS no-*epidermidis*.

Currently conventional phenotypic characterization is used for the identification of *Staphylococcus* species. For the reference identification of *staphylococci* the Centers for Disease Control and Prevention has developed a numerical code system based on a panel of 18 selected conventional biochemical reactions. Several biochemical-based commercial kits and automated systems (Kloos and George, 1991) are also available for this purpose. In clinical studies, however, various degrees of accuracy have been achieved with these different phenotypic formats (Felsenstein, 1989, Perl et al., 1994, Refshal and Andersen, 1992). The difficulties to identification of *Staphylococcus* spp. using tests that evaluate acid production has previously been reported in several works, which evaluated manual and automated systems (Ieven et al., 1995; Cunha et al., 2004; Caierão et al., 2006). For example, commercial identification systems have been shown to commonly misidentify *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus warneri* with error rates as high as 36 and 27%, respectively (Grant et al. 1994, Ieven et al., 1995). *S. schleiferi* may also be misidentified by automated systems (Calvo et al., 2000). Furthermore, commercial identification systems and automated systems are not able to make a reliable distinction between the different species mainly of CoNS, because of the variable expression of the phenotypic characters (Couto et al., 2001; Kontos et al., 2003; Caierão et al., 2006). Phenotypic characterizations thus have limitations that are

partly due to variable expression of characters and ambiguity in the interpretation of end point reactions (Birnbaum, Kelly, Chow, 1991).

On the other hand, PCR sequencing of the *rpoB* gene effectively identify staphylococcal species according to Drancourt and Raoult, (2000). In contrast to the probe hybridization technique and the RFLP approach, sequencing enables any isolate to be characterized, including new species by their phylogenetic relationships (Drancourt and Raoult, 2000). These authors concluded that the partial sequencing of the *rpoB* gene as suitable new tool for the accurate identification of *Staphylococcus* isolates.

However, in the present study the comparison of the results obtained using the biochemical phenotypic method and sequencing of the *rpoB* gene for the isolates identification showed a concordance of 96.7% in relation of the 150 CNS isolates and 98.7% CPS, and were verified a correlation coefficient (r) = 0.99 (Pearson) and, 95% confidence interval: 0.9681 to 1.0000. Dancey and Reidy (2005) referred that according to Landis and Koch(1977) is considered a strong correlation when $r = 0.70$ to 1. (Landis JR, Koch GG. *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics 1977; 33: 159-174) consequently the obtained results indicated a high correlation between the two methods.

From the 150 isolates of bovine mastitis cases eighteen different species were identified through the phenotypic technique proposed by Kloos and Schleifer (1975), modified by Cunha et al. (2004) and genotypic technique carried out by sequencing of the *rpoB* gene.

The most frequent were *S. warneri*, *S. epidermidis* and *S. hyicus*, among the CoNS (Table 1), *S. aureus* and *S. intermedius* among the CoPS (Table 2).

In the current study the frequency of *S. epidermidis* observed was 15% among the 150 CoNS isolates of bovine mastitis. However, *S. epidermidis* frequency among human isolates ranged from 43% to 92%, depending on the geographical region where the study was conducted (Ieven et al., 1995; Couto et al., 2001; Vuong & Otto, 2002; De Paulis et al., 2003; Ferreira et al., 2003; Spanu et al., 2003; Cunha et al., 2004; Caierão et al., 2006).

Pereira (2014) studying 300 CoNS isolated from blood cultures hospitalized Brazilian patients followed by *S. haemolyticus* 27 (9.0%), *S. hominis* 22 (7.3%), *S. warneri* 14 (4.7%), *S. lugdunensis* 9 (3.0%) e *S. capitis* 5 (1.7%) and *S. epidermidis* (74.3%) was the most frequent specie identified.

Kamath et al. (1992) reported twenty-seven episodes of bacteremia caused by *Staphylococcus warneri* were identified, 5 were in pediatric and 9 were in adult patients in a hospital in New York, all cases of catheter-related bacteremia, except one, were nosocomially acquired. There was one case of fulminant native valve *S. warneri* endocarditis. These authors conclude that identification to species level of coagulase-negative staphylococci may lead to appreciation of the importance of bacteria such as *S. warneri* as human pathogens. Literature review of reported infections with *S. warneri* include catheter related or unrelated bacteremias with or without immunosuppression, endocarditis (Cimiotti et al., 2006), neonatal infections (Buttery et al., 1997), bovine abortion (Barigye et al., 2007) and canine meningoencephalitis (Espino et al., 2006).

Freitas Guimarães et al. (2013) studying 263 isolates of bovine mastitis from ten dairy herds identified four species of CoPS and 18 species CoNS, the most frequent were *S. aureus*, *S. warneri*, *S. epidermidis*. Siqueira (2011) reported four species and a subspecies of CoPS and three species of CoNS the prevalent were *intermedius*, *S. aureus* and *S. warneri* in organic system dairy herds.

5. Conclusion

Microbiology laboratories require rapid, sensitive and specific techniques to perform identification tests. In the last decades, new molecular methods have been developed and introduced in clinical laboratories of microbiology to improve the credibility of these tests. However, for most clinical laboratories these techniques are still very expensive and phenotypic identification is the most common method used. In the present study showed high concordance in the comparison of these methodologies, these results assure that according to laboratory resources any of them will be suitable to perform the staphylococci identification.

Acknowledgements

This study was funded by FAPESP (The São Paulo State Official Foundation to Support Research) grant number 2011/21323-7. Felipe de F. Guimarães (Grant number 2011/21142-2) is grateful for the grant and the financial received for this research.

References

- Bannerman, T.L., 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In PR Murray, E.J., Jorgensen, M.A., Tenover J.C. (eds). Manual of Clinical Microbiology, ASM, Washington,. 384-404.
- Barigye R, Schaan L, Gibbs PS, Schamber E, Dyer NW., 2007. Diagnostic evidence of *Staphylococcus warneri* as a possible cause of bovine abortion. J Vet Diagn Invest.,19:694-6.
- Birnbaum, D., M. Kelly, and A. W. Chow. 1991. Epidemiologic typing systems for coagulase-negative staphylococci. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 12:319-326.

- Buttery JP, Easton M, Pearson SR, Hogg GG., 1997. Pediatric bacteremia due to *Staphylococcus warneri*: microbiological, epidemiological, and clinical features. J Clin Microbiol., 35:2174-7.
- Caierão, J., Superti, S., Dias, C.A.G. & d'Azevedo, P.A., 2006. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz., 101(3), 277-279.
- Calvo, J., J. L. Hernandez, M. C. Farinas, D. Garcia-Palomo, and J. Agüero. 2000. Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence for misidentification of this *Staphylococcus* species by an automated identification system. J. Clin. Microbiol. 38:3887-3889.
- Capurro A., A. Aspán, U.H. Ericsson, W.K. Persson, K. Artursson. 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. J. Dairy Sci. 93:180–191.
- Chaves, F., Garcia-Álvarez, M., Sanz, F., Alba, C. & Otero, J.R., 2005. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 43, 4877-4879.
- Cimiotti JP, Haas JP, Della-Latta P, Wu F, Saiman L, Larson EL., 2007. Prevalence and clinical relevance of *Staphylococcus warneri* in the neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol., 28:326-30.
- Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Sanches, I.S. & Lencastre, H., 2001. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. J Clin Microbiol., 39, 3099-3103.
- Cunha, M.L.R.S., Sinzato, Y.K. & Silveira L.V.A., 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz., 99(8), 855-860.

- D'Azevedo, P.A., Monteiro, J., Sales, T., Tranchesi, R., Pignatari, A.C.C., 2006. Disseminação nosocomial de *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* com suscetibilidade diminuída à vancomicina em um Hospital Geral de São Paulo, SP, Brasil. VI Congresso Pan-Americano e X Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Porto Alegre, RS, Brasil.
- de Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., de Figueiredo Pantoja, J. C., & Langoni, H., 2013. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. J. Dairy Sci., 96(5), 2866-2872.
- De Paulis, A.N., Predari, S.C., Chazarreta, C.D., Santoianni, J.E. (2003). Five-Test Simple Scheme for Species-Level Identification of Clinically Significant Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Microbiol., 41, 1219-1224.
- Drancourt, M., Raoult, D., 2002. *rpoB* Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* Species. J Clin Microbiol., 40(4): 1333–1338.
- Espino L, Bermudez R, Fidalgo LE, González A, Miño N, Quiroga MI., 2006. Meningoencephalitis associated with *Staphylococcus warneri* in a dog. J Small Anim Pract., 47:598-602.
- Edwards, K.J., Kaufmann, M.E., Saunders, N.A., 2001. Rapid and accurate identification of coagulase-negative Staphylococci by real-time PCR. J Clin Microbiol., 39, 3047-3051.
- Ergün, Y., Aslantaş, Ö., Doğruer, G., Kireççi, E., Sarıbay, M. K., Ateş, C. T., Ülkü, A., Demir, C.. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 33(6): 477- 483, 2009.

- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5:164-166.
- Ferreira L.M., Nader Filho A., Oliveira E., Zafalon L.F. & Souza V., 2006. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. *Ciência Rural*, 36(4):1228-1234.
- Freitas M.F.L., Pinheiro Júnior J.W., Stamford T.L.M., Rabelo S.S.A., Silva D.R., Silveira Filho V.M., Santos F.G.B., Sena M.J. & Mota R.A. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, 72(2):171-177.
- Guimarães, F.F. Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isoladas de mastites bovinas. 2011.147p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.
- Halasa T., K. Huijpsa, O. Østeråsc, H. Hogeveenab. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Quarterly*, 29:18-31.
- Ieven, M., J. Verhoeven, S. R. Pattyn, and H. Goossens. 1995. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 33:1060-1063.
- Kamath U, Singer C, and Isenberg H D , 1992. Clinical significance of *Staphylococcus warneri* bacteremia. *J Clin Microbiol.*, 30(2): 261–264.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. E* 16:111-120.
- Kleeman, K. T., T. L. Bannerman, and W. E. Kloos. 1993. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J. Clin. Microbiol.* 31:1318-1321.
- Kloos, W. E., and C. G. George. 1991. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies with the Microscan Pos ID and rapid Pos ID panel systems. *J. Clin. Microbiol.* 29:738-744.
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L., 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Ver.*, 7, 117-140.
- Kontos, F., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., Maniati, M., Maniatis, A.N., 2003. Evaluation of a novel method based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *tuf* gene for the identification of *Staphylococcus* species. *J Microbiol Methods.*, 55, 465-469.
- Kunz, F., Corti, S., Giezendanner, N., Stephan, R., Wittenbrink, M., Zweifel, C., 2011. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from mastitis milk samples from sheep and goats, *Schweiz Arch Tierheilkd*, 153(2):63-69.
- Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A., Fluit A.C. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol.*, 43, 2286-2290.

- Ieven, M., Verhoen, J., Pattyn, S.R.; Goossens, H.,1995. Rapid and economical methods for species identification of clinically significant coagulase-negative Staphylococci. J Clin Microbiol., 33, 1060-1063.
- Larsen H.D., Aarestup F.M. & Jensen N.E. 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and β -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. Vet. Microbiol., 85:61-67.
- Perl, T. M., P. R. Rhomberg, M. J. Bale, P. C. Fuchs, R. N. Jones, F. P. Koontz, and M. A. Pfaller. 1994. Comparison of identification systems for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus* species. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 18:151-155.
- Refshal, K., and B. M. Andersen. 1992. Clinical relevant coagulase-negative staphylococci: identification and resistance pattern. J. Hosp. Infect. 22:19-31.
- Melchior M.B., Vaarkamp H. & Fink-Gremmels J. 2005. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? Vet. Journal, 171:398-407.
- Oliveira M., Bexiga R., Nunes S.F., Carneiro C., Cavaco L.M., Bernardo F. & Vilela C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Vet. Microbiol., 118:133-140.
- Ote I., Taminiau B., Duprez J.-N., Dizier I. & Mainil J.G. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. Vet. Microbiol., 153: 285-292.
- Pitkala A., Haveri M., Pyörälä S., Myllys V. & Honkanen-Buzalski T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001: prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci., 87:2433-2441.

- Pyorala S. & Taponen S. 2009. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. Vet. Microbiol., 134:3-8.
- Rabello R.F. 2007. Diversidade genética e genes de virulência de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina no Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 161p.
- Santos C.D.M. 2006. *Staphylococcus* sp e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia/MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Mestrado em Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, MG. 69p.
- Santos L.L. 2008. *Staphylococcus coagulase* negativo como agente de mamite em rebanhos bovinos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 40p.
- Silva N., Cardoso H.F.T. 2000. Produção de toxinas hemolíticas por amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. Vet. Notícias., 6(2):63-67.
- Spanu, T., Sanguinetti, M., Ciccaglione, D'Inzeo, T., Romano, L., Leone, F., Fadda, G., 2003. Use of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections. J Clin Microbiol., 41, 4259-4263.
- Taponen S., Simojoki H., Haveri M., Larsen H.D. & Pyorala S., 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. Vet. Microbiol., 115:199-207.

- Unal, N., Yildirim, M., 2010. Antibiotic resistance profiles of staphylococci species isolated from milks, teat skins and noses mucous of cows, The Journal of The Faculty Veterinary Medicine, 16(3):389-396,.
- Vasudevan P., Nair M.K.M., Annamalai T. & Venkitanarayana K.S., 2003. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet. Microbiol., 92:179-185.
- Wieser, M., Busse, H.-J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 1087-1093.

Figures and tables

Table 1. Phenotypic and genotypic identification of the 150 CoNS of bovine mastitis cases isolates from Brazilian dairy herds. 2014.

Table 2. Phenotypic and genotypic identification of the 150 CoPS 150 isolates of bovine mastitis cases isolates from Brazilian dairy herds. 2014.

Table 1. Phenotypic and genotypic identification of the 150 CoNS of bovine mastitis cases isolates from Brazilian dairy herds. 2014.

Species	Phenotypic		Genotypic	
	Nº	%	Nº	%

<i>S. auriculares</i>	1	0.7	1	0.7
<i>S. capitis</i>	1	0.7	1	0.7
<i>S. chromogenes</i>	1	0.7	3	2.0
<i>S. cohnii</i> subsp <i>cohnii</i>	4	2.7	4	2.7
<i>S. epidermidis</i>	22	14.7	22	14.7
<i>S. haemolyticus</i>	7	4.70	7	4.7
<i>S. hominis</i>	6	4.0	6	4.0
<i>S. hyicus</i>	22	14.7	20	13.3
<i>S. lugdunensis</i>	2	1.3	2	1.3
<i>S. pasteurii</i>	5	3.3	5	3.3
<i>S. saccharolyticus</i>	2	1.3	2	1.3
<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>	1	0.7	1	0.7
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	3	2.0	3	2.0
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>schleiferi</i>	5	3.3	6	4.0
<i>S. sciuri</i> subsp <i>sciuri</i>	3	2.0	3	2.0
<i>S. simulans</i>	4	3.0	6	4.0
<i>S. warneri</i>	50	33.0	48	32.0
<i>S. xylosum</i>	11	7.3	10	6.7
Total	150		150	

Concordância = 96,7%

Table 2. Phenotypic and genotypic identification of the 150 CoPS 150 isolates of bovine mastitis cases isolates from Brazilian dairy herds. 2014.

Species	Phenotypic		Genotypic	
	Nº	%	Nº	%
<i>S. hyicus</i>	21	14.0	19	12.7
<i>S. intermedius</i>	19	12.7	21	14.0
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	5	3.3	5	3.3
<i>S. aureus</i>	105	70.0	105	70.0
Total	150		150	
Concordância=98,7%				