

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite em diferentes regiões do Rio Grande do Sul: enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e classificação nos grupos *agr

Isabela Schneid Kroning

Pelotas, 2015

Isabela Schneid Kroning

Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite em diferentes regiões do Rio Grande do Sul: enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e classificação nos grupos *agr

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2015

Catálogo na fonte
Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

K93s Kroning, Isabela Schneid

Staphylococcus aureus isolados de leite de vacas com mastite em diferentes regiões do Rio Grande do Sul : enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e classificação nos grupos agr / Isabela Schneid Kroning ; Wladimir Padilha da Silva, orientador. — Pelotas, 2015.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Mastite. 2. Enterotoxinas clássicas. 3. *Locus agr*. 4. Formação de biofilme. 5. *Locus ica*. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Título.

CDD636.084

Isabela Schneid Kroning

Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite em diferentes regiões do Rio Grande do Sul: enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e classificação nos grupos *agr

Dissertação aprovada, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/02/2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Doutor em Ciências dos Alimentos – USP

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – UFPel

Profa. Dra. Caroline Peixoto Bastos
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFPel

Dra. Júlia Coswig Goldbeck
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFPel

Agradecimentos

À Deus por me conceder uma vida repleta de realizações e por me cercar de pessoas maravilhosas e a Nossa Senhora pela proteção de mãe e por estar comigo em todos os momentos;

Aos meus pais Carmem e Carlos por todo amor, dedicação, apoio e presença, por serem minha base e sempre terem a mão firme para me levantar;

À minha irmã Roberta, sobrinha e afilhada Júlia e minha avó Káthe pelo amor, carinho, conselhos, presença, apoio e momentos de alegria compartilhados;

Ao meu marido Alexsandro, por todo amor, apoio, incentivo, por me aguentar, me levantar em tantas quedas pelo caminho, por compartilhar dos meus sonhos e comemorar comigo cada vitória;

Ao meu orientador Wladimir Padilha da Silva, pela confiança no meu trabalho, pela orientação, amizade, ensinamentos e tantos conselhos sem os quais não conseguiria concluir esta etapa;

A professora Ângela Fiorentini por todo apoio, paciência, disponibilidade de ajudar, confiança e amizade;

Ao professor Celso Medina Fagundes pela amizade, apoio e ensinamentos;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos Andréia, Júlia, Tatiane, Marcia, Ju, Lou, Mari, Graci, Carlinha, Ana Rita, Fabio, Flávia, Simone, Greice, Guilherme, Cláudio, Darla, Sônia, Cristiane, Natalie, Maiara, Lys e Cristiano por todo apoio, incentivo, carinho, momentos de descontração e amizade;

As colegas e amigas Louise, Juliana, Graciele e Ana Rita, pelas manhãs, tardes ou noites de estudo... pela cumplicidade, por dividir as tensões e pela ajuda na pesquisa;

As amigas Carla Sehn, Darla Volcan e Mariana Iglesias, por todo apoio na pesquisa, nas manhãs chuvosas ou nas tardes ensolaradas, por me aturarem nos momentos difíceis, por todo incentivo, conhecimentos compartilhados, por nunca me negarem apoio, e pelo simples fato de existirem;

A Tatiane Gandra pela amizade, ensinamentos, incentivo e apoio durante o tempo de convivência;

A Marcia Mata pela disponibilidade, sugestões, revisões e dicas valiosas na conclusão desta etapa;

A Dianini Kringel, Janice Moura, Mariane Igansi e Meg Fernandes por de longe ou de perto sempre estarem presentes, por todo incentivo, apoio e amizade, tesouros que herdei da Química de Alimentos;

Aos membros da banca Dra. Caroline Bastos, Dr. Eliezer Gandra e Dra, Júlia Goldbeck por se disporem a participar da banca examinadora desta dissertação;

Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) e ao Programa de Desenvolvimento de Bovinocultura Leiteira da Metade Sul do Rio Grande do Sul (UFPEL), por disponibilizar os isolados de mastite clínica e subclínica para este estudo;

A todos, que direta ou indiretamente, me acompanharam ao longo desse trajeto...

O meu muito obrigada!!

Resumo

KRONING, Isabela Schneid. ***Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite em diferentes regiões do Rio Grande do Sul: enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e classificação nos grupos agr**. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A mastite bovina é um grave problema para o rebanho leiteiro em todo o mundo, sendo *S. aureus* o principal micro-organismo causador da doença, assim como é um dos mais importantes micro-organismos envolvidos com doenças transmitidas por alimentos (DTA). O objetivo deste estudo foi avaliar a identidade de 31 isolados de Estafilococos coagulase positiva (ECP) provenientes de mastite bovina clínica e subclínica, através de análises fenotípicas e moleculares, além de verificar o seu potencial enterotoxigênico, capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e sua classificação nos grupos *agr*. Para avaliação do perfil de enterotoxigenicidade, avaliou-se a presença dos genes das enterotoxinas clássicas (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *eee*) utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e, para verificação da capacidade de produção de biofilmes, avaliou-se a capacidade de aderência em microplacas de poliestireno, bem como a presença dos genes *icaA* e *icaD*, por PCR. A resistência a antimicrobianos foi testada segundo as normas do CLSI (2012). Para a classificação nos grupos *agr* utilizou-se uma biplex-PCR. Todos os isolados pertenciam à espécie *S. aureus*. Foi observada resistência a um ou mais antimicrobianos em 93% dos isolados, e 54% foram multirresistentes. Com relação à formação de biofilme, 45% dos isolados aderiram ao poliestireno, sendo que a presença do gene *icaA*, foi observada em 71% e do gene *icaD*, em 74% dos isolados. Para a presença dos genes das enterotoxinas clássicas, observou-se a prevalência do gene da enterotoxina A (13%), seguido pelos genes da enterotoxina C (6,4%) e B (3,2%). Não houve presença do gene da enterotoxina D e E. Quanto a classificação nos grupos *agr*, foram prevalentes *agr* III e I (32,2% e 22,5% respectivamente), porém, houve sobreposição destes grupos em dois isolados. Verificou-se que todos isolados pertenciam a espécie *S. aureus* entre os isolados de ECP provenientes de mastite, de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, Brasil. Alguns isolados apresentam genes de enterotoxinas e têm capacidade de formar biofilme em poliestireno, podendo persistir em ambientes da ordenha e da indústria de alimentos, além de contaminar o leite. Apresentam resistência à maioria dos antimicrobianos testados, e pertencem a distintos grupos *agr*, sendo que os grupos *agr* mais prevalentes são os que regulam a resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme, fatores preocupantes para a incidência da doença e para a persistência em ambientes de ordenha/indústria.

Palavras chaves: mastite, enterotoxinas clássicas, *locus agr*, formação de biofilme, *locus ica*

Abstract

KRONING, Isabela Schneid. ***Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis in different regions of Rio Grande do Sul: enterotoxigenicity, biofilm-forming ability, antimicrobial resistance and classification in *agr* groups.** 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Bovine mastitis is a serious problem for the dairy herd in the world, with *S. aureus* main microorganism that causes the disease, as it is one of the most important microorganisms involved in foodborne disease (FBD) throughout the world. The objective of this study was to evaluate the identity of 31 isolates of coagulase positive staphylococci (SCP) from bovine mastitis clinical and subclinical through phenotypic and molecular analyzes, and check your enterotoxigenic potential, biofilm formation capacity, antimicrobial resistance and classify them in *agr* groups. To evaluate the enterotoxigenicity, was analyzed the presence of the classic enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) using the polymerase chain reaction and to verify the biofilm production capacity was evaluated adherence capacity in polystyrene microplates as well as the presence of *icaA* and *icaD* genes, using PCR. Antimicrobial resistance was tested according to CLSI (2012). For classification in *agr* groups used a biplex-PCR. All isolates were identified as *S. aureus*. We observed the resistance to one or more antibiotics in 93% of the isolates and 54% of the isolates were multidrug-resistant. In relation to biofilm formation, it was found that 45% of isolates adhered to polystyrene, and the presence of *icaA* gene was observed in 71% of the isolates and *icaD* gene in 74% of the isolates. Regarding the presence of the classical enterotoxin genes was observed the prevalence of the enterotoxin A gene (13%), followed by the enterotoxin C gene with 6.4% and enterotoxin B gene with 3.2%. There was no presence of enterotoxin gene D and E. In relation to the classification in *agr* groups, there was prevalency of *agr* III and I (32.2% and 22.5% respectively), however, there was overlap of these *agr* groups in two isolates. It was found that all isolates belonged to the species *S. aureus* between SCP isolates from mastitis from different regions of Rio Grande do Sul, Brazil. Some isolates have enterotoxin genes and have the capacity to form biofilm in polystyrene, Because of this, the isolates have the capacity of persist in environments milking and the food industry. The isolates are resistant to most antibiotics tested, and belong to different *agr* groups, that are responsible for regulating the antimicrobial resistance and biofilm formation, worrying factors for the incidence of the disease and the persistence of this microorganism in the milking and in the milk processing environment.

Key words: mastitis, classic enterotoxin, *agr locus*, biofilm formation, *ica locus*

Lista de Figuras

Figura 1	Produtos da amplificação dos genes <i>nuc</i> 1 e 2 (458 pb) e 16S rRNA (252 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 16: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 17: <i>S. aureus</i> ATCC 25923, Coluna 18: Controle da reação água ultra pura.....	37
Figura 2	Produtos da amplificação dos genes <i>nuc</i> 1 e 2 (458 pb) e 16S rRNA (252 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 9: <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina....	38
Figura 3	Produtos da amplificação dos genes <i>nuc</i> 1 e 2 (458 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 100 pb; Coluna 2 a 8: <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina; Coluna 9: Controle da reação água ultra pura.....	38
Figura 4	Produtos da amplificação do gene 16S rRNA (252 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 100 pb; Coluna 2 a 8: <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina; Coluna 9: Controle da reação água ultra pura.....	38
Figura 5	Produtos da amplificação dos genes <i>nuc</i> 1 e 2 (458 pb), <i>nuc</i> 5 e 6 (106 pb), <i>nuc</i> 7 e 8 (740pb) e 16S rRNA (252 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2: <i>S.aureus</i> ATCC 25923, Coluna 3: <i>S. hyicus</i> ATCC 11249, Coluna 4: <i>S. intermedius</i> ATCC 29663 Coluna 5: <i>S. xylosus</i> ATCC 29971, Coluna 6: <i>S. sciuri</i> ATCC 29061, Coluna 7: <i>S. lugdunensis</i> ATCC 49576, Coluna 8: <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, Coluna 9: <i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970, Coluna 10: <i>S. capitis</i> ATCC 35661, Coluna 11: <i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305, Coluna 12: <i>S. simulans</i> ATCC 27851 Coluna 13: Controle negativo <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 Coluna 14: Controle da reação água ultra pura.....	39
Figura 6	Média de DO de isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de mastite bovina, obtidas na avaliação da capacidade de formação de biofilme, isolados apresentados de 1 a 31 e controles positivos <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (32) e ATCC 6538 (33).....	40
Figura 7	Produtos da amplificação do gene <i>ica</i> A (1315pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 18: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina.....	41
Figura 8	Produtos da amplificação do gene <i>ica</i> A (1315pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 17: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 18: Controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 25923, Coluna 19: Controle negativo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	41
Figura 9	Produtos da amplificação do gene <i>ica</i> D (381pb), Coluna 1:	

	marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 18: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina.....	41
Figura 10	Produtos da amplificação do gene <i>ica D</i> (381pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2: Controle da reação água ultra pura, Coluna 3: Controle negativo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228. Coluna 4: Controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 25923, Coluna 5 a 18: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina.....	42
Figura 11	Produtos da amplificação do gene <i>eea</i> (544pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 11: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina Coluna 12: Controle positivo <i>S. aureus</i> FRI S6. Coluna 13: Controle da reação água ultra pura.....	42
Figura 12	Produtos da amplificação do gene <i>eea</i> (544pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 9: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina.....	42
Figura 13	Produtos da amplificação do gene <i>eea</i> (544pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 14: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 15: Controle positivo <i>S. aureus</i> FRI S6. Coluna 13: Controle da reação água ultra pura.....	43
Figura 14	Produtos da amplificação do gene <i>eeb</i> (404pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina Coluna 17: Controle positivo <i>S. aureus</i> FRI S6, Coluna 18: Controle da reação água ultra pura.....	43
Figura 15	Produtos da amplificação do gene <i>eeb</i> (404pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2: Controle da reação água ultra pura, Coluna 3 a 18: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 19: Controle positivo <i>S. aureus</i> FRI S6.....	43
Figura 16	Produtos da amplificação do gene <i>eec</i> (257pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 14: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina.....	44
Figura 17	Produtos da amplificação do gene <i>eec</i> (257pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 13: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 14: <i>S. aureus</i> ATCC 25923, Coluna 15: Controle da reação água ultra pura.....	44
Figura 18	Produtos da amplificação do gene <i>eec</i> (257pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 7: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 8: <i>S. aureus</i> ATCC 25923, Coluna 9: Controle da reação água ultra pura.....	44
Figura 19	Produtos da amplificação do gene <i>eed</i> (330pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 17: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 18: <i>S. aureus</i> FRI 361, Coluna 19: Controle da reação água ultra pura.....	45
Figura 20	Produtos da amplificação do gene <i>eed</i> (330pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: <i>S.</i>	

	<i>aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 17: <i>S. aureus</i> FRI 361, Coluna 18: Controle da reação água ultra pura.....	45
Figura 21	Produtos da amplificação do gene <i>eee</i> (482pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 17: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 18: <i>S. aureus</i> FRI 326, Coluna 19: Controle da reação água ultra pura.....	45
Figura 22	Produtos da amplificação do gene <i>eee</i> (482pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 17: <i>S. aureus</i> FRI 326, Coluna 18: Controle da reação água ultra pura.....	46
Figura 23	Produtos da amplificação dos genes <i>agr</i> I e II (440pb e 572pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 18: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 19: <i>S. aureus</i> RN 6390B , Coluna 20: <i>S. aureus</i> USA 100, Coluna 21: Controle da reação água ultra pura..	48
Figura 24	Produtos da amplificação dos genes <i>agr</i> I e II (440pb e 572pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 15: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 16: <i>S. aureus</i> RN 6390B , Coluna 17: <i>S. aureus</i> USA 100, Coluna 18: Controle da reação água ultra pura..	48
Figura 25	Produtos da amplificação dos genes <i>agr</i> III e IV (406pb e 588pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina, Coluna 17: <i>S. aureus</i> ATCC 25923, Coluna 18: <i>S. aureus</i> RN 4850, Coluna 19: Controle da reação água ultra pura...	48
Figura 26	Produtos da amplificação dos genes <i>agr</i> III e IV (406pb e 588pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 17: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina.....	49
Figura 27	Produtos da amplificação dos genes <i>agr</i> I e III (440pb e 406pb) dos isolados com sobreposição de grupos <i>agr</i> Coluna 1 e 2: <i>S.aureus</i> isolados de mastite bovina (SA8 e SA16), Coluna 3: <i>S. aureus</i> RN 6390B , Coluna 4: <i>S. aureus</i> USA 100, Coluna 5: Controle da reação água ultra pura, Coluna 6: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 7 e 8: <i>S. aureus</i> isolados de mastite bovina (SA8 e SA16), Coluna 9: <i>S. aureus</i> ATCC 25923, Coluna 10: <i>S. aureus</i> RN 4850, Coluna 11: Controle da reação água ultra pura...	49

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para identificação molecular de <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i>	33
Tabela 2	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a detecção dos grupos <i>agr</i> e de genes relacionados à virulência de <i>S. aureus</i>	35
Tabela 3	Perfil de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina provenientes de distintas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil	47

Sumário

1 Introdução	13
2 Revisão da literatura	15
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.2 Mastite e <i>S. aureus</i>	16
2.3 Enterotoxinas estafilocócicas	18
2.4 Formação de biofilme por <i>S. aureus</i>	20
2.5 Genes do <i>locus ica</i> e formação de biofilme.....	22
2.6 Resistência a antimicrobianos	24
2.7 Grupos <i>agr</i>	25
3 Manuscrito - Enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme e resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina.....	29
Resumo	29
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados	37
Discussão	49
Referências	52
4 Considerações finais	57
Referências	58

1 Introdução

O Brasil ocupa o quinto lugar entre os países produtores de leite, com uma produção média de 31,6 milhões de toneladas por ano. Dentre os estados do Brasil, Minas gerais ocupa o 1º lugar no ranking de maior produtor de leite com 25,8%, seguido pelo Rio Grande do Sul, com 15,2%, e do Paraná, com 11,2% (IBGE, 2013).

Entre as espécies de ECP, as que têm maior ocorrência na mastite bovina são *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. aureus*, sendo esta última, a de maior importância, pela elevada prevalência e virulência (ZAFALON et al., 2009).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) um dos principais patógenos associados à mastite contagiosa bovina (OLIVEIRA et al., 2011). Essa bactéria apresenta vários fatores de virulência que conferem a capacidade de colonização e infecção da glândula mamária (HAVERI et al., 2007).

O leite e os produtos lácteos têm sido relatados como os principais alimentos associados com intoxicação alimentar estafilocócica, geralmente causada pelas enterotoxinas estafilocócicas (EE). São conhecidos 22 tipos de EE, sendo que as mais estudadas são chamadas de EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE), as quais são responsáveis por, aproximadamente, 95% dos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (KEROUANTON et al., 2007; AL-TARAZI et al., 2009; JOHLER e STEPHAN, 2010).

A formação de biofilmes por *S. aureus* no úbere de vacas, permite a persistência das infecções, facilitando tanto a permanência da mastite, como a disseminação do patógeno no leite e nos utensílios de ordenha (MELCHIOR et al., 2009). A capacidade do *S. aureus* aderir às superfícies se dá por meio de um polissacarídeo capsular e pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA). O *operon ica*, um dos responsáveis pela produção de biofilme, é formado por quatro genes (*icaADBC*) e está presente em grande parte dos isolados de *S. aureus* (GÖTZ, 2002). Dos genes deste *operon*, *icaA* e *icaD*, são relatados como os mais importantes na formação de biofilmes por estes micro-organismos, por serem os genes responsáveis por iniciar a formação de biofilme (VASUDEVAN et al., 2003).

A produtividade leiteira também é afetada negativamente pela mastite bovina, sendo os prejuízos econômicos significativos e associados à redução da qualidade do leite, descarte do leite além dos gastos com medicamentos e serviços veterinários (AIEMSAARD et al., 2011).

Os antimicrobianos são a principal forma de tratamento da mastite e o uso extensivo em rebanhos leiteiros aumentou a emergência da resistência a múltiplas drogas entre isolados de *S. aureus* provenientes de leite bovino em muitos países (HOLMES E ZADOKS, 2011; HARAN et al., 2012; KREAUSUKON et al., 2012; WANG et al., 2014), sendo um fator preocupante, uma vez que facilita a persistência da doença e, conseqüentemente, do micro-organismo na glândula mamária.

O *accessory gene regulator (agr)*, é o sistema de regulação de genes de virulência mais conhecido e estudado em *S. aureus*, sendo responsável por regular hemolisinas, enterotoxinas, enzimas, proteínas de superfície e resistência a antimicrobianos (BOYEN et al., 2009). Os isolados classificados em diferentes grupos *agr* (I, II, III e IV) exibem padrões distintos de virulência (MONTANARO et al., 2010). A interferência na regulação dos fatores de virulência parece ser uma abordagem promissora, uma vez que pode-se supor uma relação entre os isolados e os fatores de virulência que estes poderão expressar (COSTERTON et al., 2009).

Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a identidade de Estafilococos coagulase positiva isolados de leite de vacas com mastite provenientes de diferentes regiões do Rio Grande do Sul/Brasil, através de testes fenotípicos e moleculares. Objetivou-se, ainda, analisar a presença de genes das enterotoxinas clássicas (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *eee*), verificar a habilidade de formação de biofilme dos isolados e a presença dos genes *icaA* e *icaD*, assim como o perfil de resistência a antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite e a classificação dos isolados nos grupos *agr*.

2 Revisão da literatura

2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e tendem a formar agrupamentos em formato semelhante a cachos de uva. São micro-organismos mesófilos que se desenvolvem entre 7°C e 47,8°C e produzem enterotoxinas entre 10°C e 46°C, com um ótimo entre 40°C e 45°C, frequentemente envolvidos em surtos de DTA (TRABULSI et al., 2008; BRASIL, 2013).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por 49 espécies e 26 subespécies (EUZÉBY, 2015), sendo a maioria coagulase negativa, ou seja, que não apresentam a capacidade de produzir a enzima coagulase. Apenas *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* sintetizam essa enzima e são denominados Estafilococos coagulase positiva (ECP) (BANNERMAN, 2003).

S. aureus é tolerante a concentrações entre 10% e 20% de NaCl, se multiplica em pH entre 4 e 9,8, com um ótimo entre 6 e 7. A atividade de água mínima necessária para o micro-organismo se desenvolver é 0,86, embora sob condições ideais, esta bactéria possa se desenvolver em atividade de água de 0,83 (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

S. aureus é considerada a espécie mais virulenta do gênero *Staphylococcus*, devido a sua grande variedade de fatores de virulência (GÖTZ, 2002). É a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar, responsável por 98% dos surtos (SANTANA et al., 2010).

Apresenta natureza ubíqua, tendo como reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves. Estima-se que 25 a 40% da população humana carreguem *S. aureus*, sendo um importante indicador de higiene pessoal e da qualidade dos alimentos (INGAVALLE et al., 2005; LUONG et al., 2006).

Em animais, *S. aureus*, é o principal agente etiológico de mastite, causando uma infecção crônica e profunda na glândula mamária de fêmeas lactantes (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

2.2 Mastite e *S. aureus*

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, que afeta a produção leiteira resultando em alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite. É a enfermidade de maior importância nos rebanhos leiteiros em todo o mundo devido à alta incidência de casos clínicos, à alta prevalência de infecções subclínicas e aos prejuízos econômicos que ocasiona (PRESTES et al., 2002).

Os principais agentes causadores de mastite são *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis*. Estes micro-organismos são bem adaptados à glândula mamária e ocasionam infecções crônicas. A glândula infectada é a principal fonte desses agentes em um rebanho leiteiro e a transmissão para quartos mamários não infectados e/ou vacas suscetíveis ocorre, principalmente, durante a ordenha (HALASA et al., 2009) BARKEMA et al., 2009; MARTINS et al., 2010).

S. aureus destaca-se como um dos mais frequentes entre os agentes envolvidos na etiologia da mastite, e determina as maiores perdas na produção em rebanhos leiteiros em todo o mundo (SCHLEGELOVÁ et al., 2003; MELCHIOR et al., 2011).

A mastite pode ocorrer de duas formas, mastite clínica e mastite subclínica. A mastite clínica é caracterizada por alterações macroscópicas do leite e da glândula mamária, podendo evoluir para mastite crônica. Já a mastite subclínica não apresenta alterações macroscópicas no leite nem da glândula mamária, mas apresenta alta contagem de células somáticas e persistência das bactérias na glândula mamária, sendo responsável por até 30% de todos os casos de mastite bovina (HALASA et al., 2007).

O diagnóstico da forma clínica é feito pela visualização de mudanças na aparência do leite (presença de grumos e coágulos) e na glândula mamária (inchaço e vermelhidão) (WU et al., 2007). Na mastite subclínica os animais permanecem sem sintomas aparentes, o que potencializa a transmissão de micro-organismos

oriundos de animais infectados para os sadios, e o diagnóstico é realizado por testes indiretos que se baseiam na elevada contagem de células somáticas, como leucócitos e células epiteliais, no leite (BRADLEY, 2002; VERSCHOOR et al., 2009).

O *California Mastitis Test* (CMT) é um dos testes mais utilizados para detecção da mastite subclínica por ser rápido e de baixo custo, podendo ser realizado pelos próprios produtores, no entanto, possui baixa sensibilidade (LEACH et al., 2008; VIGUIER et al., 2009). Nesse teste, amostras de leite são colocadas em contato com um detergente aniônico neutro que rompe a membrana das células somáticas para liberação e agregação dos ácidos nucleicos. Ocorre a formação de um gel de viscosidade variada dependendo da quantidade de células somáticas presentes (VIGUIER et al., 2009).

Na literatura encontram-se dados sobre a ocorrência de *S. aureus* em isolados de leite de vacas com mastite. Mendonça et al. (2012), avaliando *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina no estado do Rio de Janeiro, encontraram 36,2% de *S. aureus*, seguido de 11,4% de *S. intermedius*. Em estudo realizado no sul da China, observou-se um percentual de mastite clínica em bovinos de 8,7% e subclínica de 48,8%. Nas duas situações *S. aureus* foi o agente etiológico isolado com maior frequência (YANG et al., 2011). Rall et al. (2014), estudaram mastite por *Staphylococcus* spp. no estado de São Paulo e, encontraram a prevalência de *S. aureus*, seguido de *S. warneri* e *S. saprophyticus*. Porém, dados de um estudo realizado no Pará revelam maior frequência de Estafilococos coagulase negativa (ECN), seguido de *S. aureus*, em ambos os quadros, de mastite clínica e subclínica (OLIVEIRA et al., 2011).

A mastite infecciosa por *S. aureus* é de difícil tratamento devido, entre outros fatores, à resistência aos antimicrobianos que esse micro-organismo apresenta. As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em saúde pública, pois as toxinas podem ser secretadas no leite e permanecerem estáveis nos produtos oferecidos ao consumidor. Existe um risco à saúde associado ao consumo de leite, uma vez que a maioria dos casos diagnosticados é de mastite subclínica, na qual o leite e a glândula mamária, não apresentam sinais visíveis da doença (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

2.3 Enterotoxinas estafilocócicas

Atualmente, 22 EE foram descritas, sendo que as EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais estudadas e responsáveis por, aproximadamente, 95% dos casos/surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (AL-TARAZI et al., 2009, JOHLER e STEPHAN, 2010). O leite e seus derivados estão frequentemente envolvidos com esta intoxicação (CHAPAVAL et al., 2006; ARGUDIN et al., 2010; CRETENET et al., 2011).

As EE são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (25 a 30 KDa), hidrossolúveis, cuja composição de aminoácidos, estrutura molecular e mecanismos de ação são semelhantes entre si, porém, possuem propriedades imunológicas distintas (JOHNSON et al., 1991; THOMAS et al., 2007).

As EEs são potentes exotoxinas sintetizadas por espécies de *Staphylococcus* durante a fase logarítmica de multiplicação ou durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária, no entanto, são necessárias entre 10^5 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

No Brasil, a Instrução normativa 62 (IN 62), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), preconiza que a temperatura máxima de conservação do leite na propriedade rural seja de 7°C, caso contrário, o transportador não deve realizar a coleta da matéria prima, pois deve-se manter o leite em baixa temperatura para controlar a produção de enterotoxinas, pois além da multiplicação bacteriana diminuir, a síntese de enterotoxinas é praticamente inibida em temperaturas inferiores a 7°C (ASPERGER, 1994; BRASIL, 2011).

As principais causas da elevada incidência de intoxicação alimentar estafilocócica causadas por leite e derivados são o abuso de temperatura, a ineficiente descontaminação de superfícies originalmente contaminadas, pela formação de biofilme, por exemplo, ou a contaminação durante preparo pelos manipuladores. Uma vez que *S. aureus* suporta diferentes condições de temperatura e pH, pode crescer em uma ampla variedade de alimentos. Dessa forma, um alimento contaminado com isolados produtores de EE e mantido a uma temperatura que permita a rápida multiplicação da bactéria (refrigeração inadequada) é uma fonte comum de intoxicação (BHATIA e ZAHOOR, 2007; PINCHUK et al., 2010).

Determinadas condições ambientais que facilmente destroem o micro-organismo produtor destas enterotoxinas, não inativam as EEs (FRANCO e LANDGRAFF, 2008). As EE são resistentes às enzimas proteolíticas, mantendo, portanto, a sua atividade no trato digestivo após a ingestão.

A enterotoxina A é considerada como a principal causa de surtos. A enterotoxina B é conhecida por causar intoxicações com sintomas mais severos comparada as demais enterotoxinas. O gene da enterotoxina C é frequentemente associado a *S. aureus* isolados de leite (ARGUDIN et al., 2010; VALIHRACH et al., 2013, CARFORA et al., 2015). A enterotoxina D é reconhecida como a segunda enterotoxina estafilocócica mais comumente associada com intoxicação alimentar no mundo, sendo de grande importância, pois uma pequena dose infectante é capaz de induzir a intoxicação. A enterotoxina E também está associada a alguns casos de intoxicação alimentar, porém, com menor frequência que as demais (PINCHUK et al., 2010).

Os genes codificadores de EE, assim como outros que codificam fatores de virulência de *Staphylococcus*, também podem estar dispostos em elementos genéticos móveis (NOVICK et al., 2001; YARWOOD et al., 2002). Sabe-se que EEA, a enterotoxina com a maior frequência de envolvimento em intoxicação alimentar estafilocócica, é codificada por um gene localizado em um bacteriófago (ARGUDIN et al., 2010).

Genes que codificam fatores de virulência localizados em elementos genéticos móveis num isolado de *S. aureus* implica em sua possível mobilidade de uma molécula de DNA para outra, ou de uma bactéria para outra, num processo conhecido como transferência horizontal de genes, conferindo uma vantagem seletiva e evolutiva ao micro-organismo receptor, e em um biofilme, por exemplo, essa transferência é facilitada pela proximidade das células (FERREIRA, 2001; YARWOOD et al., 2002).

Em estudos com isolados de *S. aureus* provenientes de leite, leite com mastite e produtos lácteos, existe grande diversidade nos tipos de enterotoxinas encontradas. Carfora et al. (2015) avaliaram isolados de *S. aureus* provenientes de leite e produtos lácteos, e encontraram prevalência do gene da enterotoxina C (28,6%), seguido pelos genes da enterotoxinas A e D (20%). Gómez et al. (2007), em estudo com isolados de leite de vacas com mastite, encontraram que nenhum dos isolados portava os genes da enterotoxina A, B e C.

Piechota et al. (2014) analisaram isolados de *Staphylococcus* provenientes de leite de vacas com e sem mastite, encontrando prevalência do gene da enterotoxina C (70%), seguido pelas enterotoxinas D (20%) e B (16,7%). Entre os isolados, poucos apresentaram os genes das enterotoxinas A e E. Os genes que codificam enterotoxinas foram identificados em 73,4% dos isolados de vacas com mastite e, em apenas 20% dos isolados de vacas sem mastite.

2.4 Formação de biofilme por *S. aureus*

Os biofilmes são constituídos por bactérias, envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, ou seja, são depósitos onde os micro-organismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica, denominados glicocálice (COSTERTON et al., 1999).

A capacidade de *S. aureus* produzirem biofilmes ajuda a bactéria a sobreviver em ambientes hostis dentro do hospedeiro, e esse é um fator responsável por infecções crônicas e/ou persistentes (COSTERTON et al., 1999). O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e os micro-organismos que se multiplicam em um biofilme são resistentes aos agentes antimicrobianos e sanitizantes empregados na indústria, uma vez que a formação de exopolissacarídeos (EPS) dificulta a penetração destes agentes, submetendo o micro-organismo a doses subletais de antimicrobianos, induzindo a resistência (DONLAN E COSTERTON, 2002).

Atualmente, existem diversas teorias sobre as etapas que ocorrem durante a formação de biofilme. A adesão da bactéria à superfície é um dos passos iniciais na formação do biofilme, e é quando células bacterianas anexadas a uma superfície secretam uma substância viscosa que serve para ancoragem das células (O'GARA e HUMPHREYS, 2001). Esta adesão é influenciada por diversos fatores, incluindo: características físico-químicas da bactéria, propriedades da superfície do material e fatores ambientais. Propriedades biológicas da bactéria, tais como presença de fímbrias, flagelos e produção de EPS, também influenciam na ligação à superfície (SIMÕES et al., 2010).

A segunda etapa para formação do biofilme consiste na aglomeração de bactérias em multicamadas. O principal fator responsável pela formação desse aglomerado de células é o PIA. O terceiro passo é o crescimento do biofilme, com

mais células se agregando e produzindo EPS. O biofilme possui uma estrutura bem definida, com canais entre as comunidades de células, preenchidos por fluido, possivelmente para o transporte de nutrientes e para retirar resíduos metabólicos (OTTO, 2004). Após a união de células em camadas, ocorre a maturação do biofilme que pode levar 10 ou mais dias (STOODLEY et al., 2002)

Após a maturação do biofilme pode ocorrer o desprendimento de células bacterianas, que voltam a sua forma planctônica, o que é de fundamental importância, pois em biofilmes formados em equipamentos e instalações da indústria alimentícia, as células microbianas podem desprender-se e contaminar o alimento ou, então, colonizar e iniciar um novo biofilme, proporcionando outra fonte de contaminação, que pode vir a causar a contaminação cruzada dos alimentos (NORWOOD & GILMOUR, 1999).

As causas da formação do biofilme são as falhas nos procedimentos de higienização dos equipamentos em que o leite entra em contato, o que permite que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação para o alimento (ALVIM, 2008).

Devido ao seu tamanho e agregação, os biofilmes não são suscetíveis aos macrófagos e são resistentes a diversos antimicrobianos (DONLAN E COSTERTON, 2002; CUCARELLA et al., 2004). Os biofilmes reduzem a eficiência dos sanitizantes, trazendo prejuízos econômicos para a indústria, além de constituírem um foco de contaminação para os alimentos, pelo desprendimento de porções do biofilme durante a fase de maturação (SIMÕES et al., 2010).

Muitas infecções crônicas por *S. aureus* associam-se a multiplicação bacteriana na forma de biofilmes, dificultando a ação dos macrófagos e aumentando a resistência a diversos antimicrobianos (BOYEN et al., 2009).

O PIA é composto por um polímero de N-acetilglucosamina. A biossíntese do PIA é controlada pelo *operon ica* (MAIRA-LÍTRAN et al., 2002). Diversos genes podem estar envolvidos na capacidade individual de cada isolado em formar biofilmes, destacando-se os genes *icaA* e *icaD* (MELCHIOR et al., 2009).

Além dos genes do *locus ica* outro gene que está envolvido com a formação de biofilme é o *bap* (*biofilm-associated protein*), que codifica uma proteína de superfície. O gene *bap* está contido em uma ilha de patogenicidade (SaPIbov2) e codifica uma proteína com 2.276 aminoácidos que atua na primeira fase de aderência à superfície. O gene *bap*, além de estar envolvido na adesão primária à

superfície, tem também um papel importante na relação intercelular após a formação do aglomerado bacteriano, sendo que a diminuição ou inativação desse gene leva a uma diminuição da produção de PIA (CUCARELLA et al., 2001; CUCARELLA et al., 2004).

S. aureus produzem também duas proteínas associadas com a parede celular que se ligam a fibronectina (Fn) e são chamadas de *FnBPA* e *FnBPB*. Os mutantes de *S. aureus* que não possuíam o gene *fnbA* ou *fnbB* foram efetivos em aderir a superfície, porém o mutante que não apresentava nenhum dos dois genes, foi deficiente na adesão, e quando um dos dois genes foi inserido utilizando plasmídeos, a adesão foi restaurada (CUCARELLA et al., 2001).

Alguns *S. aureus* responsáveis por causar a mastite têm a capacidade de invadir o epitélio mamário, limitando o sucesso da terapia com antimicrobianos contra a doença, o que pode ser devido à capacidade dessa bactéria invadir e sobreviver dentro da célula (BUZZOLA et al., 2007). Oliveira et al. (2011) propuseram que isolados de *S. aureus* produtores de biofilme apresentam capacidade invasiva maior em células epiteliais da glândula mamária de bovinos, quando comparada aos isolados não produtores de biofilme.

O método de aderência em microplaca é bastante utilizado em testes *in vitro* para avaliar a capacidade de formação de biofilme (CRAMTON et al., 1999; VASUDEVAN et al., 2003; STEPANOVIC et al., 2007; MERINO et al., 2009). O método de aderência em placa de microtitulação permanece entre os ensaios mais utilizados para a investigação de formação de biofilme, e gera resultados com base na densidade ótica (STEPANOVIC et al., 2007). Lee et al. (2014) avaliaram isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes fontes em uma fazenda leiteira, e encontraram 45,2% dos isolados produtores de biofilme em microplacas de poliestireno.

Cucarella et al. (2004) estudaram isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias, e observaram que isolados que carregavam os genes *bap* e *icaADBC* foram fortes produtores de biofilme.

2.5 Genes do locus *ica* e formação de biofilme

O locus *ica* é responsável pela produção do PIA e de um polissacarídeo capsular, dois importantes componentes dos biofilmes de *Staphylococcus* spp., entre

os genes do *locus ica*, *icaA* e *icaD*, desempenham um papel chave no início do ciclo de formação de biofilme (ARCIOLA et al., 2001).

O processo de formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. que apresentam o *operon ica* ocorre pela produção de proteínas transmembranárias, homólogas às transferases de PIA, através do gene *icaA*. A presença do *icaD* irá favorecer esta produção. Os polímeros formados por estes dois genes atingem tamanhos reduzidos, sendo que novas e maiores cadeias são sintetizadas graças à presença do gene *icaC* (GERKE et al., 1998). Após esta fase, a proteína codificada pelo gene *icaB* promove a desacetilação desta molécula, formando o PIA (GÖTZ, 2002). Em caso de não ocorrer esta última etapa, as bactérias não apresentam capacidade de formar biofilme através dos genes do *locus ica*, uma vez que não irão apresentar polissacarídeos disponíveis a esta função (VUONG et al., 2004).

Além dessas quatro proteínas, o *locus ica* codifica uma proteína reguladora denominada *icaR*. O gene *icaR* é transcrito de forma divergente de *icaADBC* e é considerado um regulador negativo (CRAMTON et al., 1999; RAMOS et al., 2005).

Segundo Stanley e Lazazzera (2004) os genes do *locus ica* são regulados em resposta a fatores ambientais, tais como baixo teor de glicose, anaerobiose, falta de ferro, alta osmolaridade e temperatura, sendo estes genes considerados fundamentais para a resistência do micro-organismo a condições adversas.

Os genes do *locus ica* não são os únicos responsáveis pela capacidade de formação de biofilme e, além do que já foi descrito anteriormente, muitos estudos relatam a existência de um mecanismo *ica* independente (FITZPATRICK et al., 2005; RODE, et al., 2007; ATSHAN et al., 2013). No caso da formação de biofilme independente de PIA e do *locus ica*, proteínas adesivas provavelmente substituem o polissacarídeo, sendo que a mais importante proteína envolvida nesta formação parece ser Aap, uma proteína de 220 KD, que precisa ser proteoliticamente clivada em uma proteína menor, de 140 KD, para poder induzir a formação de biofilme (ROHDE et al., 2005).

Em estudo realizado para verificar a capacidade de formação de biofilme e a presença dos genes do *locus ica* em isolados de *S. aureus* oriundos de casos de mastite, 68,57% produziram biofilmes avaliada pelo método de aderência em microplacas de poliestireno, e todos isolados apresentaram os genes *icaA* e *icaD* (VASUDEVAN et al., 2003). Em estudo realizado na Polônia, os genes do *locus ica*

estavam presentes em todos isolados de *S. aureus* provenientes de mastite e todos foram classificados como produtores de biofilme (SZWEDA et al., 2012).

Melo et al. (2014) avaliaram *S. aureus* provenientes de mastite subclínica, isolados na cidade de São Paulo, e encontraram que 98,9% dos isolados foram produtores de biofilme em superfície de microplacas de poliestireno, e 95% dos isolados carregavam os genes *icaA* e *icaD*.

2.6 Resistência a antimicrobianos

A resistência a antimicrobianos é um problema que tem se intensificado com o passar dos anos. Há aproximadamente cinquenta anos atrás, os antimicrobianos foram introduzidos no mercado para o tratamento de doenças em humanos e animais. Entretanto, é provável que o mecanismo de resistência tenha sido desenvolvido antes do uso clínico de antimicrobianos. Os genes de resistência podem ter sido originados a partir de espécies produtoras de antimicrobianos que carregam tais genes de resistência (MATHUR e SINGH, 2005).

Os mecanismos de resistência descritos são: mudança na permeabilidade da membrana, inativação enzimática do antibiótico (β -lactamases, transferases), transporte ativo do antibiótico (sistemas de efluxo dependentes de ATP inseridos na membrana), modificação do alvo (metilação do rRNA 23S, mutação da sequência de um aminoácido) ou mudanças de rotas metabólicas (MATHUR e SINGH, 2005).

A forma mais usual de tratamento da mastite é via administração intramamária de antimicrobianos, pois se espera que o antimicrobiano atinja uma concentração no úbere maior ou semelhante à concentração inibitória mínima (CIM) para o patógeno. Porém, a CIM é definida com base em testes de suscetibilidade realizados *in vitro* e não simulam as condições encontradas *in vivo* pelo patógeno, o que pode contribuir para diminuir o efeito do tratamento (APPARAO et al., 2009).

Outro fator que pode contribuir para a baixa eficiência do tratamento com antimicrobianos é a formação das multicamadas de biofilme no úbere de vacas com mastite, pois a dose de antimicrobiano que atinge as células é subletal e induz resistência ao micro-organismo, assim, a formação de biofilme por isolados de *S. aureus* provenientes de mastite é um fator preocupante, por permitir a persistência da infecção, a contaminação do leite e a permanência no ambiente da indústria (MELCHIOR et al., 2009).

A pressão seletiva imposta pelo uso de agentes antimicrobianos desempenha um papel chave no aumento da resistência microbiana. Sempre que uma população microbiana mista é exposta a agentes antimicrobianos, é suposto que existam bactérias resistentes à respectiva droga e a concentração aplicada. Sob pressão seletiva, o número desses micro-organismos vai aumentar e alguns podem passar seus genes de resistência a outros membros da população pela transferência horizontal de genes, conferindo uma vantagem seletiva e evolutiva ao micro-organismo receptor, como já citado para os genes das enterotoxinas (FERREIRA, 2001; YARWOOD et al., 2002; MATHUR e SINGH, 2005).

A resistência a β -lactâmicos é reportada na literatura como a principal e de maior importância e, em trabalhos com isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite, foram observadas taxas elevadas de resistência a penicilina (SHI et al., 2010; KALMUS et al., 2011; JAGIELSKI et al., 2014).

Já a multirresistência também tem emergido e, recentemente, Wang et al. (2014), encontraram 69% dos isolados provenientes de mastite bovina resistentes a mais de 10 antimicrobianos utilizados no tratamento da doença.

O crescente número de isolados multirresistentes provenientes de casos de mastite em todo o mundo é um grave problema que provoca aumento nos custos de tratamento e maior possibilidade de transmissão da doença dentro dos rebanhos devido à persistência da bactéria (SABOUR et al., 2004; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

A emergência da resistência aos antimicrobianos e a dificuldade na identificação de novas classes de agentes antimicrobianos tem impulsionado a investigação de novas estratégias terapêuticas, como o uso de moléculas capazes de silenciar genes de virulência e terapia gênica em infecções. A interferência na regulação dos fatores de virulência, como no locus *agr*, também parece ser uma abordagem promissora (COSTERTON et al., 2009).

2.7 Grupos *agr*

O sistema de regulação de genes de virulência mais conhecido e estudado em *S. aureus* é o *accessory gene regulator (agr)*, o qual é responsável por regular hemolisinas, enterotoxinas, enzimas e proteínas de superfície (BOYEN et al., 2009).

S. aureus é conhecido por causar doenças em humanos e animais, e colonizar diferentes locais do hospedeiro e, para que isso ocorra o micro-organismo utiliza um sistema de detecção de *quorum sensing* que, por meio de comunicação célula-a-célula, controla a regulação de vários fatores de virulência. Este sistema, conhecido como locus *agr* secreta um peptídeo auto indutor (AIP) de maneira dependente da densidade celular, e permite que uma população bacteriana possa responder em conjunto, quando a densidade celular crítica é atingida (CAFISO et al., 2007).

O locus *agr* consiste em quatro genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), é ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a fase estacionária (VUONG et al., 2000). São conhecidos quatro distintos grupos *agr*: I, II, III e IV, todos determinados pelo polimorfismo da sequência de aminoácido de *AgrD* e *AgrC* (SHOPSIN et al., 2003).

O locus *agr* é composto por dois *operons* divergentes, controlados pelos promotores P2 e P3. O *operon* P2 contém quatro genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. O *operon* P3 contém apenas o gene da δ –hemolisina (*hld*) e o gene para um RNA mensageiro denominado RNA III, efector do sistema *agr*. Os produtos dos genes *agrB* e *agrD*, respectivamente as proteínas AgrB e AgrD, se juntam formando o AIP. AgrC é uma proteína transmembranária receptora do AIP. Quando AIP liga-se à AgrC, este fosforila a proteína AgrA, ativando-a. A proteína AgrA age como indutor dos promotores P2 e P3. O produto da transcrição do *operon* P3 é um RNA denominado RNA III, um mRNA que funciona como indutor ou repressor da transcrição de genes acessórios. Este mRNA nunca chega a ser traduzido a proteína, pois ele mesmo é o efector à resposta do *agr* (YARWOOD & SCHLIEVERT, 2003).

Na literatura são relatadas variações no locus *agr*, e sobreposição de grupos *agr*, o que normalmente ocorre por mutação ou/e inserção de um fragmento em uma região intergênica, geralmente entre *agrD* e *agrC* (CAFISO et al., 2007; SONG et al., 2015).

Atualmente existem dados divergentes e não há consenso sobre a regulação dos fatores de virulência pelos diferentes grupos *agr*, e estudos demonstram que o locus *agr* é sensível aos sinais ambientais (STER et al., 2005).

Montanaro et al. (2010) verificaram que diferentes grupos *agr* exibiram padrões distintos de virulência. Takeuchi et al. (2001) verificaram a presença predominante de *agr* I e de *agr* III entre isolados provenientes de mastite.

Estudos relacionam isolados de *S. aureus* com diversos fatores de virulência, por exemplo, a prevalência do grupo *agr* I entre isolados de mastite, a resistência a antimicrobianos com o grupo *agr* II e *agr* III, a formação de biofilme ao grupo *agr* I e III, o grupo *agr* IV parece estar relacionado com isolados produtores de esfoliatina envolvidas na síndrome da pele escaldada. (JARRAUD et al., 2000; SAKOULAS et al., 2003; MOISE-BRODER et al., 2004; VAUTOR et al., 2006).

Vautor et al. (2006) encontraram que 80% dos isolados oriundos de mastite, pertenciam ao grupo *agr* III, e apresentavam elevada capacidade de formação de biofilme.

Jarraud et al. (2002) relatam que cepas dos grupos *agr* I e II causam, preferencialmente, doenças mediadas por enterotoxinas, como a intoxicação alimentar. Segundo Song et al. (2015) a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas é maior em isolados pertencentes a *agr* II e *agr* IV, do que naqueles que pertencem aos grupos *agr* I e *agr* III.

Já o grupo *agr* I está, frequentemente, envolvido com a formação de biofilme e com resistência a antimicrobianos (BUZZOLA et al., 2007; BARDIAU et al., 2014). Cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos, classificadas dentro do grupo *agr* I, apresentaram capacidade significativamente aumentada para persistir na glândula mamária e internalizam *in vitro* em células epiteliais mais facilmente que outros grupos *agr* (BUZZOLA et al., 2007; MELCHIOR et al., 2009).

Manuscrito formatado de acordo com as normas do periódico *Journal of Dairy Science* o qual será submetido para publicação

3 Artigo

Enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme e resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

Resumo

A mastite bovina é um grave problema para o rebanho leiteiro em todo o mundo, sendo *S. aureus* o principal micro-organismo causador da doença. Além disso, esse micro-organismo é um importante causador de doenças transmitidas por alimentos (DTA). O objetivo deste estudo foi avaliar a identidade de 31 isolados de Estafilococos coagulase positiva (ECP) provenientes de mastite bovina, através de análises fenotípicas e moleculares, além de verificar o seu potencial enterotoxigênico, a capacidade de formação de biofilme, a resistência a antimicrobianos e a sua classificação nos grupos *agr*. Para avaliação do perfil de enterotoxigenicidade, avaliou-se a presença dos genes das enterotoxinas clássicas (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *eee*) utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), para verificação da capacidade de produção de biofilmes, avaliou-se a capacidade de aderência em microplacas de poliestireno, bem como a presença dos genes *icaA* e *icaD*, por PCR. A resistência a antimicrobianos foi testada de acordo com as normas do CLSI (2012). Para a classificação nos grupos *agr* utilizou-se uma bplex-PCR. Todos os isolados pertenciam à espécie *S. aureus*. Foi observada resistência a um ou mais antimicrobianos em 93% dos isolados, sendo que 54% foram multirresistentes. Com relação à formação de biofilme, verificou-se que 45% dos isolados aderiram ao poliestireno, sendo que a presença do gene *icaA*, foi observada em 71% e do gene *icaD*, em 74% dos isolados. Houve prevalência do gene da enterotoxina A (13%), seguido pelos genes das enterotoxinas C com 6,4% e B com 3,2%. Não houve presença do gene da enterotoxina D e E. Quanto a classificação nos grupos *agr*, foram prevalentes *agr* III e I (32,2% e 22,5%, respectivamente), porém, houve sobreposição destes grupos em dois isolados. *S. aureus* foi a única espécie encontrada entre os ECP provenientes de mastite, de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, Brasil. Além disso, 22,6% dos isolados apresentam genes de enterotoxinas e 45% têm capacidade de aderir a superfície de poliestireno, podendo persistir em ambientes da ordenha e da indústria de alimentos, e contaminar o leite, tornando-se um risco à saúde do consumidor. Apresentam resistência à maioria dos antimicrobianos testados, e pertencem a distintos grupos *agr*, sendo que os grupos mais prevalentes são os que normalmente regulam a resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme, fatores preocupantes para o tratamento da mastite.

Palavras chaves: enterotoxinas clássicas, *locus agr*, formação de biofilme, *locus ica*

Introdução

Entre as espécies de ECP, as que têm maior ocorrência na mastite bovina são *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. aureus*, sendo esta última, a de maior importância, pela elevada prevalência e virulência. A identificação do agente causador é de grande importância para o tratamento da doença (ZAFALON et al., 2009).

Staphylococcus aureus um dos principais agentes causadores de mastite clínica e subclínica em bovinos leiteiros. A mastite é caracterizada como uma inflamação da glândula mamária que acomete os animais durante a lactação, ocasionando perdas na produção em rebanhos leiteiros em todo o mundo (Schlegelová et al., 2003; Melchior et al., 2011). Além disso, pode ocasionar a contaminação do leite pelo micro-organismo, influenciando na sua qualidade e segurança, sendo *S. aureus* um dos principais agentes causadores de DTA no mundo inteiro (Silva, et al. 2013).

A capacidade de formação de biofilme por isolados de *S. aureus* provenientes de mastite é um fator preocupante, pois quando o micro-organismo forma biofilme no interior da glândula mamária facilita a persistência das infecções (Melchior et al., 2009). Além disso, a formação de biofilmes em superfícies e equipamentos utilizados na indústria, também permite que essa bactéria se mantenha no ambiente e contamine o produto final, constituindo um problema para os consumidores (Simões et al., 2010).

O operon *ica* é um dos responsáveis pela produção de biofilme em *S. aureus*, e é formado por quatro genes (*icaADBC*) sendo os genes *icaA* e *icaD*, os mais relatados e importantes na formação de biofilmes (Götz, 2002; Vasudevan et al., 2003).

Muitos isolados de *S. aureus* produzem enterotoxinas, denominadas enterotoxinas estafilocócicas (EEs), as quais podem ser secretadas no leite e são termorresistentes, preservando sua atividade biológica, mesmo após a pasteurização ou ultrapasteurização, fato este que explica o envolvimento de *S. aureus* com DTA (Asoa et al., 2003).

Atualmente, são conhecidos 22 tipos de EEs, sendo as enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) responsáveis por 95% dos surtos de intoxicação alimentar, tendo como principais alimentos envolvidos o leite e seus derivados (Chapaval et al., 2006; Argudin et al., 2010; Cretenet et al., 2011).

O sistema de regulação de genes de virulência mais conhecido e estudado em *S. aureus* é o *accessory gene regulator (agr)*, responsável por regular a expressão da maioria dos genes de virulência que codificam hemolisinas, enterotoxinas, enzimas, proteínas de superfície, bem como resistência a antimicrobianos (Boyen et al., 2009). Segundo a literatura, isolados classificados em diferentes grupos *agr*, exibem padrões distintos de virulência e através da identificação dos grupos *agr* pode-se supor uma relação entre os isolados e os fatores de virulência que serão expressos (Shopsin et al., 2003; Costerton et al., 2009; Montanaro et al., 2010).

A emergência de resistência a múltiplos antimicrobianos em isolados de *S. aureus* provenientes de leite bovino tem sido relatada em muitos países (Holmes e Zadoks, 2011; Haran et al., 2012; Kreausukon et al., 2012; Wang et al., 2014). Essa resistência pode estar relacionada ao uso abusivo de antimicrobianos em animais destinados a produção de leite, sendo um fator que facilita a permanência da doença e, conseqüentemente, do micro-organismo na glândula mamária, contaminando o leite (Melchior et al., 2009).

Em vista do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a identidade de 31 isolados de *Estafilococos* coagulase positiva provenientes de mastite bovina clínica e subclínica de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, Brasil, através de análises fenotípicas e moleculares, além de verificar o potencial enterotoxigênico, a capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e sua classificação nos grupos *agr*.

Material e métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram utilizados 31 isolados de *Estafilococos* coagulase positiva oriundos de mastite clínica e subclínica, provenientes de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS e pelo Programa de Desenvolvimento da Bovinocultura Leiteira da Metade Sul do Rio Grande do Sul (UFPEL), Pelotas, RS.

Identificação fenotípica

Os isolados foram submetidos a testes fenotípicos de triagem que incluíram capacidade de produção de termonuclease e de acetoína, além de resistência a acriflavina. A capacidade de produção de acetoína foi avaliada conforme protocolo descrito pela APHA (2002). A produção de termonuclease foi realizada conforme protocolo descrito por Harley e Prescott (1996), e a resistência a acriflavina foi verificada com o cultivo em ágar Baird Parker suplementado com acriflavina ($7\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ - Sigma Aldrich®), segundo Chapin e Murray (1999).

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído conforme protocolo recomendado por Matthews et al. (1997), com modificações. Primeiramente, transferiram-se alçadas carregadas com cultura de 24 horas proveniente de agar triptona de soja (TSA, Acumedia®) para 100 μL de solução TE-A (10mM hidroximetil aminoetano - TRIS e 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) até turbidez 1,0 da escala de MacFarland. A lise do peptidoglicano celular ocorreu pela adição de 100 μL de lisostafina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma Aldrich®) e incubação a 37°C por 45 minutos. Para completar a lise celular adicionou-se, em sequência, 20 μL de solução TE-B (50mM hidroximetil aminoetano - TRIS e 20 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) contendo 20% de SDS (Dodecil sulfato de sódio, Invitrogen®), e 3 μL de proteinase K (Invitrogen®), seguido de incubação a 37°C por uma hora. Adicionou-se, então, 200 μL de solução NaCl 5 M (Cloreto de Sódio, Synth®) e agitou-se, manualmente, por 15 segundos. Separou-se o material intracelular através de centrifugação (10.000 x g, 4 °C por 15 min). Após, adicionou-se, fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), sendo 1:1 em relação ao volume da fase aquosa, para liberação e separação de proteínas, cuja etapa foi completada através de centrifugação (16.000 x g, 4°C 15 min). A precipitação do DNA foi realizada com 2 volumes de álcool etílico absoluto gelado e manutenção a -20 °C por 18 horas. Passado este período, foi realizada nova centrifugação (16.000 x g, 4°C por 10 min). Para aumentar a pureza do material extraído, lavou-se o *pellet* duas vezes com álcool etílico 70% e secou-se em capela de fluxo laminar, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 30 μL de água ultrapura esterilizada e, após a adição de 2 μL de

RNAse (Invitrogen®), foi incubado a 37°C por 1 hora. O DNA foi mantido em congelador a -20°C e quantificado com auxílio de um espectrofotômetro Eppendorf BioSpectrometer kinetic® (Eppendorf).

Identificação molecular

Para identificação genotípica foi utilizado multiplex PCR (mPCR), com quatro pares de *primers*, tendo-se como alvo o gene 16S do rRNA para identificação do gênero e o gene *nuc*, que codifica a termonuclease, para determinação de cada espécie de ECP (*S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*). Os *primers* utilizados estão apresentados na Tabela 1. Como controle positivo da reação, foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *S. intermedius* ATCC 29663 e *S. hyicus* ATCC 11249. Como controle negativo para avaliação da espécie bacteriana, utilizaram-se cepas padrão de *S. xylosus* (ATCC 29971), *S. sciuri* (ATCC 29061), *S. lugdunensis* (ATCC 49576), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. capitis* (ATCC 35661), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. simulans* (ATCC 27851) e, como controle negativo para o gênero, *Escherichia coli* ATCC 11229.

Tabela 1. *Primers* utilizados para identificação molecular de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	pb	Alvo	Referência
NUC1	ATGAAGTCAAATAAATCGCT	458	<i>S. aureus</i>	Baron et al. (2004)
NUC2	TTTGGTGAAAAATACTTCTC			
NUC5	GAAAAAATTACAACAGGCG	106	<i>S. intermedius</i>	Gandra et al. (2011)
NUC6	CACATCCGTTGAAGACTTTT			
NUC7	TAAGACACCGATAAAAGCCC	740	<i>S. hyicus</i>	Bastos (2008)
NUC8	TTGTTTTTGCTTGTCTATAC			
16S1	GGACGGGTGAGTAACACGTGG	252	Gênero	Baron et al.
16S2	TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT		<i>Staphylococcus</i> spp.	(2004)

A solução da reação foi preparada contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 10 pmol de cada *primer* para o gene da

termonuclease e 1 pmol para o gene 16S rRNA, 2 µL de DNA (50ng), e 2,5 µL de água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. A mistura foi submetida a 94°C por 4 min, para a desnaturação inicial do DNA e, posteriormente, amplificada por 32 ciclos, onde cada ciclo consistia de desnaturação por 2 min a 95°C, anelamento dos *primers* por 2 min a 52,7°C, síntese da cadeia complementar (extensão) por 2 min a 72°C e, por fim, extensão final por 7 min a 72°C. A mistura foi amplificada em um termociclador MJ Research PTC 100.

Os produtos gerados na mPCR foram submetidos a eletroforese a 80V por 70 min em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (solução de Tris, ácido bórico e EDTA) 0,5X, utilizando-se o marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen®). O produto amplificado foi corado com GelRed™ e visualizado sob luz UV em transiluminador (Loccus®, L-Pix Touch).

Avaliação da capacidade de produção de biofilme

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada segundo o protocolo proposto por Stepanovic et al. (2007), utilizando-se placas de microtitulação de poliestireno de 96 cavidades. Os isolados foram padronizados na escala 0,5 de MacFarland, e 20µL de cada inóculo foi transferido para três cavidades da microplaca contendo 180µL de TSB 1% glicose para crescimento a 37°C por 24h. Em seguida, cada cavidade foi lavada três vezes com 260µL de tampão PBS para a retirada das células não aderidas, seguido de fixação com metanol. Após a secagem, 150µL de cristal violeta foram adicionados em cada cavidade. As microplacas foram, então, lavadas com água e secas em estufa. Em seguida, 150µL de etanol 95% foram adicionados por 30 min e a densidade óptica (DO) de cada amostra foi mensurada a 595nm, por espectrofotometria, utilizando leitor de microplacas ELISA plate analyser (Robonick®, readwell PLATE). Como controle negativo foi utilizado caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia®) e, como controles positivos, *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 6538.

Deteção de genes relacionados à virulência

As reações de PCR utilizadas para a detecção dos genes das enterotoxinas clássicas (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *eee*) e dos genes relacionados com a formação de

biofilme (*icaA* e *icaD*) foram realizadas utilizando os *primers*, programas e referências descritos na Tabela 2.

A solução da reação de PCR foi preparada contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 1 µL de cada *primer* na concentração de 10pmol, com exceção do *primer* para o gene *eec*, onde se utilizou 50pmol, 2 µL de DNA (50 ng) e 8,5 µL de água ultrapura (Promega Corp.) para completar o volume final de 25 µL.

Os controles positivos utilizados nas reações para os genes das enterotoxinas clássicas foram as cepas *S. aureus* FRI S6 (*eea* e *eeb*), ATCC 19095 (*eec*), FRI 361 (*eed*) e FRI 326 (*eee*). Para os genes *ica* foi utilizado como controle positivo *S. aureus* ATCC 25923 e, como controle negativo, *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados para a detecção dos grupos *agr* e de genes relacionados à virulência de *S. aureus*

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Pb	Programa	Referência
<i>Pan-agr</i>	R:ATGCACATGGTGCACATGC			
<i>agr</i> I	F:GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	440	P1	Shopsin et al. (2003)
<i>agr</i> II	F:GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572	P1	
<i>agr</i> III	F:CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC	406	P2	
<i>agr</i> IV	F:CGATAATGCCGTAATACCCG	588	P2	
<i>eea</i>	F: ACGATCAATTTTACAGC	544	P3	Rosec e Gigaud (2002)
	R: TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC			
<i>eeb</i>	F:ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGGA	404	P3	Jarraud et al. (2002)
	R: ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT			
<i>eec</i>	F: GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	P4	Rosec e Gigaud (2002)
	R: AAATCGGATTAACATTATCCA			
<i>eed</i>	F: CAAATATATTGATATAATGA	330	P3	Zocche et al. (2009)
	R: AGTAAAAAAGAGTAATGCAA			
<i>eee</i>	F:CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482	P5	Jarraud et al. (2002)
	R: CACCTTACCGCCAAAGCTG			
<i>ica</i> A	F: CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315	P6	Vasudevan et al. (2003)
	R: AAGATATAGCGATAAGTGC			
<i>ica</i> D	F: AAACGTAAGAGAGGTGG	381	P6	
	R: GGCAATATGATCAAGATAC			

P1=95°C por 5 min 30 X (1 min a 95°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C) 3 min a 72°C; **P2**=95°C por 5 min 30 X (1 min a 95°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C) 3 min a 72°C; **P3**=95°C por 5 min 37 X (1 min a 95°C, 1 min a 44,5°C, 1 min a 72°C) 10 min a 72°C; **P4**= 95°C por 5 min 35 X (45 seg a 95°C, 45 seg a 46,2°C, 45 seg a 72°C) 10 min a 72°C; **P5**=95°C por 5 min 37 X

(45 seg a 95°C, 45 seg a 51°C, 45 seg a 72°C) 10 min a 72°C; **P6**= 30 X (92°C por 45 seg, 49°C por 45 seg e 72°C por 1 min).

Avaliação da resistência a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos ao teste de resistência a antimicrobianos, utilizando-se o método de difusão em ágar, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Foram testados os antimicrobianos ampicilina 10 µg (AMP), cefalotina 30 µg (CEF), cefoxitina 30 µg (CFO), ceftiofur 30 µg (CTF), clindamicina 2 µg (CLI), enrofloxacin 5 µg (ENO), eritromicina 15 µg (ERI), estreptomicina 10 µg (EST), oxacilina 1 µg (OXA), penicilina G 10U (PEN), sulfazotrim 25 µg (SUT), sulfonamida 300 µg (SUL), teicoplanina 15 µg (TEC), tetraciclina 30 µg (TET) e tobramicina 10 µg (TOB) adquiridos da empresa Laborclin®. Para a leitura, interpretação dos resultados, assim como o uso do controle positivo *S. aureus* ATCC 25923 seguiram-se os padrões do CLSI (2012).

Deteção de grupos *agr*

Para a determinação dos grupos *agr* foi utilizada uma bplex PCR, utilizando-se, na mesma reação, *primers* para *agr* I e *agr* II e *pan-agr*, em outra reação, *primers* para os grupos *agr* III e *agr* IV e *pan-agr*, na concentração de 20 pmol. Os *primers*, assim como os programas utilizados, estão apresentados na Tabela 2. A solução da reação foi preparada contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 2 µL de cada *primer*, 2 µL de DNA (50 ng) e 6,5 µL de água ultrapura (Promega Corp.), para completar o volume final de 25 µL. Como controle positivo, foram utilizadas cepas padrão de *S. aureus* (RN 6390B, USA 100, ATCC 25923 e RN 4850 - *agr* I, *agr* II, *agr* III e *agr* IV, respectivamente).

Sequenciamento de DNA

Os produtos da PCR obtidos com os *primers* dos grupos *agr* I e III de dois isolados foram purificados e sequenciados para validar suas identidades. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Illustra GFX kit de purificação PCR DNA e Gel Band (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante, e sequenciados na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de

Pesquisa Experimental, CPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS), usando o sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer com 50 centímetros capilares e polímero POP7 (Applied Biosystems).

Resultados

Identificação fenotípica e genotípica dos isolados de ECP

Todos os isolados foram resistentes a acriflavina, entretanto, seis isolados (19%) não produziram termonuclease e dois (6,5%) não produziram acetoina.

Através da mPCR, confirmou-se que todos os isolados pertenciam a espécie *S. aureus*, tendo em vista que houve amplificação do fragmento de 252 pb referente ao gene 16S do rRNA e do fragmento de 458 pb, produzido pelo conjunto de *primers* *nuc* 1 e 2, específico para esse micro-organismo. Os isolados foram codificados como SA (*S. aureus*) e numerados de 1 a 31. Os resultados da mPCR podem ser visualizados nas Figuras 1, 2 e 5. Os resultados obtidos na uniplex PCR podem ser visualizados na Figura 3 (gene *nuc*) e Figura 4 (16S rRNA).

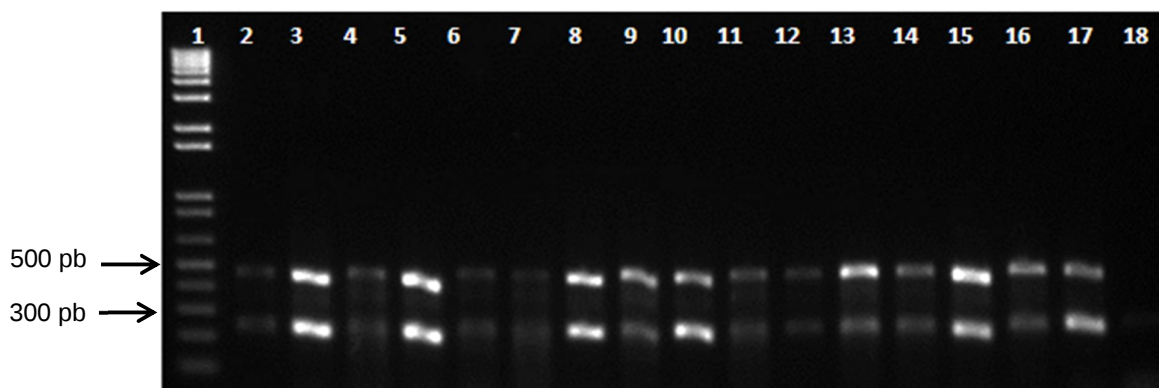


Figura 1 - Produtos da amplificação dos genes *nuc* 1 e 2 (458 pb) e 16S rRNA (252 pb)
Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 16: *S. aureus* isolados de mastite bovina,
Coluna 17: *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 18: Controle da reação água ultrapura.

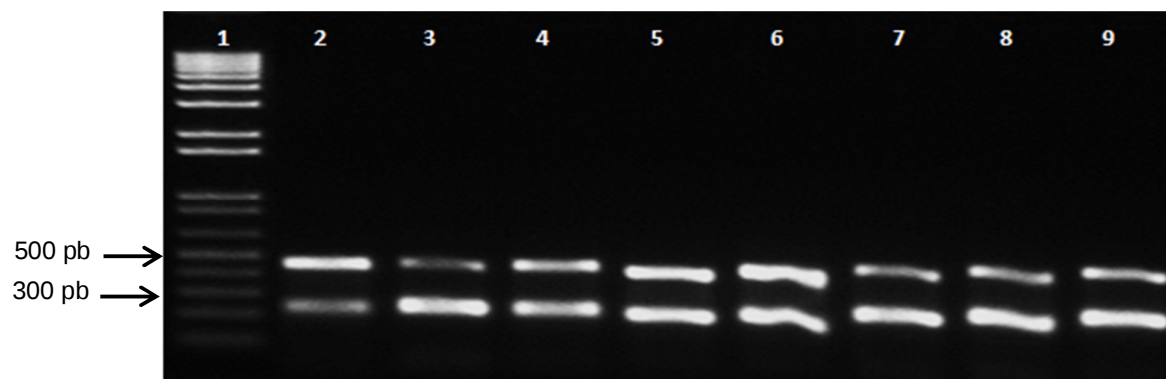


Figura 2 - Produtos da amplificação dos genes *nuc 1* e 2 (458 pb) e 16S rRNA (252 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 9: *S. aureus* isolados de mastite bovina

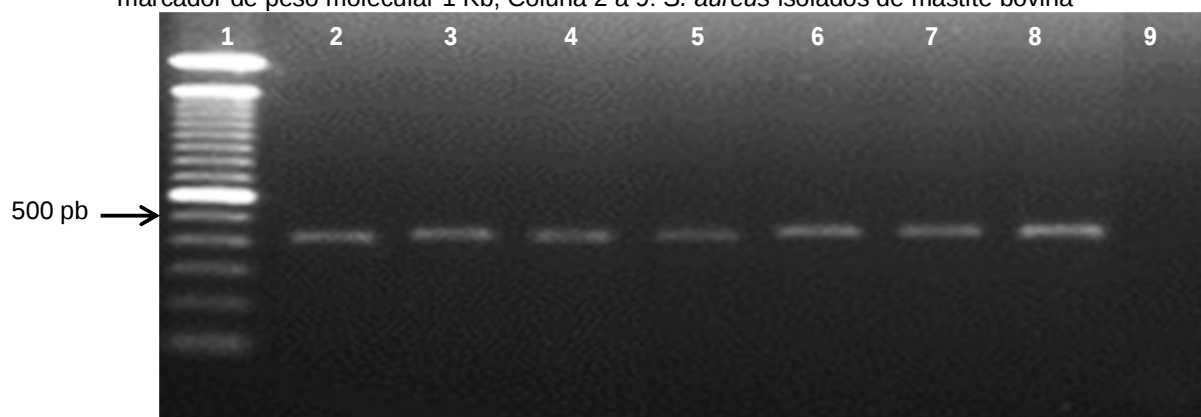


Figura 3 - Produtos da amplificação dos genes *nuc 1* e 2 (458 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 100 pb; Coluna 2 a 8: *S. aureus* isolados de mastite bovina; Coluna 9: Controle da reação água ultrapura

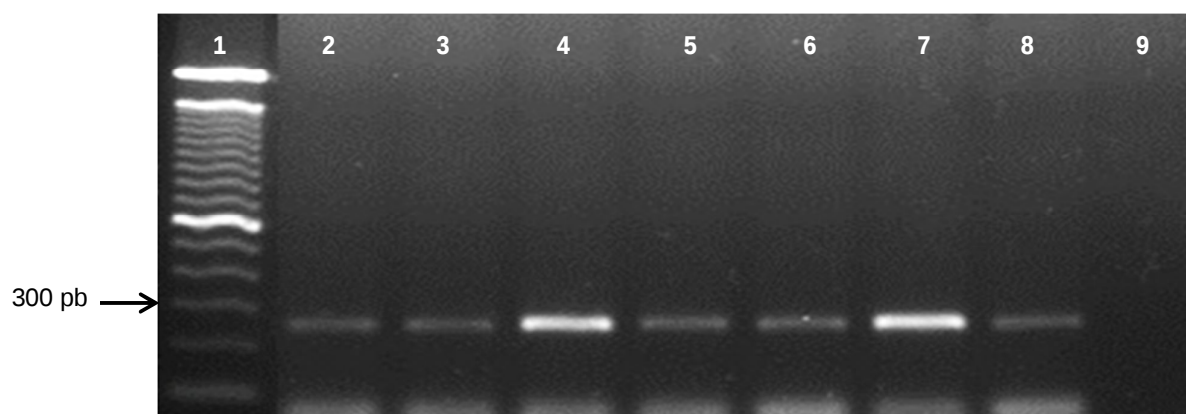


Figura 4 - Produtos da amplificação do gene 16S rRNA (252 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 100 pb; Coluna 2 a 8: *S. aureus* isolados de mastite bovina; Coluna 9: Controle da reação água ultrapura

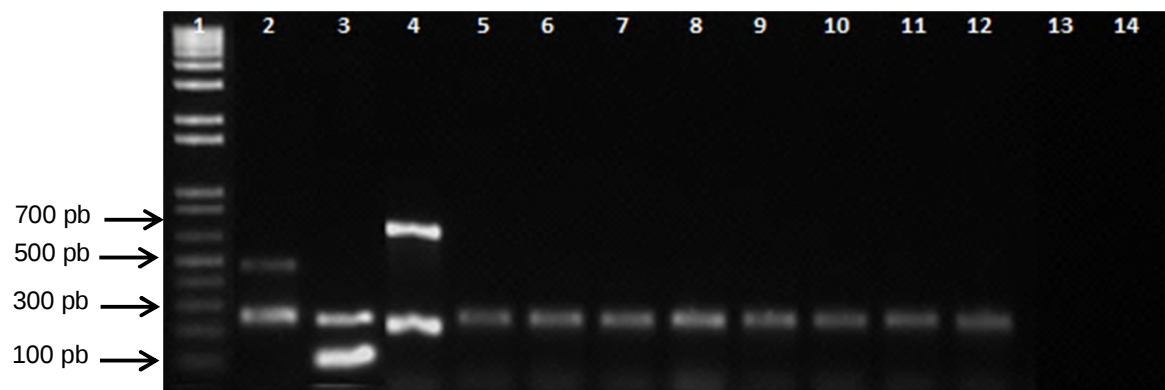


Figura 5 - Produtos da amplificação dos genes *nuc* 1 e 2 (458 pb), *nuc* 5 e 6 (106 pb), *nuc* 7 e 8 (740pb) e 16S rRNA (252 pb) Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2: *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 3: *S. hyicus* ATCC 11249, Coluna 4: *S. intermedius* ATCC 29663 Coluna 5: *S. xylosus* ATCC 29971, Coluna 6: *S. sciuri* ATCC 29061, Coluna 7: *S. lugdunensis* ATCC 49576, Coluna 8: *S. epidermidis* ATCC 12228, Coluna 9: *S. haemolyticus* ATCC 29970, Coluna 10: *S. capitis* ATCC 35661, Coluna 11: *S. saprophyticus* ATCC 15305, Coluna 12: *S. simulans* ATCC 27851 Coluna 13: Controle negativo *Escherichia coli* ATCC 11229 Coluna 14: Controle da reação água ultrapura.

Avaliação da capacidade de produção de biofilme

Observou-se que 45% dos isolados formavam biofilme. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na capacidade de produção de biofilme, avaliada pela aderência em microplacas de poliestireno, entre os isolados de *S. aureus*, conforme ilustrado na Figura 6. Através do teste de Tukey, pode-se observar que o isolado 9 (SA9) diferiu significativamente dos demais isolados na capacidade de produção de biofilme, apresentando DO maior em comparação aos demais isolados.

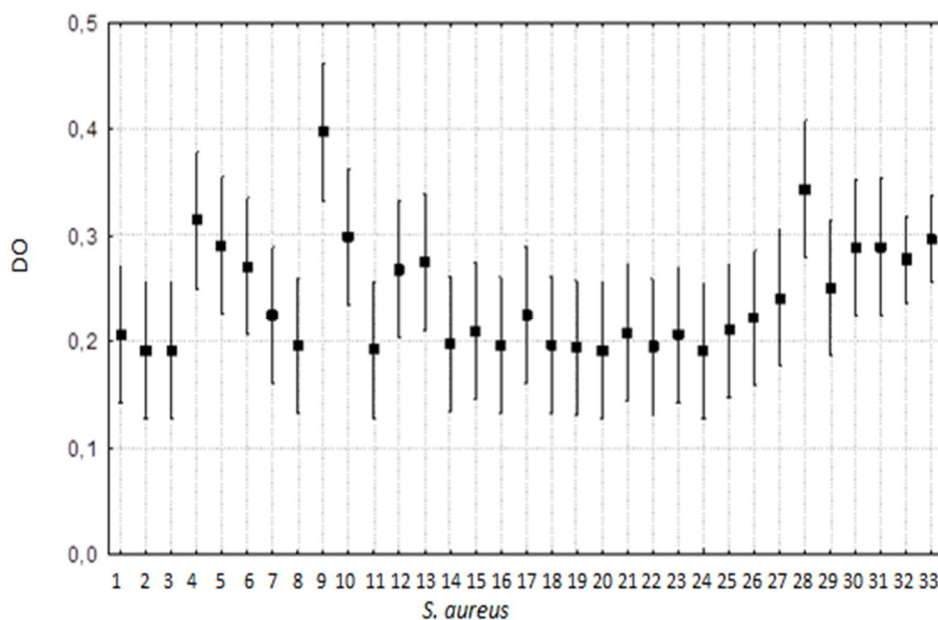


Figura 6 - Média de DO de isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina, obtidas na avaliação da capacidade de formação de biofilme. *S. aureus* isolados de mastite apresentados de 1 a 31 e controles positivos *S. aureus* ATCC 25923 (32) e ATCC 6538 (33).

Detecção de genes relacionados a virulência

Dentre os 31 isolados, 71% carregavam o gene *icaA* e 74%, o gene *icaD*. A presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD*, foi observada em 67% dos isolados. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 7 e 8 para o gene *icaA*, 9 e 10 para o gene *icaD*. Com relação aos genes das enterotoxinas clássicas, observou-se a prevalência do gene da enterotoxina A (13%), seguido pelo gene da enterotoxina C com 6,4% e B com 3,2%. Não houve presença do gene da enterotoxina D e E. O total de isolados que carregavam genes das enterotoxinas clássicas A, B e C é de 22,6%. Os resultados para os genes das enterotoxinas clássicas podem ser visualizados nas Figuras 11 a 22.

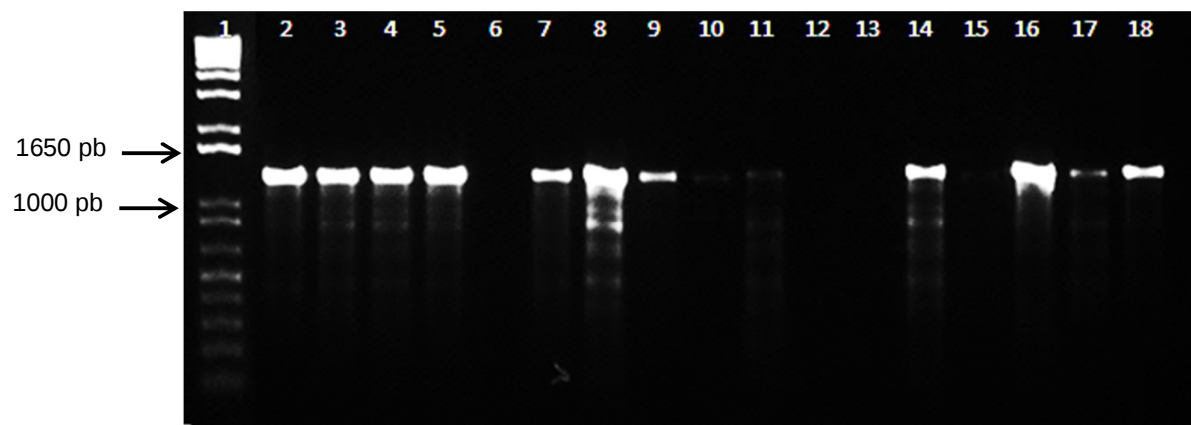


Figura 7 - Produtos da amplificação do gene *ica A* (1315pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 18: *S. aureus* isolados de mastite bovina.

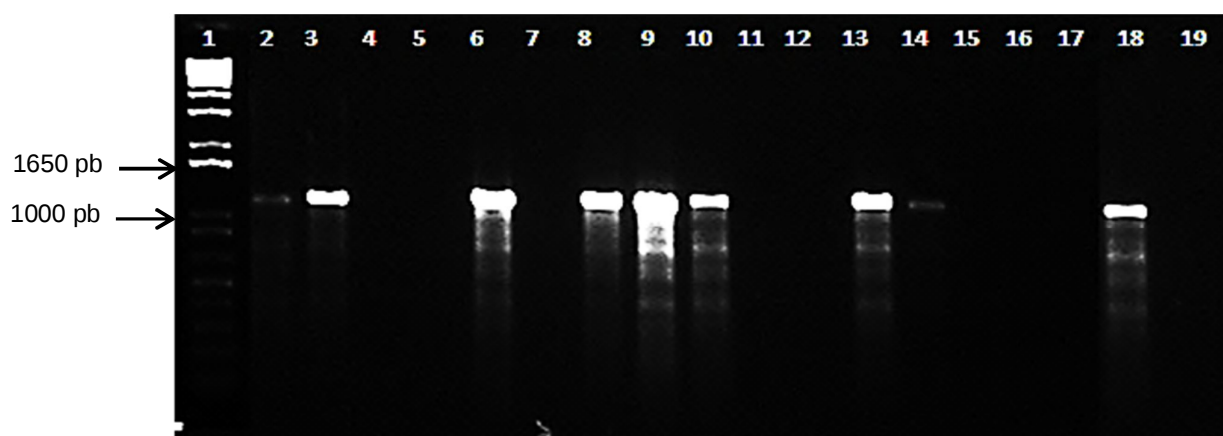


Figura 8 - Produtos da amplificação do gene *ica A* (1315pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 17: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 18: Controle positivo *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 19: Controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228

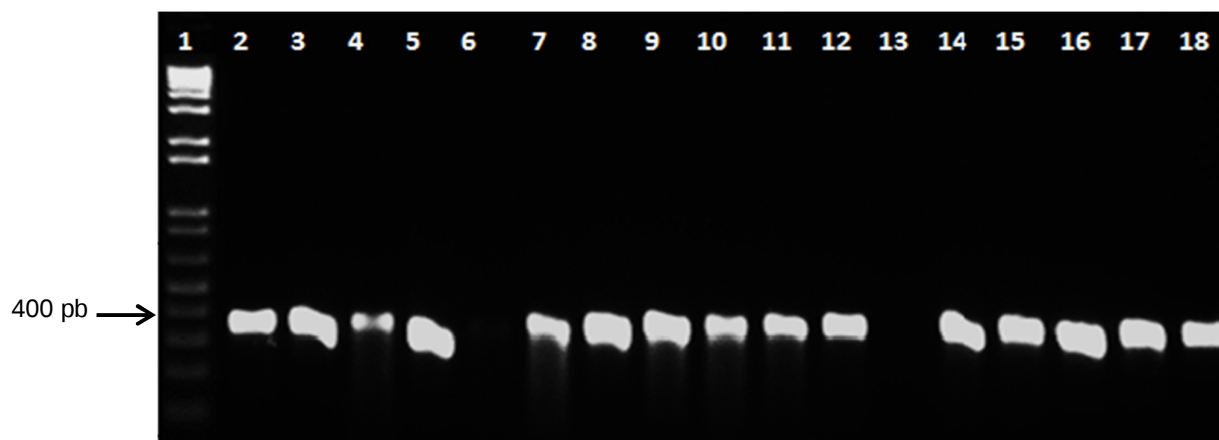


Figura 9 - Produtos da amplificação do gene *ica D* (381pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 18: *S. aureus* isolados de mastite bovina.

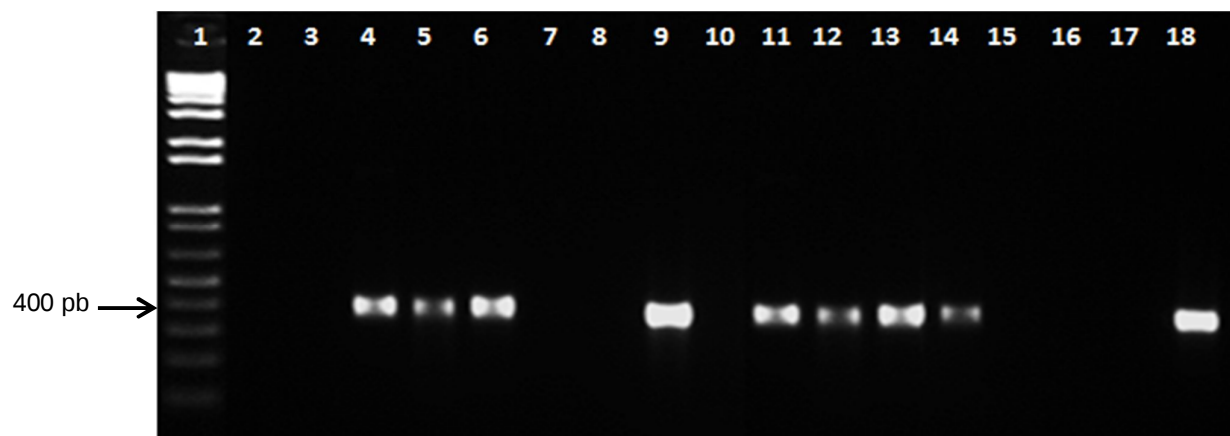


Figura 10 - Produtos da amplificação do gene *ica D* (381pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2: Controle da reação água ultra pura, Coluna 3: Controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228. Coluna 4: Controle positivo *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 5 a 18: *S. aureus* isolados de mastite bovina.

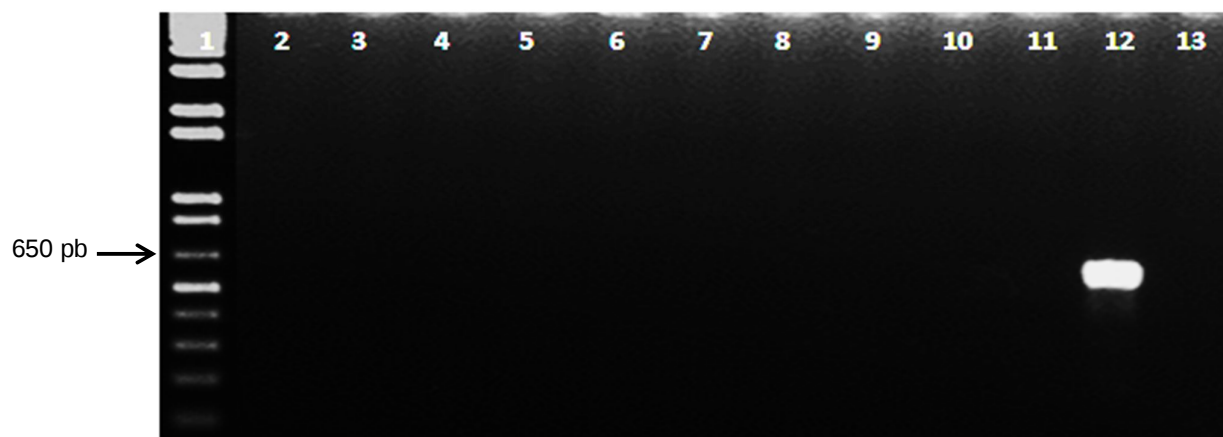


Figura 11 - Produtos da amplificação do gene *eea* (544pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 11: *S. aureus* isolados de mastite bovina Coluna 12: Controle positivo *S. aureus* FRI S6. Coluna 13: Controle da reação água ultrapura.

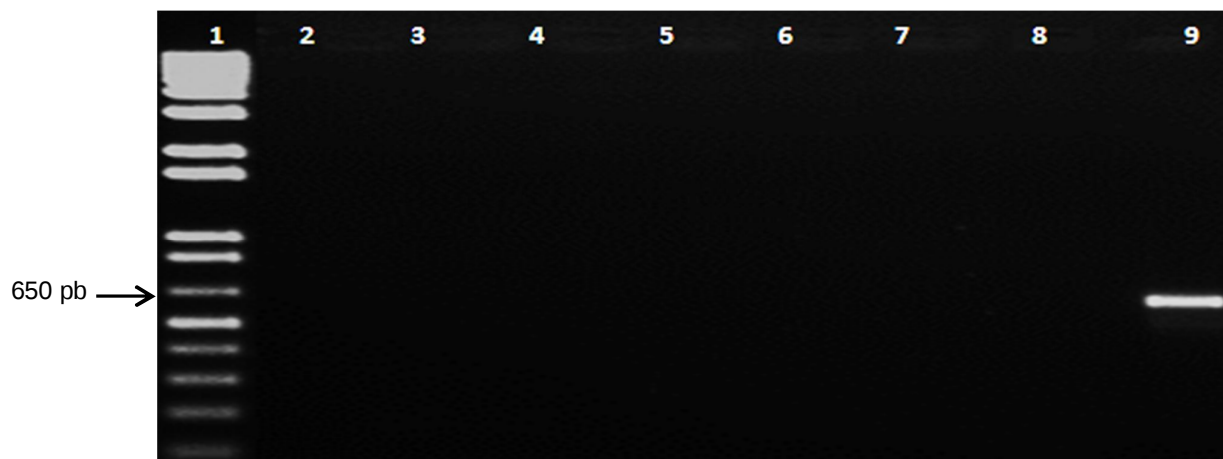


Figura 12 - Produtos da amplificação do gene *eea* (544pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 9: *S. aureus* isolados de mastite bovina.

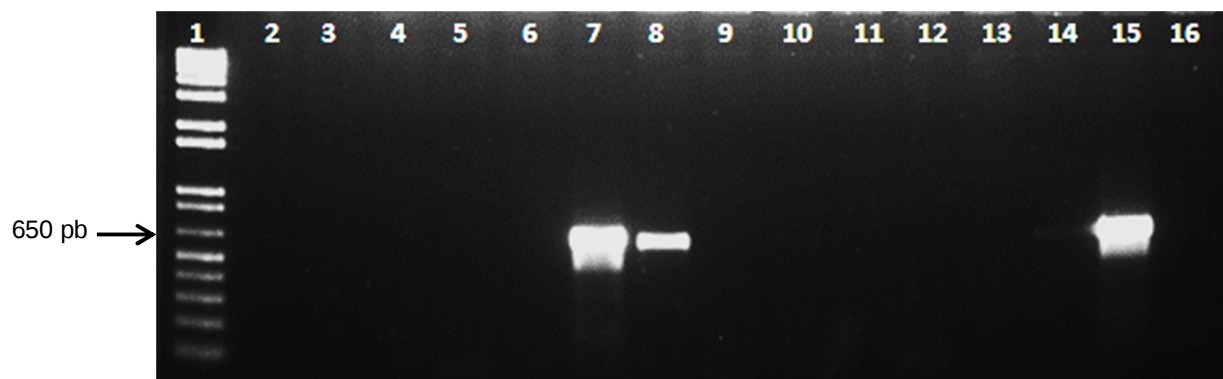


Figura 13 - Produtos da amplificação do gene *eea* (544pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb; Coluna 2 a 14: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 15: Controle positivo *S. aureus* FRI S6. Coluna 13: Controle da reação água ultrapura.



Figura 14 - Produtos da amplificação do gene *eeb* (404pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: *S. aureus* isolados de mastite bovina Coluna 17: Controle positivo *S. aureus* FRI S6, Coluna 18: Controle da reação água ultrapura



Figura 15 - Produtos da amplificação do gene *eeb* (404pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2: Controle da reação água ultrapura, Coluna 3 a 18: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 19: Controle positivo *S. aureus* FRI S6.

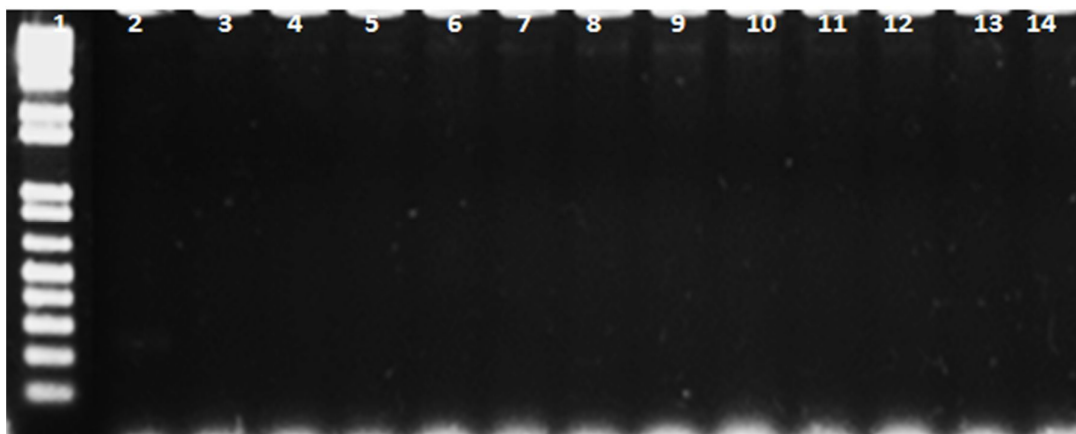


Figura 16 - Produtos da amplificação do gene *eec* (257pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 14: *S. aureus* isolados de mastite bovina.



Figura 17 - Produtos da amplificação do gene *eec* (257pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 13: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 14: *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 15: Controle da reação água ultrapura.



Figura 18 - Produtos da amplificação do gene *eec* (257pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 7: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 8: *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 9: Controle da reação água ultrapura.



Figura 19 - Produtos da amplificação do gene *eed* (330pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 17: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 18: *S. aureus* FRI 361, Coluna 19: Controle da reação água ultrapura.

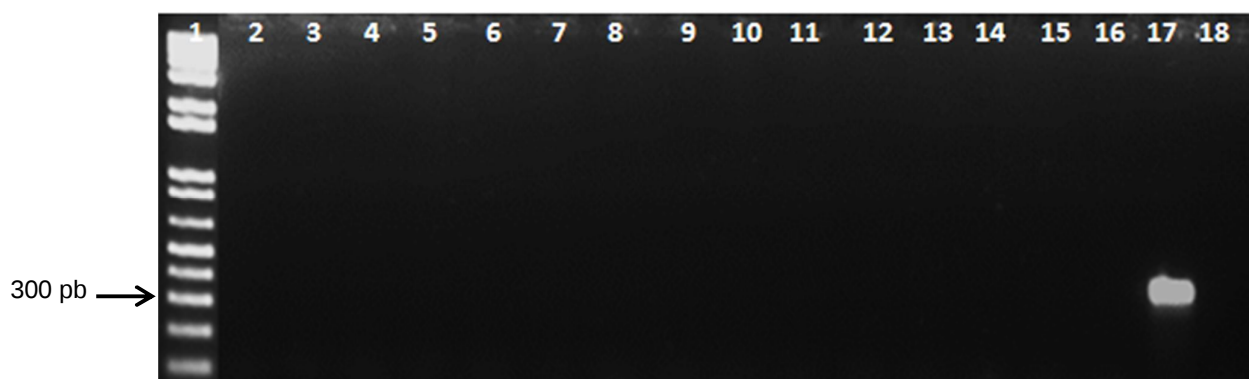


Figura 20 - Produtos da amplificação do gene *eed* (330pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 17: *S. aureus* FRI 361, Coluna 18: Controle da reação água ultrapura

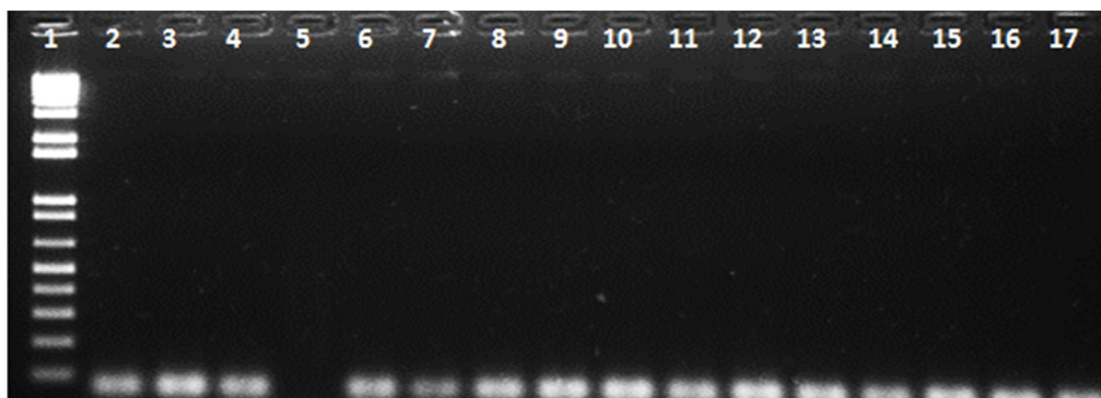


Figura 21 - Produtos da amplificação do gene *eee* (482pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 17: *S. aureus* isolados de mastite bovina

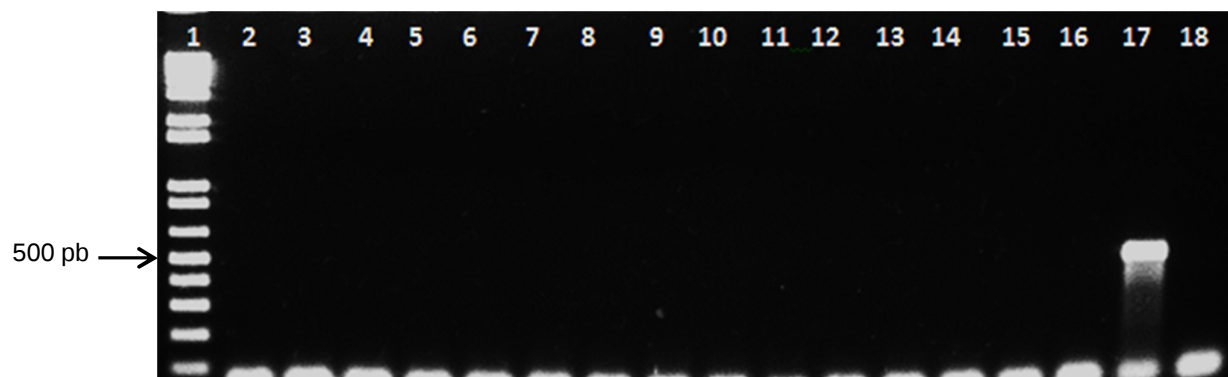


Figura 22 - Produtos da amplificação do gene *eee* (482pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 17: *S. aureus* FRI 326, Coluna 18: Controle da reação água ultrapura

Teste de resistência a antimicrobianos

Dos 31 isolados avaliados neste estudo, 51,6% foram resistentes a ampicilina, clindamicina e sulfonamida, 48,4% a penicilina, 41,9% a oxacilina, 38,7% a tetraciclina, 32,2% a eritromicina e teicoplanina, 19,3% a cefoxitina e tobramicina, 16,1% a estreptomicina, 9,6% a cefalotina, 6,4% a ceftiofur e 3,2% a enrofloxacin. Além disso, 93% dos isolados foram resistentes a um ou mais dos antimicrobianos testados. Destes 54% foram multirresistentes sendo o perfil mais observado o AMP, CLI, ERI, OXA, PEN, SUL e TOB.

Perfis de resistência intermediária foram detectados para sulfonamida (12,9%), para teicoplanina e tobramicina (9,6%) e para cefalotina, ceftiofur, enrofloxacin, eritromicina e sulfazotrim (3,2%). Os resultados também podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina provenientes de distintas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil

Antimicrobianos	Resistente % (n)	Intermediário % (n)	Sensível % (n)
Ampicilina (10µg)	51,6% (16)	0	48,4% (15)
Cefalotina (30 µg)	9,6% (3)	3,2%(1)	87,2% (27)
Cefoxitina (30µg)	19,35% (6)	0	80,65% (25)
Ceftiofur (30 µg)	6,45% (2)	3,2%(1)	90,35% (28)
Clindamicina (2µg)	51,6% (16)	0	48,4% (15)
Enrofloxacina (5 µg)	3,2% (1)	3,2% (1)	93,6(29)
Eritromicina (15µg)	32,2%(10)	3,2% (1)	64,6% (20)
Estreptomicina(10µg)	16,12% (5)	0	83,88%(26)
Oxacilina (1 µg)	41,9%(13)	0	58,1%(18)
Penicilina (10U)	48,4% (15)	0	51,6%(16)
Sulfazotrim (25 µg)	0	3,2%(1)	96,8%(30)
Sulfonamida(300 µg)	51,6% (16)	12,9% (4)	35,5%(11)
Teicoplanina (15 µg)	32,2%(10)	9,6% (3)	58,2%(18)
Tetraciclina (30µg)	38,7%(12)	0	61,3%(19)
Tobramicina (10µg)	19,35% (6)	9,6% (3)	71,05%(22)

Detecção de grupos *agr*

O grupo *agr* III foi prevalente entre os isolados, com 32,2%, seguido pelo *agr* I com 22,5%, *agr* II com 9,6%, e *agr* IV com 6,5%. Em 35% dos isolados não foi possível determinar o grupo *agr*. Os grupos *agr* I e III foram encontrados concomitantemente em dois isolados estudados, o que foi confirmado pelo sequenciamento do produto da PCR. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 23, 24, 25, 26 e 27.

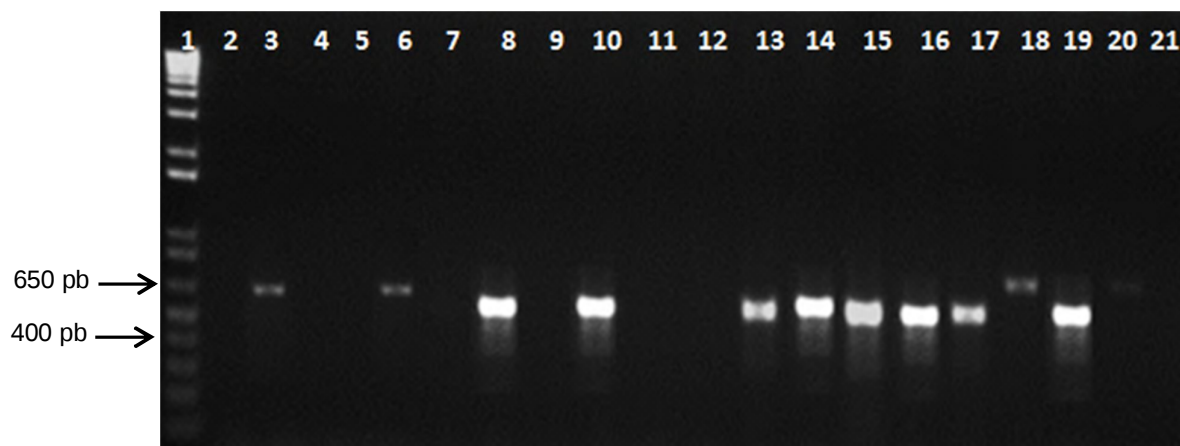


Figura 23 - Produtos da amplificação dos genes *agr* I e II (440pb e 572pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 18: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 19: *S. aureus* RN 6390B, Coluna 20: *S. aureus* USA 100, Coluna 21: Controle da reação água ultrapura

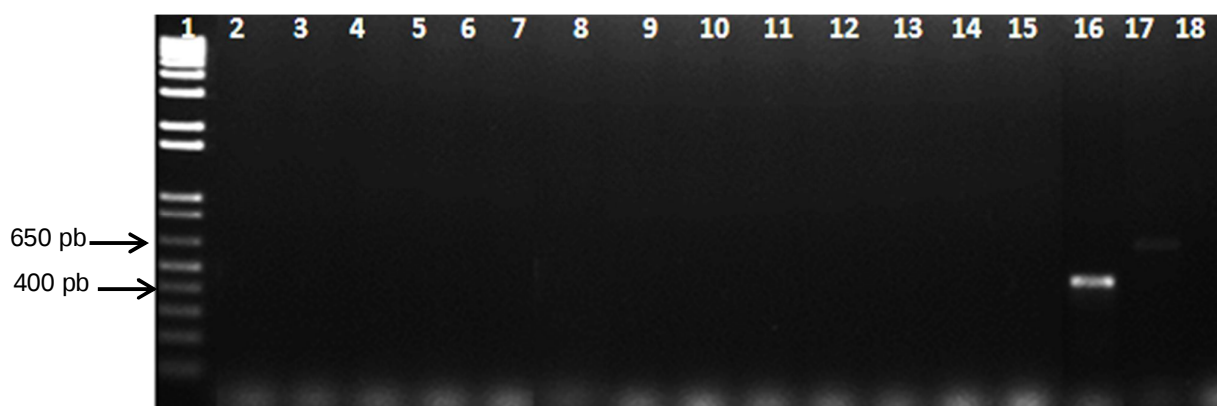


Figura 24 - Produtos da amplificação dos genes *agr* I e II (440pb e 572pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 15: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 16: *S. aureus* RN 6390B, Coluna 17: *S. aureus* USA 100, Coluna 18: Controle da reação água ultrapura

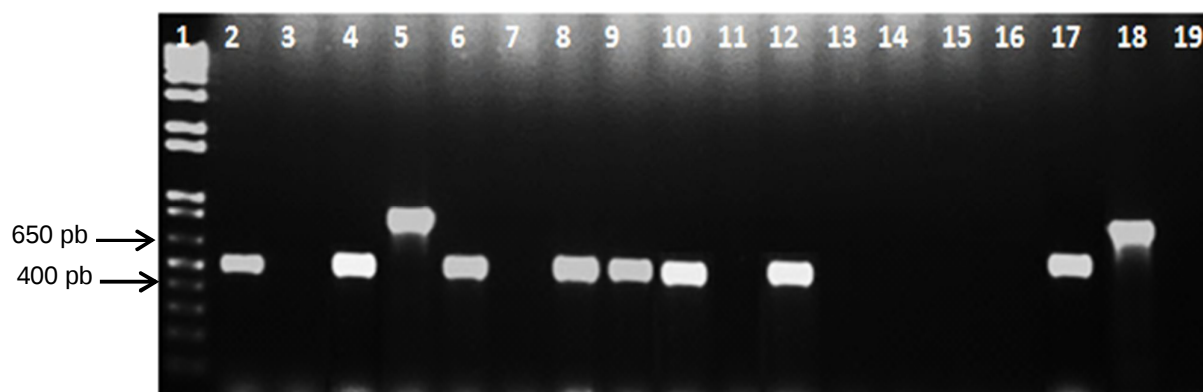


Figura 25 - Produtos da amplificação dos genes *agr* III e IV (406pb e 588pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 16: *S. aureus* isolados de mastite bovina, Coluna 17: *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 18: *S. aureus* RN 4850, Coluna 19: Controle da reação água ultrapura

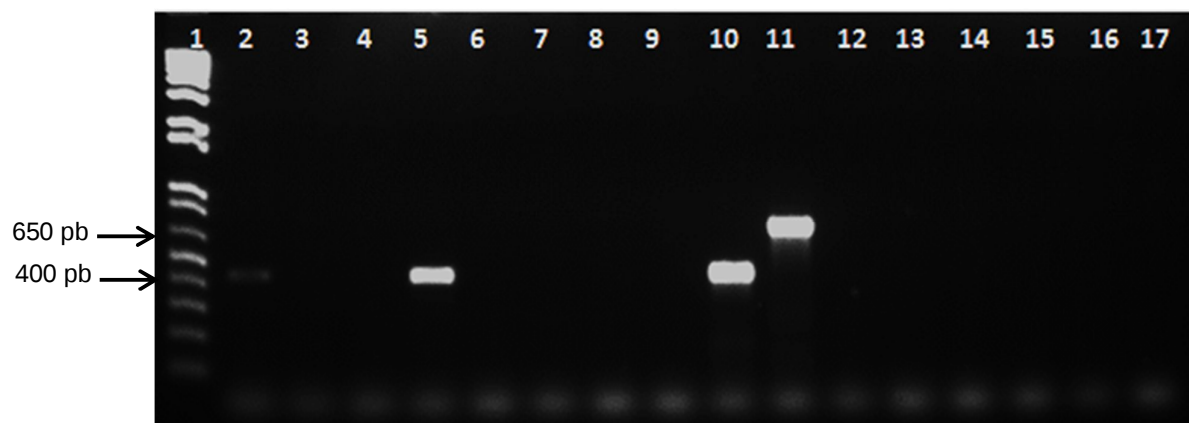


Figura 26 - Produtos da amplificação dos genes *agr* III e IV (406pb e 588pb), Coluna 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 2 a 17: *S. aureus* isolados de mastite bovina.

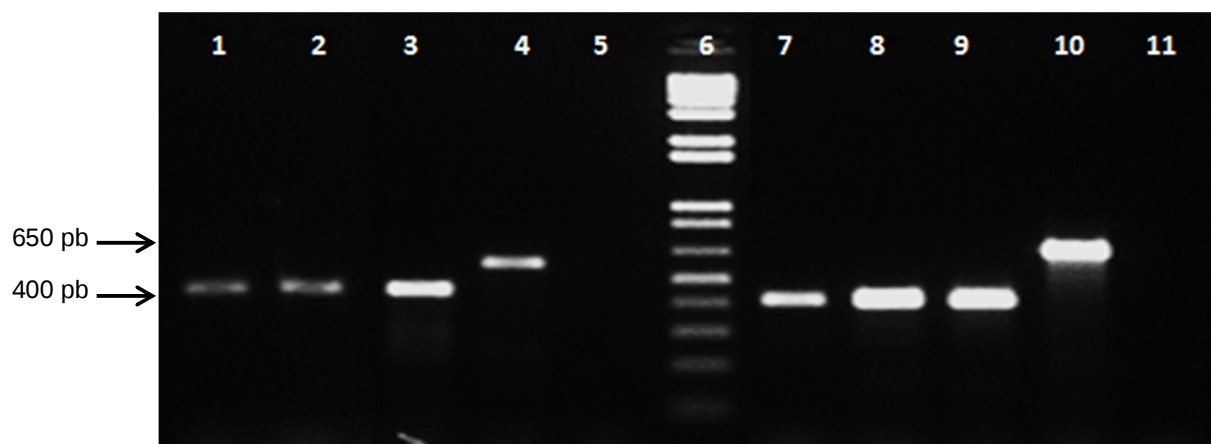


Figura 27 - Produtos da amplificação dos genes *agr* I e III (440pb e 406pb) dos isolados com sobreposição de grupos *agr* Coluna 1 e 2: *S. aureus* isolados de mastite bovina (SA8 e SA16), Coluna 3: *S. aureus* RN 6390B, Coluna 4: *S. aureus* USA 100, Coluna 5: Controle da reação água ultra pura, Coluna 6: marcador de peso molecular 1 Kb, Coluna 7 e 8: *S. aureus* isolados de mastite bovina (SA8 e SA16), Coluna 9: *S. aureus* ATCC 25923, Coluna 10: *S. aureus* RN 4850, Coluna 11: Controle da reação água ultrapura

Discussão

Através das análises fenotípicas e moleculares verificou-se que todos os isolados de ECP pertenciam à espécie *S. aureus*. Mendonça et al. (2012) e Rall et al. (2014) encontraram resultados semelhantes, verificando a prevalência de *S. aureus* entre ECP isolados de mastite bovina.

Pode-se ressaltar que entre os testes fenotípicos utilizados, a resistência a acriflavina foi a que apresentou maior especificidade, uma vez que todos isolados foram resistentes a esse antimicrobiano, o que também foi descrito por Roberson et al. (1992), Gandra et al. (2005) e Capurro et al. (2010).

A capacidade de produção de biofilme foi observada em 45% dos isolados. Lee et al. (2014) encontraram resultado semelhante, em isolados de *S. aureus* de diferentes fontes em uma fazenda leiteira, onde 45,2% produziram biofilme em microplacas de poliestireno, e ressaltaram a importância desse resultado, tendo em vista que indica a possibilidade de persistência do patógeno no ambiente de ordenha, uma vez que estes isolados têm uma maior capacidade de colonizar a glândula mamária através da formação de biofilme (Cucarella et al., 2004).

A presença dos genes *icaA* e *icaD* foi observada em 71% e 74% dos isolados, respectivamente. Entretanto, houve presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* em 67% dos isolados. Estudos apontam que o gene *icaA* induz a formação de biofilme em níveis mais baixos, enquanto a presença concomitante de *icaA* e *icaD* aumenta significativamente o fenótipo de formação de biofilme (Arciola et al., 2001). Observou-se que 67% dos isolados carregavam ambos os genes *ica*, entretanto apenas o isolado (SA9) demonstrou fenótipo de formação de biofilme aumentado, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$), diferindo dos demais isolados. Cabe ressaltar que a presença destes genes indica que o isolado tem capacidade de formação de biofilme, no entanto, a expressão gênica pode variar quando o isolado é submetido a distintas condições ambientais (Stanley e Lazazzera, 2004).

Segundo Atshan et al. (2013), em isolados de *S. aureus* com capacidade para produzir biofilmes, variações na expressão gênica podem fazer com que estes utilizem tanto o mecanismo *ica*-dependente, como o *ica*-independente, para a produção de biofilme. Porém, neste estudo observou-se que a capacidade de formar biofilme é isolado-dependente, haja vista que os isolados SA28 e SA30 não portavam os genes *icaA* e *icaD* e apresentaram capacidade de formação de biofilme, sugerindo um mecanismo de formação de biofilme independente de *ica*, entretanto, os isolados SA12, SA20, SA21, SA23 e SA29 não carregavam os genes *ica* estudados e não foram capazes de formar biofilme.

O gene da enterotoxina A foi o mais prevalente (13%), o que é preocupante, haja vista que esta enterotoxina é a mais envolvida em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Entretanto, observou-se que 6,4% dos isolados portavam o gene da enterotoxina C e 3,2% o gene da enterotoxina B. Os genes das enterotoxinas D e E não foram encontrados em nenhum dos isolados.

As enterotoxinas estafilocócicas são termorresistentes, portanto, uma vez liberadas no alimento, estarão presentes no produto final, podendo causar danos à

saúde dos consumidores. Segundo Asoa et al. (2003), o leite é um bom substrato para a multiplicação de *S. aureus* e para a produção de enterotoxinas, as quais mantêm a sua atividade biológica, mesmo após a pasteurização ou a ultrapasteurização.

Segundo Song et al. (2015), a presença de genes de EEs é maior em isolados pertencentes aos grupos *agr* II e *agr* IV, do que naqueles que pertencem aos grupos *agr* I e *agr* III. Dessa forma, pode-se sugerir que a baixa ocorrência de genes de EE clássicas possivelmente está relacionada à baixa frequência de isolados de *S. aureus* pertencentes aos grupos *agr* II e IV.

Em relação aos níveis de resistência e multirresistência a antimicrobianos, pode-se notar índices considerados preocupantes, tanto para o tratamento da doença, como para a disseminação de resistência a antimicrobianos entre micro-organismos.

Observou-se que 54% dos isolados apresentaram multirresistência, sendo o perfil AMP, CLI, ERI, OXA, PEN, SUL e TOB, o mais frequente. Wang et al. (2014), obtiveram resultado similar, onde 69% dos isolados provenientes de mastite bovina foram resistentes a mais de 10 antimicrobianos. A resistência a múltiplas drogas em isolados de *S. aureus* provenientes de leite bovino tem sido relatada em muitos países (Holmes e Zadoks, 2011; Haran et al., 2012; Kreausukon et al., 2012; Wang et al., 2014), o que também foi observado neste estudo.

Observou-se elevada resistência a β -lactâmicos, o que também foi relatado em outros trabalhos, nos quais foram observadas taxas elevadas de resistência a penicilina entre isolados de *S. aureus* provenientes de mastite (Shi et al., 2010; Kalmus et al., 2011). Jagielski et al. (2014) encontraram 41% dos isolados de *S. aureus* resistentes à penicilina, resultado que vem ao encontro do obtido neste estudo, e ressalta a importância da correta identificação do agente e da realização de um antibiograma previamente ao tratamento da doença, de modo a aumentar a efetividade do antimicrobiano utilizado e da taxa de cura da doença.

Entre os isolados deste estudo, observou-se a prevalência dos grupos *agr* III (32,2%) e *agr* I (22,5%). O grupo *agr* III é frequentemente encontrado em isolados de *S. aureus* provenientes de mastite, além de estar envolvido com a formação de biofilme. Vautor et al. (2006) encontraram que 80% dos isolados oriundos de mastite, pertenciam ao grupo *agr* III, e apresentavam elevada capacidade de formação de biofilme, resultados semelhantes ao deste estudo. Já isolados

pertencentes ao grupo *agr* I também são formadores de biofilme, apresentando capacidade relativamente maior para persistir na glândula mamária, além de estarem relacionados com resistência a antimicrobianos (Buzzola et al., 2007; Melchior et al., 2009; Bardiau et al., 2014).

Observou-se sobreposição dos grupos *agr* I e *agr* III em dois isolados, o que foi confirmado por meio de sequenciamento do fragmento obtido. Na literatura já foram relatadas variações no *locus agr*, e sobreposição de grupos *agr* já foi relatada em isolados de *S. aureus* oriundos de vegetais e em isolados provenientes de cateter venoso, entretanto, este é o primeiro relato em um isolado proveniente de leite de vacas com mastite apresentando essa característica. Isto pode ter ocorrido por mutação ou/e inserção de um fragmento em uma região intergênica (Cafiso et al., 2007; Song et al., 2015).

Verificou-se que todos ECP provenientes de mastite, de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, pertenciam à espécie *S. aureus*. Além disso, 22,6% dos isolados apresentam genes de enterotoxinas clássicas e 45% têm capacidade de aderir a superfície de poliestireno, podendo este fato contribuir para que estes isolados persistam em ambientes da ordenha e da indústria de alimentos, contaminando o leite. Os isolados apresentam resistência a maioria dos antimicrobianos testados, e pertencem a distintos grupos *agr*, sendo que os grupos *agr* mais prevalentes são os que normalmente regulam a resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme, fatores preocupantes para a incidência da doença. Logo, visto o potencial de virulência dos isolados, mais estudos serão realizados em relação a estes fatores, para buscar respostas que venham a contribuir para o tratamento da doença e para evitar a contaminação do alimento com este micro-organismo patogênico.

Referências

American Public Health Association – APHA. 2002. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4rd ed. Washington, DC.

Arciola, C. R., Baldassarri, L., Montanaro, L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections. J. Clin. Microbiol, 39: 2151-2156.

Argudin, M. A., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins, 2:1751-1773.

Asoa, 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.

Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Karunanidhi, A., Belkum, A., Lung, L.T.T., Sekawi, Z., Nathan, J.J., Ling, K.H., Seng, J.S.C., Ali, A.M., Abdaljaleel, S.A., Hamat, R.A. 2013. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Infection, Genetics and Evolution*, 18:106–112.

Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J.G., Ote, I. 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 169:74–79.

Baron, F., Cochet, M. O., Pellerin, J.L., Zakour, N. B., Lebon, A., Navarro, A., Proudly, I., Le Loir, Y., Gautier, M. 2004. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *J. Food Prot.*, 67:2302–2305.

Bastos, C. P. Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Boyen, F., Eeckhaut, F.V., van Immerseel, F., Pasmans, R., Ducatelle, F., Haesebrouck, F. 2009. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet. Microbiol.* 135: 187-195.

Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscher, L.P., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvino, L., Sordelli, D.O. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect. Immun.*, 75: 886–891.

Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Demelio, V., Spina, D., Nicoletti, G., Stefani, S. 2007. agr-genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51: 220–227.

Chapaval, L., Moon, D.H., Gomes, J.E. 2006. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (ent) and toxic shock syndrome Toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. *Arq Inst Biol*, 73:165-169.

Chapin, K.C., Murray, P. R. Media. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C., Tenover, F. C., Tenover, R. H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7 Ed. Washington: American Society for Microbiology. p.1687-1707.

CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Second Informational Supplement M100–S22. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

Carfora, V., Caprioli, A., Marri, N., Sagrafoli, D., Boselli, C., Giacinti, G., Giangolini, G., Sorbara, L., Dottarelli, S., Battisti, A., Amatiste, S. 2015. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *International Dairy Journal*, 42:12 e 15

Costerton, W.J., Montanaro, L., Balaban, N., Arciola, C.R. 2009. Prospecting gene therapy of implant infections. *The International Journal of Artificial Organs*, 32: 689-695

Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y. 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. & Tech.* 91: 127–150.

Cucarella, C., Torma, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J. R. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72 (4): 2177-2185.

Gandra, E.A., Fernandez, M.A., Silva, J.A., Silva, W.P. 2011. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus* *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 31(4): 946-949.

Gandra, E.A., Silva, J.A.; Macedo, M.R.P., Araújo, M.R., Mata, M.M.; Silva, W.P. 2005. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. *Archives of Veterinary Science*, 10: 75-81.

Götz, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.*, 43: 1367–1378, 2002.

Haran, K.P., Godden, S.M., Boxrud, D., Jawahir, S., Bender, J.B., Sreevatsan, S. 2012. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *J Clin Microbiol.*, 50(3):688-95.

Harley, J.P, Prescott, L.M. 1996. *Laboratory Exercises in Microbiology*. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 3 ed.

Holmes, M.A. and Zadoks, R.N. 2011 Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:373–382.

Jagielski, T., Puacz, E., Lisowski, A., Siedlecki, P., Dudziak, W., Międzobrodzki, J., Krukowski, H. 2014. Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. *J. Dairy Sci.* 97 :6122–6128.

Jarraud, S., Mougél, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. and Immun.*, 70:631–641,

- Kalmus, P., B. Aasmae, A. Karssin, T. Orro, and K. Kask. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scand.* 53:4.
- Kreausukon, K., Fetsch, A., Kraushaar, B., Alt, K., Muller, K., Kromker, V., Zessin, K.H., Kasbohrer, A., Tenhagen, B.A. 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J Dairy Sci.*, 95(8):4382-8.
- Lee, S. H. I., Mangolin, B. L. C., Gonçalves, J. L., Neeff, D. V., Silva, M. P., Cruz, A. G., Oliveira, C. A. F. 2014. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97 :1812–1816.
- Melchior, M.B., Osch, M.H.J., Graat, R.M., Duijkeren, E., Mevius, D.J., Nielen, M., Gaastra, W., Fink-Gremmels, J. 2009. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet. Microbiol.* 137:83–89
- Mendonça, E.C.L., Marques, V.F., Melo, D.A., Alencar, T.A., Coelho, I.S., Coelho, S.M.O., Souza, M.M.S. 2012. Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis as a subsidy for the implementation of control measures. *Pesq. Veter. Bras.*, 32: 859-864.
- Rall, V.L.M., Miranda, E.S., Castilho, I.G., Camargo, C.H., Langoni, H, Guimarães, F.F., Fernandes Júnior, A. 2014. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 97:829–837.
- Roberson, J. R., L. K. Fox, D. D. Hancock, and T. E. Besser. 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 30:3217–3219.
- Rosec, J.P., Gigaudo, O., 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 61-70.
- Schlegelová, J., Dendis, M., Benedík, J., Babák, V., Rysánek, D. 2003. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on far differ in coagulase genotype. *Vet. Microbiol.* 92:327–334.
- Shi, D., Y. Hao, A. Zhang, B. Wulan, and X. Fan. 2010. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 57:221–224.
- Shopsin, B., Mathema, B., Alcibes, P., Said-salim, B., Lina, G., Matsuka, A., Martinez, J., Kreiswirth, B.N. 2003. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. *J. Clin. Microbiol.*, 41:456-459

Silva, N.C., Guimarães, F.F., Manzi, M.P., Budri, P.E., Gómez-Sanz, E., Benito, D., Langoni, H., Rall, V.L., Torres, C. 2013. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. J. Dairy Sci., 96:6856-6862.

Simões, M.; Simões, L.; Vieira, M. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Science and Technology, 43: 573-583.

Song,M., Bai,Y., Xu,J., Carter,M.Q., Shi, C., Shi, X. 2015.Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. International Journal of Food Microbiology, 195:1–8.

Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Mol. Microbiol., 52:917-924.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Irkovic, I.,Ruzicka, F., 2007.Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. J. Compilation, 115: 891–9.

Takeuchi, S.M., Maeda, T., Hashimoto, N., Imaizumi, K., Kaidoh, T.,Hayakawa, Y. 2001. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. Vet. Microbiol., 79:267-274.

Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S. 2003. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet. Microbiol. 92:179-185.

Vautor, E., Carsenti-Dellamonica, H., Sabah, M., Mancini, G., Pépin, M., Dellamonica, P. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). Small Rumin. Res. 72: 197-199.

Vuong, C., Saenz, H.L., Götz, F., Otto, M. 2000. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis., 182:1688-1693.

Wang, X., Wang, X., Wang, Y., Guo, G., Usman, T., Hao,D., Tang, X., Zhang, Y., Yu,Y. 2014. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. Letters in Applied Microbiology, 58: 527—534.

Zocche, F., França, R. C., Aleixo, J. A. G., Moreira, A. N., Silva, W. P. 2009. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Interciência. v. 34, n. 7, p. 487-491.

4 Considerações finais

Verificou-se a prevalência de *S. aureus* entre os isolados de ECP provenientes de mastite, de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, Brasil, evidenciando a alta ocorrência desse patógeno em casos de mastite bovina.

Os genes de enterotoxinas estão presentes em 22,6% dos isolados e 45% dos isolados têm capacidade de aderir em poliestireno, podendo persistir em ambientes da ordenha e da indústria de alimentos, além de contaminar o leite, sendo um problema de saúde pública, uma vez que as enterotoxinas são resistentes ao tratamento térmico.

Houve resistência a maioria dos antimicrobianos testados, e os isolados pertencem a distintos grupos *agr*, sendo que os grupos *agr* mais prevalentes são os que regulam a resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme, fatores preocupantes para a ocorrência da doença e para a persistência desse micro-organismo em superfícies presentes em ambiente de ordenha e de plantas de processamento de alimentos.

Logo, visto o potencial de virulência dos isolados, mais estudos serão realizados, avaliando condições distintas para sua expressão, bem como diferentes fatores de virulência, de forma a buscar respostas que venham a auxiliar no tratamento da doença, bem como procurar formas de minimizar e/ou evitar a contaminação do produto final e das superfícies com este micro-organismo patogênico.

Referências

AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 31- 37. 2011.

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I.; SILVA, D.; LENCASTRE, H. Chacterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n.12, p. 3845-3849, 2007.

AL-TARAZI, Y.; ALBETAR, M.; ALABOUDI, A. Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International**.v. 42, p. 374-379, 2009.

ALVIM, S. C. **Formação de biofilmes na indústria de laticínios**. 2008. Trabalho de conclusão do Curso (Especialista em Higiene e Inspeção de produtos de origem animal). Universidade Castelo Branco, GOIÂNIA – GO.

APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC, 4rd ed. 2002.

APPARAO, M.D.; RUEGG, P.L.; LAGO, A.; GODDEN, S.; BEY, R.; LESLIE, K. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 2589-2597, 2009.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151–2156, 2001.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2 p. 1751-1773, 2010.

ASOA, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. 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. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 33–40, 2003.

ASPERGER, H. *Staphylococcus aureus*. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. **International Dairy Federation**. p.24-42, 1994.

ATSHAN, S.S.; SHAMSUDIN, M.N.; KARUNANIDHI, A.; BELKUM, A.; LUNG, L.T.T.; SEKAWI, Z.; NATHAN, J.J.; LING, K.H.; SENG, J.S.C.; ALI, A.M.; ABDULJALEEL, S.A.; HAMAT, R.A. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18 p. 106–112, 2013.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, p. 384-404,.2003.

BARDIAU, M.; DETILLEUX, J.; FARNIR, F.; MAINIL, J.G.; OTE, I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 169, p. 74–79, 2014.

BARKEMA, H.W.; GREEN, M.J.; BRADLEY, A.J.; ZADOKS, R.N. *Invited review*: The role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92 n.10, p. 4717-4729, 2009.

BARON, F.; COCHET, M. O.; PELLERIN, J.L.; ZAKOUR, N. B.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2302-2305, 2004.

BASTOS, C. P. **Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus***. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.

BHATIA, A.; ZAHOOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 1, p. 188-197, 2007.

BOYEN, F.; EECKHAUT, F.V.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, R.; DUCATELLE, F.; HAESEBROUCK, F. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 187-195, 2009.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: An evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 116-128, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2011. Instrução normativa IN. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/33395065/dou-secao-1-30-12-2011-pg-6>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2015.
BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/>> Acesso em: 14 de janeiro de 2014.

BUZZOLA, F.R.; ALVAREZ, L.P.; TUCHSCHERR, L.P.; BARBAGELATA, M.S.; LATTAR, S.M.; CALVINHO, L.; SORDELLI, D.O. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 886- 89, 2007.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; DEMELIO, V.; SPINA, D.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. agr-genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 220–227, 2007.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12 e 15, 2015.

CHAPAVAL, L.; MOON, D.H.; GOMES, J.E. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (ent) and toxic shock syndrome Toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 73, p. 165-169, 2006.

CHAPIN, K.C.; MURRAY, P. R. Media. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. 1999. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 Ed. Washington: American Society for Microbiology, p.1687-1707.

CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). 2012. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Second Informational Supplement M100–S22**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

COSTERTON, W.J.; MONTANARO, L.; BALABAN, N.; ARCIOLA, C.R. Prospecting gene therapy of implant infections. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 32, p. 689-695, 2009.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v.284, p. 1318-1322, 1999.

CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5427-5433, 1999.

CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. **Dairy Science & Technology** v. 91, p. 127–150, 2011.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2888–2896, 2001.

CUCARELLA, C.; TORMA, M. A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZON, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 2177-2185, 2004.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167- 193, 2002.

MARTINS, R.P., DA SILVA, J.A.G., NAKAZATO, L., DUTRA, V., DE ALMEIDA FILHO, E.S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 181-187, 2010.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 janeiro de 2015.

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

FERREIRA, H. B. Organização Gênica de Procariotos. In: ZAHA, Arnaldo. **Biologia Molecular Básica**. 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. p. 64-77.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p. 509-10, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GANDRA, E.A.; FERNANDEZ, M.A.; SILVA, J.A.; SILVA, W.P. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31(4), p. 946-949, 2011.

GANDRA, E.A.; SILVA, J.A.; MACEDO, M.R.P.; ARAÚJO, M.R.; MATA, M.M.; SILVA, W.P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 75-81, 2005

GERKE C.; KRAFT A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. Characterization of the *N* Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. **The journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 18586–18593, 1998.

GÓMEZ, C.; PINAL, L.; FRANCO, J.; CARRILLO, J.M.; RAMÍREZ, J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A, B and C isolated from bovine mastitis in México. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 249–253, 2007.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1367–1378, 2002.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, p.18–31, 2007.

HALASA, T.; NIELEN, M.; DE ROOS, A. P.; VAN HOORNE, R.; DE JONG, G.; LAM, T. J.; VAN WERVEN, T.; HOGVEEN, H. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch Dairy cows estimated with a test day model. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 599-606, 2009.

HARAN, K.P.; GODDEN, S.M.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J.B.; SREEVATSAN, S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal Clinical Microbiology**, v.50(3), p. 688-95, 2012.

HARLEY, J.P.; PRESCOTT, L.M. **Laboratory Exercises in Microbiology**. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 3 ed., 1996.

HAVERI, M.; ROSLÖF, A.; RANTALA, L.; PYÖRÄLÄ, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and non persistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 993-1000, 2007.

HOLMES, M.A.; ZADOKS, R.N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 16, p. 373–382, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publ_completa.pdf>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2015.

INGAVALLE, S.; WILLEM W.; LUONG, T.; LEE, C.; CHEUNG, A. Rat/MgrA, a Regulator of Autolysis, Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus* **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1423–1431, 2005.

JAGIELSKI, T.; PUACZ, E.; LISOWSKI, A.; SIEDLECKI, P.; DUDZIAK, W.; MIĘDZOBRODZKI, J.; KRUKOWSKI, H. Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 6122–6128, 2014

JARRAUD, S.; LYON, G.; FIGUEIREDO, A. M. S.; GERARD, L.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; MUIR, T. W.; NOVICK, R. P. Exfoliatin-Producing Strains Define a Fourth *agr* Specificity Group in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6517–6522, 2000.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, v. 70 p. 631–641, 2002.

JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v. 61, p. 220-228, 2010.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASTHON, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

KALMUS, P. B.; AASMAE, A.; KARSSIN, T. O.; KASK, K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 53:4, 2011.

KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J. A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M. L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 369–375, 2007.

KREASUKON, K.; FETSCH, A.; KRAUSHAAR, B.; ALT, K.; MULLER, K.; KROMKER, V.; ZESSIN, K.H.; KASBOHRER, A.; TENHAGEN, B.A. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. **Journal Dairy Science**, v. 95(8), p. 4382-8, 2012.

LATTAR, S.M.; CALVINHO, L.; SORDELLI, D.O. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. **Infection and Immunity**, 75: 886 89, 2007.

LEACH, K.A.; GREEN, M.J.; BREEN, J.E.; HUXLEY, J.N.; MACAULAY, R.; NEWTON, H.T.; BRADLEY, A.J. Use of domestic detergents in the California mastitis test for high somatic cell counts in milk. **The Veterinary Record**, v. 168, p. 566-570, 2008.

LEE, S. H. I.; MANGOLIN, B. L. C.; GONÇALVES, J. L.; NEEFF, D. V.; SILVA, M. P.; CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, C. A. F. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 1812–1816, 2014.

LUONG, T.; DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; Y. LEE, C. Y. Transcription Profiling of the *mgrA* Regulon in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 05, p. 1899–1910, 2006.

MAIRA-LITRÁN, T.; KROPEC, A.; ABEYGUNAWARDANA, C.; JOYCE, J.; MARK III, G.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G.B. Immunochemical properties of staphylococcal poly n-acetylglucosamine surface polyssacharide. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4433-4440, 2002.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 281-295, 2005.

MELCHIOR, M.B.; VAN OSCH, M. H. J.; LAM, T. J. G. M.; VERNOOIJ, J. C. M.; GAASTRA, W.; FINK-GREMMELS, J. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. **Journal Dairy Science**, v. 94, p. 5926–5937, 2011.

MELCHIOR, M.B.; OSCH, M.H.J.; GRAAT, R.M.; DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.J.; NIELEN, M.; GAASTRA, W.; FINK-GREMMELS, J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 83–89, 2009.

MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I, G.; SOUZA, V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 119-124, 2013.

MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D.A.; ALENCAR, T.A.; COELHO, I.S.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis as a subsidy for the implementation of control measures. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 859-864, 2012.

MOISE-BRODER, P. A.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; SCHENTAG, J. J.; FORREST, A.; MOELLERING, R. C. JR. Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1700–1705, 2004.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 576- 582, 1999.

NOVICK, R. P. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigenencoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, v. 49, p.93-105, 2003.

O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2001.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; VILELA, C.L. Invasive potential of biofilm-forming Staphylococci bovine subclinical mastitis isolates. **Journal of Veterinary Science**, v.12, p. 95-97, 2011.

OTTO, M. Virulence factors of the coagulase-negative Staphylococci. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 841-863, 2004.

PIECHOTA, M.; KOT, B.; ZDUNEK, E.; MITRUS, J.; WICHA, J.; WOLSKA, M.K.; SACHANOWICZ, K. Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with- and without mastitis and the cowshed environment. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 17, p. 407-11, 2014.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 2177-2197, 2010.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, p. 118-132, 2002.

RALL, V.L.M.; MIRANDA, E.S.; CASTILHO, I.G.; CAMARGO, C.H.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F.F.; FERNANDES JÚNIOR, A. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 829–837, 2014.

RAMOS, J. L.; MARTINEZ-BUENO, M.; MOLINA-HENARES, A. J.; TERAN, W.; WATANABE, K.; ZHANG, X.; GALLEGOS, M. T.; BRENNAN, R.; TOBES, R. The TetR family of transcriptional repressors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 326 356, 2005.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, p. 3217–3219, 1992.

RODE, M.T.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372–383, 2007.

ROHDE, H.; BURDELSKI, C.; BARTSCHT, K.; HUSSAIN, M.; BUCK, F.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.M.; HEILMANN, C.; HERRMANN, M.; MACK, D. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 1883–1895, 2005.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61–70, 2002.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D.; PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3449–3455, 2004.

SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, JR. R. C.; NOVICK, R. P.; VENKATARAMAN, L.; WENNERSTEN, C.; DEGIROLAMI, P. C.; SCHWABER, M. J.; GOLD, H. S. *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) Group II: Is There a Relationship to the Development of Intermediate-Level Glycopeptide Resistance? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 929–38, 2003.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.77, p.545–554, 2010.

SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABÁK, V.; RYSÁNEK, D. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on far differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology** 92, 327–334, 2003.

SHI, D.; HAO, Y.; ZHANG, A.; WULAN, B.; FAN, X. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 221–224, 2010.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B.; ALCABES, P.; SAID-SALIM, B.; LINA, G.; MATSUKA, A.; MARTINEZ, J.; KREISWIRTH, B.N. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p. 456–459, 2003.

SILVA, N.C.; GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; BUDRI, P.E.; GÓMEZ-SANZ, E.; BENITO, D.; LANGONI, H.; RALL, V.L.; TORRES, C. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal Dairy Science**, v. 96, p. 6856-6862, 2013.

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water isolated bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 317-329, 2010.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SONG, M.; BAI, Y.; XU, J.; CARTER, M.Q.; SHI, C.; SHI, X. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. **International Journal of Food Microbiology**, v. 195, p. 1–8, 2015.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 917-924, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**, v. 115, p. 891–9, 2007.

STER, C.; GILBERT, F. B.; COCHARD, T.; POUTREL, B. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 227–235, 2005.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; MILEWSKI, S.; FRANKOWSKA, A.; JAKUBCZAK, A. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. **Polish Journal of Microbiology**, v. 61, p. 65–69, 2012.

TAKEUCHI, S.M.; MAEDA, T.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA, Y. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, 79:267-274, 2001.

THOMAS, D.; CHOU, S.; DAUWALDER, O.; LINA, G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Chemical Immunology and Allergy** v. 93, p. 24 – 41, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo, 2008.

VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; DEMNEROVA, K. Production of Staphylococcal enterotoxin C in milk. **International Dairy Journal**, v. 30, p. 103–107, 2013.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p.179-185, 2003.

VAUTOR, E.; CARSENTI-DELLAMONICA, H.; SABAH, M.; MANCINI, G.; PÉPIN, M.; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 197-199, 2007.

VERSCHOOR, C.P.; PANT, S.D.; SCHENKEL, F.S.; SHARMA, B.S.; KARROW, N.A. SNPs in the bovine IL-10 receptor are associated with somatic cell score in Canadian dairy bulls. **Mammalian Genome**, 20, 447-454, 2009.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends Biotechnology**, 27, 486-493, 2009.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y.; FISCHER, E.R.; DELEO, F.R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **The journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 881–886, 2004.

WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y.; GUO, G.; USMAN, T.; HAO, D.; TANG, X.; ZHANG, Y.; YU, Y. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58 p. 527 - 534, 2014.

WU, J.; HU, S.; CAO, L. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51, 3131-3135, 2007

YANG, F.L.; LI-SHAN, X.; HE, B.X.; DU, Y.L.; LI, G.H.; YANG, B.B.;HUA, H.Q. Bovine mastitis in subtropical dairy farms, 2005 – 2009. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 68-72, 2011.

YARWOOD, J. M.; McCORNICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3 – Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 13138-13147, 2002.

YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1620-5, 2003.

ZAFALON, L. F.; ARACARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M. Utilização do teste de Voges-Proskauer e da Coagulase para o diagnóstico laboratorial de *Staphylococcus aureus* envolvidos na epidemiologia da mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p.1285-1293, 2009.

ZOCHE, F.; FRANÇA, R. C.; ALEIXO, J. A. G.; MOREIRA, A. N.; SILVA, W. P. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciência**, v. 34, p. 487-491, 2009.