

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS CLONAIIS, RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS E PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS À FORMAÇÃO DE  
BIOFILMES (*icaA* e *icaD*) EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
PROPRIEDADES PRODUTORAS DE LEITE BOVINO**

LILIAN KOLLING GIRARDINI

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS CLONAIS, RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS E PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS À FORMAÇÃO DE  
BIOFILMES (*icaA* e *icaD*) EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE  
PROPRIEDADES PRODUTORAS DE LEITE BOVINO**

Autora: Lilian Kolling Girardini\*

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, área microbiologia veterinária, especialidade em bacteriologia.

Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

PORTO ALEGRE  
2013

---

\* Médica Veterinária

## CIP - Catalogação na Publicação

Kolling Girardini, Lilian  
Identificação de grupos clonais, resistência aos antimicrobianos e presença de genes associados à formação de biofilmes (icaA e icaD) em *Staphylococcus aureus* isolados de propriedades produtoras de leite bovino / Lilian Kolling Girardini. -- 2013.  
92 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Resistência aos antimicrobianos. 3. Biofilme. 4. Grupos clonais. I. Ribeiro de Itapema Cardoso, Marisa, orient. II. Título.

LILIAN KOLLING GIRARDINI

**Identificação de grupos clonais, resistência aos antimicrobianos e presença de genes associados à formação de biofilmes (*icaA* e *icaD*) em *Staphylococcus aureus* isolados de propriedades produtoras de leite bovino**

Aprovado em 27 de março de 2013.

APROVADO POR

---

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso  
Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADO POR

---

Dra. Andrea Troller Pinto (UFRGS)  
Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Dra. Gertrudes Corção (UFRGS)  
Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito (EMBRAPA)  
Membro da Comissão

Aos meus pais, Rose e Pedro, pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha vida.

Ao meu esposo Gilvani, pelo apoio e amor dedicados durante esta etapa que se conclui.

A minha irmã Carine, pelo carinho e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meus caminhos e me dar força nos momentos em que pensei que não conseguiria.

Aos meus pais, Rose e Pedro, que sempre primaram pela minha educação, pelo incentivo, carinho, amor e por estarem sempre presentes. Vocês são meu exemplo de ética, serenidade e garra!

A minha irmã, Carine, que sempre me incentivou e auxiliou no que foi necessário.

Ao meu esposo, Gilvani, pelo apoio constante e compreensão nos diversos momentos em que estive ausente.

A minha orientadora, professora Marisa, pelos ensinamentos, paciência e compreensão. Obrigada por tudo.

A minha sogra, Irma; minhas cunhadas, Jove e Janete e minhas sobrinhas, Rafaela e Camile, pelo apoio e carinho durante esta etapa da minha vida.

Ao meu sogro Tarcísio (*in memoriam*), pelo carinho e apoio de sempre. Sei que está torcendo por mim. Saudades!

Ao professor e amigo, Mateus Matiuzzi da Costa, por me ensinar o valor da pesquisa através de sua sabedoria e humildade.

Aos amigos e companheiros de coleta, Thais de Campos e Daniel Santos Paim, pelo auxílio na execução de todas as etapas deste projeto, pela cumplicidade e amizade. Vocês foram imprescindíveis para que este projeto fosse realizado.

A Andréia Inês Ferronato, pelo apoio, companheirismo e amizade.

A Débora da Cruz Payão Pellegrini, pelo auxílio, cumplicidade, amizade e total apoio em todos os momentos, felizes e de dificuldades. Obrigada por sempre me incentivar. Serei eternamente grata por tudo.

A amiga, Vanessa Dias, pelo grande auxílio durante a execução das PCRs e do PFGE.

Aos colegas do Epilab, pelo auxílio na coleta dos dados.

A Alais Maria Dall Agnol, pela amizade, companheirismo e auxílio na execução de parte do projeto.

A Embrapa Gado de Leite, em especial, à Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito, pelo auxílio na padronização das coletas e análises microbiológicas, além da atenção dispendida no período de coletas.

Ao Médico Veterinário, Francisco, pelo auxílio na disponibilizar propriedades.

Aos técnicos da cooperativa, Bruna, Fernando, Julio, Gabriel, Lucas e Volnei, pelo apoio durante as coletas das amostras.

Aos alunos do laboratório de Microbiologia da Unoesc Xanxerê, pelo companheirismo, auxílio na execução de parte dos antibiogramas e compreensão na minha ausência.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro através do projeto aprovado no edital CNPq/MAPA/DAS No. 064/2008.

Ao Dingo, meu fiel companheiro durante o período em que escrevi a tese.

A todos que contribuíram para a realização deste projeto, muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,  
não sou o que era antes”.

Martin Luther King



## RESUMO

*Staphylococcus aureus* destaca-se como principal micro-organismo associado à mastite bovina contagiosa, sendo que as infecções crônicas podem ser causadas pelo crescimento bacteriano na forma de biofilmes, o que pode estar associado à persistência desta bactéria na glândula mamária e à resistência a diversos antimicrobianos. Estudos epidemiológicos empregando técnicas como a macrorestrição seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) têm sido realizados, com a finalidade de identificar clones e caracterizar as infecções por *S. aureus*. Os objetivos deste estudo foram: avaliar a frequência de isolamento de *S. aureus* em amostras de leite colhidas periodicamente em um grupo de propriedades leiteiras do Vale do Taquari, RS; avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *S. aureus* identificados; classificar esses isolados em grupos clonais; avaliar a distribuição e a permanência dos grupos clonais nas propriedades leiteiras ao longo do tempo, além de verificar a presença de genes relacionados à formação de biofilmes (*icaA* e *icaD*). Foram colhidas amostras de leite de todas as vacas em lactação de 21 propriedades, amostradas semestralmente durante dois anos, totalizando 1060 amostras. A presença de *S. aureus* nas amostras foi detectada por isolamento e a identificação foi realizada de acordo com o National Mastitis Council. Isolados confirmados foram testados, pela técnica de disco difusão em ágar, quanto à suscetibilidade frente a treze antimicrobianos. Os isolados também foram submetidos à macrorrestrição do DNA total – PFGE e posteriormente testados pela PCR para detecção dos genes *icaA* e *icaD*. Das 1060 amostras avaliadas, 395 não apresentaram crescimento bacteriano. *Staphylococcus* sp. coagulase negativa foram identificados em 262 amostras, seguido de 136 amostras em que identificou-se *S. aureus*. A frequência de isolamento de *S. aureus* variou de 3,45% a 70,59% nas 17 propriedades em que este agente estava presente. No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, a maioria (75,7%) dos 132 isolados testados apresentaram perfil de sensibilidade, sendo a resistência mais frequente à penicilina (18,2%) e ampicilina (14,4%). Em apenas 27,3% dos isolados detectou-se os genes associados à formação de biofilmes pesquisados, sendo o gene *icaD* o mais prevalente, seguido da presença de ambos os genes. Os 122 isolados clivados pela enzima *SmaI* e submetidos à PFGE foram classificados em 38 grupos clonais. Observaram-se poucos grupos

clonais persistentes, pois somente seis foram descritos consecutivamente em pelo menos duas coletas. O grupo clonal 16 foi o mais prevarente, apresentando isolados em uma mesma propriedade ao longo de dois anos. Conclui-se que *Staphylococcus aureus* está presente na glândula mamária de bovinos em lactação em pequenas propriedades da região. Esses isolados apresentam baixa frequência de resistência aos antimicrobianos. Há uma grande variabilidade de pulsotipos entre os isolados presentes nessas propriedades, porém poucos grupos clonais persistem nas propriedades amostradas. Não foi possível associar a permanência dos grupos clonais nos rebanhos à presença dos genes *icaA* e *icaD* ou ao perfil de resistência a antimicrobianos.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, resistência aos antimicrobianos, biofilme, grupos clonais.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* stands out as the main microorganism associated with bovine contagious mastitis, whereas chronic infections can be caused by bacterial growth in the form of biofilms, which can be associated with the persistence of the bacteria in the mammary gland and resistance to various antibiotics. Epidemiological studies employing techniques such as macrorestriction followed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) have been carried out, aiming to identify clones and characterize *S. aureus* infections. The objectives of this study were: to assess the frequency of *S. aureus* isolation in milk samples collected periodically in a group of dairy farms from Taquari Valley, RS; evaluate the profile of antimicrobial susceptibility of *S. aureus* identified isolates; classify these isolates in clonal groups; assess the distribution and retention of clonal groups in dairy herds over time and to verify the presence of genes related to biofilm formation (*icaA* and *icaD*). Milk samples were collected from all lactating cows from 21 properties that were sampled every six months for two years, totaling 1060 samples. The presence of *S. aureus* in the samples was detected by isolation and the identification was performed according to National Mastitis Council. Confirmed isolates were tested for susceptibility to thirteen antimicrobial by disk diffusion technique in agar. The isolates also underwent macrorestriction of total DNA - PFGE and were subsequently tested by PCR for detection of genes *icaA* and *icaD*. Of the 1060 samples tested, 395 showed no bacterial growth. *Staphylococcus* sp. coagulase-negative samples were identified at 262, followed by 136 samples in which *S. aureus* was identified. The frequency of isolation of *S. aureus* ranged from 3.45% to 70.59% in 17 properties wherein this agent was present. In antimicrobial susceptibility testing, the majority (75.7%) of the 132 isolates tested showed sensitivity profile, being most frequent resistance to penicillin (18.2%) and ampicillin (14.4%). In only 27.3% of the isolates were detected genes associated with biofilm formation surveyed and *icaD* was the most prevalent, followed by the presence of both genes. The 122 isolates cleaved by *Sma*I and submitted for PFGE were classified into 38 clonal groups. There were few persistent clonal groups, because only six groups were described consecutively in at least two collections. The clonal group 16 was the most prevalent, presenting isolates at the same property over two years. It is conclusive that *Staphylococcus aureus* is present in the mammary gland of lactating cattle on small farms in the region. These isolates have low

frequency of antimicrobial resistance. There is great variability of pulsotypes among isolates in those properties, but few clonal groups persist in the sampled properties. It was not possible to associate the permanence of clonal groups in herds to the presence of *icaA* and *icaD* or to the profile of antimicrobial resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antimicrobial resistance, biofilm, clonal groups.

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Dendrogram representing the similarity grouping of *S. aureus* isolates derived from farms with multiple isolation of *S. aureus* from milk samples in a two-year period. Total DNA of isolates was cleaved with *Sma*I and separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)..... 67

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Table 1: Characterization of herds included in the study population.....  | 63 |
| Table 2: Results of bacteriological tests performed on milk samples collected from 21 dairy farms in 2010 and 2011 .....  | 64 |
| Table 3: Frequency of <i>S. aureus</i> isolation in relation to the total number of positive samples per farm, in four sampling events, between 2010 and 2011 ..... | 65 |
| Table 4: Distribution of pulsotypes of <i>S. aureus</i> in milk samples from Taquari Valley farms in four semi-annual collections, 2010-2011.....                   | 66 |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>2. REVISÃO.....</b>   | <b>20</b> |
| 2.1 MASTITE.....   | 20        |
| 2.2 GÊNERO <i>Staphylococcus</i> .....   | 25        |
| <b>2.2.1 Fatores de patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>                      | <b>27</b> |
| 2.2.1.1 Coagulase e outras enzimas.....  | 28        |
| 2.2.1.2 Exotoxinas.....  | 29        |
| 2.2.1.3 Adesinas.....  | 32        |
| 2.2.1.4 <i>Quorum sensing</i> .....  | 33        |
| 2.2.1.5 Biofilmes.....   | 34        |
| <b>2.2.1.5.1 Formação de biofilme em <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>                       | <b>36</b> |
| <b>2.2.1.5.2 Detecção da formação de biofilme em <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>           | <b>37</b> |
| 2.3 CARACTERIZAÇÃO DE GRUPOS CLONAIIS DE <i>S. aureus</i> .....                                  | 38        |
| 2.4 RESISTÊNCIA DE <i>S. aureus</i> AOS ANTIMICROBIANOS.....                                     | 40        |
| <b>3. ARTIGO.....</b>  | <b>43</b> |
| 3.1 INTRODUCTION.....  | 44        |
| 3.2 MATERIALS AND METHODS.....   | 45        |
| <b>3.2.1 Selection of Herds and Sampling.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.2.2 Origin and Collection of Samples.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>3.2.3 Isolation and Identification of <i>S. aureus</i>.....</b>                               | <b>46</b> |
| <b>3.2.4 Macro-restriction of the total DNA and Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE).....</b> | <b>46</b> |
| <b>3.2.5 Test for Antimicrobial Susceptibility.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>3.2.6 Detection of Genes <i>icaA</i>, <i>icaD</i> and <i>mecA</i>.....</b>                    | <b>47</b> |
| <b>3.2.7 Data Analysis.....</b>  | <b>48</b> |
| 3.3 RESULTS AND DISCUSSION.....  | 48        |
| <b>3.3.1 Isolated Microorganisms.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>3.3.2 Test for Antimicrobial Susceptibility.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>3.3.3 Identification of Genes <i>icaA</i> and <i>icaD</i>.....</b>                            | <b>51</b> |
| <b>3.3.4 Clonal Groups of <i>S. aureus</i>.....</b>  | <b>52</b> |
| 3.5 ACKNOWLEDGMENT.....  | 53        |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>4. CONCLUSÕES.....</b> | <b>68</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>69</b> |



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de leite (GOMES, 2001), atingindo, em 2011, a produção histórica de 21,6 bilhões de litros, sendo as regiões Sudeste e Sul as maiores produtoras do país (IBGE, 2012).

Apesar dos avanços tecnológicos na bovinocultura de leite, alguns pontos ainda necessitam ser melhorados. Um dos maiores entraves ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil, do ponto de vista tecnológico, é a qualidade da matéria-prima (OLIVEIRA et al., 1999). Aos poucos, as indústrias têm remunerado o produtor também por qualidade e não somente por quantidade de leite produzido. A qualidade do leite *in natura* é influenciada por fatores associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e, principalmente, pela higiene durante a obtenção e armazenagem do leite (ARCURI et al., 2006).

A mastite destaca-se entre as enfermidades de grande importância mundial nos rebanhos leiteiros devido à ocorrência de casos clínicos, alta prevalência de infecções subclínicas e perdas econômicas que acarreta. Na indústria de laticínios, é responsável pela queda no rendimento dos derivados lácteos, especialmente os queijos, e pela redução da vida de prateleira dos produtos, incluindo o leite pasteurizado. Além disso, a possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas ou a transferência de resíduos de antibióticos via leite representam riscos à saúde pública (FORSYTHE, 2002). De acordo com o agente etiológico envolvido, a mastite classifica-se em contagiosa ou ambiental. A primeira pode disseminar-se de um quarto infectado para outro ou entre diferentes animais, principalmente durante a ordenha. Já na mastite ambiental, os patógenos existentes no ambiente penetram na glândula mamária causando a infecção (PRESTES et al., 2002; FERGUSON et al., 2007).

A utilização de antimicrobianos no tratamento dos quadros de mastite é frequente, no entanto os índices de resistência dos micro-organismos vêm aumentando (BRITO et al., 2001). Este fato aumenta a importância da realização de tratamentos de forma adequada, com medicamentos eficazes, os quais podem ser selecionados através de testes fenotípicos e genotípicos (COELHO et al., 2007).

*Staphylococcus aureus* é o principal agente associado à mastite bovina contagiosa; entretanto, poucos clones parecem ser responsáveis pelo

desenvolvimento da enfermidade (DENDANI et al., 2010). Muitas infecções crônicas por esse agente associam-se ao crescimento bacteriano na forma de biofilmes, dificultando a ação dos macrófagos e aumentando a resistência a diversos antimicrobianos. Além disso, a formação de biofilme relaciona-se principalmente à persistência residual no ambiente (BOYEN et al., 2009). Diversos genes podem estar envolvidos na capacidade individual de cada cepa em formar biofilmes, destacando-se os genes *icaA* e *icaD* (MELCHIOR et al., 2009).

Estudos epidemiológicos têm empregado técnicas moleculares como a macrorestrição seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) como ferramenta para identificar clones e elucidar as vias de transmissão ao longo de cadeias de produção animal. Diversos estudos têm sido realizados com isolados de *S. aureus* de mastite bovina (KWON et al., 2005; SMITH et al., 2005 a, b). No entanto, geralmente estes estudos são transversais, conduzidos em diferentes regiões, ou ainda, trabalham com bancos de cepas, impossibilitando o entendimento a cerca da variabilidade genética das cepas ao longo do tempo. Uma melhor compreensão da epidemiologia deste agente por meio de estudos longitudinais pode contribuir para o desenvolvimento de medidas mais eficazes no controle da mastite bovina. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a frequência de isolamento de *S. aureus* em amostras de leite colhidas periodicamente ao longo de dois anos em um grupo de propriedades leiteiras do Vale do Taquari;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *S. aureus* isolados;
- Classificar os isolados de *S. aureus* por meio da análise de macrorestrição seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) em grupos clonais;
- Avaliar a distribuição e a permanência dos grupos clonais nas propriedades leiteiras ao longo do tempo;
- Verificar a presença de genes relacionados à formação de biofilmes (*icaA* e *icaD*) nos grupos clonais identificados.

Este estudo foi realizado paralelamente ao projeto “Centro de monitoramento e vigilância da resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas para o gado de leite”, aprovado no edital CNPq/MAPA/DAS No. 064/2008. Trata-se da consolidação

de um Centro Colaborador em Defesa Agropecuária (CDA) para monitoramento e avaliação do risco da resistência aos antimicrobianos (RAM) em bactérias patogênicas do gado de leite (CDA-RAM). O CDA-RAM foi estruturado inicialmente para o monitoramento da resistência antimicrobiana dos patógenos da mastite bovina e foi coordenado pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Foi proposto que o CDA-RAM atuasse em escala nacional e, para isso, foram estabelecidas parcerias estratégicas com sete unidades laboratoriais localizadas em seis estados das regiões Sul, Sudeste e Nordeste. O Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS foi o responsável pelas atividades do CD-RAM no Rio Grande do Sul.

## 2. REVISÃO

### 2.1 MASTITE

A cadeia produtiva do leite é fundamental para o país devido a sua importância social e econômica. Cerca de um milhão de propriedades rurais são responsáveis, direta e indiretamente, pela geração de três milhões de empregos. A produção de leite no Brasil vem aumentando ao longo dos anos e a região Sul do país ocupa a segunda posição no ranking de produção nacional (IBGE, 2012). Uma das maiores barreiras ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil, do ponto de vista tecnológico, é a qualidade da matéria-prima, influenciada por fatores associados ao manejo, à alimentação, ao potencial genético dos rebanhos e, principalmente, à falta de higiene durante a obtenção e armazenamento do leite (GUERREIRO et al., 2005).

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, que afeta a produção leiteira tanto em quantidade como em qualidade, resultando em alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, além das alterações no tecido glandular. 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 acarreta (PRESTES et al., 2002).

A ocorrência desta enfermidade é influenciada por vários fatores, dentre os quais podemos citar: a conformação do úbere e tetos, status imunitário dos animais, condições de higiene no equipamento de ordenha e no momento da ordenha, além da higiene pessoal do ordenhador. Os tetos constituem a primeira barreira física contra a invasão microbiana e, devido às características anatômicas e fisiológicas, inibem parcialmente a entrada de micro-organismos. Agentes que conseguirem sobrepor esta barreira inicial necessitam ultrapassar as barreiras imunológicas para sobreviver. No entanto, devido à presença de glóbulos de gordura e caseína, o leite torna-se um meio desfavorável à ação do sistema imune na glândula mamária, sendo necessário um rigoroso manejo pré-ordenha, durante e após a mesma, para que se previna, ao máximo, a invasão da glândula mamária por agentes infecciosos, responsáveis pelos quadros de mastite (OLIVEIRA, 2006).

Através da observação dos sinais clínicos, a mastite pode ser classificada em clínica ou subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis no leite, como a presença de grumos ou pus, além de alterações na glândula mamária como aumento de volume, dor à palpação, elevação da temperatura e rubor (OLIVEIRA, 2006). Por outro lado, a mastite subclínica não apresenta sinais evidentes, apresentando o leite aspecto macroscópico normal (MACHADO et al., 2000, PRESTES et al., 2002). Esta forma apresenta maior prevalência em relação à clínica e se caracteriza por alterações na composição do leite, tais como aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (FONSECA e SANTOS, 2000). Além disso, a forma subclínica é a mais importante epidemiologicamente, devido às falhas na detecção, o que favorece a permanência e disseminação dos micro-organismos dentro do rebanho (BARBALHO e MOTA, 2001). Já a mastite clínica, além de ser uma das principais causas de morte de vacas leiteiras adultas, impacta diretamente no bem-estar animal devido aos quadros de hiperalgesia observados nos casos agudos (BRADLEY, 2002).

A mastite bovina é uma enfermidade de caráter multifatorial, no entanto, geralmente apresenta origem infecciosa. Pode ser causada por diferentes agentes, incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas, sendo a maioria das infecções causadas por bactérias (MARTINS et al., 2010).

Os micro-organismos patogênicos frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em bovinos podem ser divididos em dois grupos: patógenos contagiosos e patógenos ambientais. Os principais agentes causadores de mastite contagiosa são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium* sp. Como os micro-organismos contagiosos são bem adaptados à glândula mamária, frequentemente ocasionam infecções crônicas com duração de semanas, meses ou até anos (MARTINS et al., 2010). 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, especialmente em animais que de alguma forma apresentem a imunidade reduzida, seja por infecções bacterianas prévias, ou ainda infecções virais (BARKEMA et al., 2009). Já os patógenos ambientais penetram na glândula mamária a partir de ambientes contaminados, geralmente devido às falhas de manejo dos animais e do ambiente, que é a principal fonte de contaminação nestes

casos (SHUM et al., 2009).

Dentre as bactérias causadoras de mastite, um número limitado pertencente aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e ao grupo dos coliformes, causa a maioria das infecções. Estudos no Brasil demonstram a grande disseminação de *Staphylococcus* sp. nos rebanhos. Ferreira et al. (2007) isolaram este agente em 74,60% dos casos de mastite, enquanto dados da microrregião de Cuiabá-MT, demonstram como principais agentes de mastite subclínica o *Corynebacterium* spp. (27,6%), *S. aureus* (21,5%) e a associação de ambos (6,8%), seguidos de *Staphylococcus intermedius* (6,5%). Já nos casos clínicos, foram isolados com maior frequência *S. aureus* (44,0%) e *Corynebacterium* sp. (12,0%) (MARTINS et al., 2010). As taxas de isolamento de *S. aureus* são variáveis, no entanto este tem sido considerado como o principal agente etiológico nas mastites contagiosas (GIANNEECHINI et al., 2002; SÁ et al., 2004). Porém, dados de um estudo realizado no Pará revelam maior frequência de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, seguido de *Staphylococcus aureus*, em ambos quadros, clínico e subclínico (OLIVEIRA et al., 2011).

As mastites ambientais apresentam como agentes etiológicos patógenos como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* e espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (QUINN et al., 2011). *Staphylococcus* sp. coagulase negativa é um grupo de agentes oportunistas, cuja capacidade de persistir e permanecer em diferentes ambientes faz com que causem uma variedade de enfermidades tanto nos animais como no homem. Em vacas em lactação, estes agentes eram considerados patógenos secundários no desenvolvimento da mastite bovina. No entanto, estudos têm demonstrado a importância destes no desenvolvimento da mastite em bovinos e outras espécies como cabras e ovelhas. As espécies geralmente isoladas de rebanhos leiteiros são *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. epidermidis*, entre outros (THORBERG et al., 2009; PIESSENS et al., 2011).

A bactéria *S. aureus* tem sido associada à presença deste agente em lesões de pele dos tetos, nas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha, muitas vezes atingindo a glândula mamária devido às falhas de manejo. Insufladores contaminados por este agente podem veiculá-lo para animais posteriormente ordenhados com o equipamento (EDMONSON, 2001). Pode ainda se estabelecer e multiplicar em diferentes focos, causando extensa lesão tecidual, além de

permanecer em microabscessos e tecidos fibróticos na glândula mamária, dificultando a penetração e a ação dos antimicrobianos (BARRET, 2002).

A infecção na mastite estafilocócica ocorre pela colonização do teto, especialmente quando este apresenta lesões. Os micro-organismos passam pelo canal do teto e, posteriormente, estabelecem-se em áreas de tecido secretor. *S. aureus* pode ligar-se à matriz extracelular utilizando proteínas que são expostas devido às microlesões, como substratos para a adesão e desenvolvimento de infecções intramamárias (GYLES et al., 2010). As infecções causadas por este patógeno geralmente persistem por longos períodos devido a fatores de virulência, onde a glândula mamária infectada atua como reservatório, a partir da qual os micro-organismos disseminam-se a outros animais do rebanho (HAVERI et al., 2007).

O leite é um substrato adequado para a multiplicação dos estafilococos. Durante a multiplicação, substâncias citotóxicas são produzidas, acarretando a infiltração de neutrófilos na glândula mamária. A agregação de neutrófilos resulta na formação de grumos e edema interalveolar. O acúmulo de fibroblastos, macrófagos e linfócitos resulta na expansão do tecido conectivo interalveolar. A bactéria permanece nos alvéolos e ductos, sendo excretada intermitentemente e o local de intensa multiplicação de *S. aureus* pode resultar em abscessos ou granulomas (GYLES et al., 2010).

Para reduzir o impacto da mastite, é necessário prevenir novas infecções e reduzir a duração das infecções existentes nos rebanhos. O tratamento dos casos clínicos com antibióticos durante a lactação é um item importante no controle da mesma (BRADLEY e GREEN, 2004).

Como a mastite é uma enfermidade altamente prejudicial aos rebanhos leiteiros, estudos têm sido realizados para avaliar a prevalência dos principais agentes envolvidos. Além disso, os programas de manejo têm se aperfeiçoado na tentativa de melhorar a saúde da glândula mamária dos bovinos leiteiros (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

A preocupação com a mastite se justifica, pois se estima, no rebanho brasileiro prevalência de 20 a 38%, o que representa uma perda na produção de 12 a 15%, caracterizando esta enfermidade como uma das mais impactantes na indústria leiteira. Devem ser considerados gastos com medicamentos, leite descartado, serviços veterinários, descarte prematuro e a diminuição do valor comercial dos animais (FONSECA e SANTOS, 2000; REIS et al., 2005). A

prevalência da mastite subclínica é a de maior importância nas criações tecnificadas, acometendo de 20 a 50% dos animais do rebanho (PITKALA et al., 2004). O custo da mastite subclínica é difícil de ser mensurado, mas estima-se que, no Brasil, as perdas relacionadas à produção de leite representam prejuízo de 2,4 bilhões de litros de leite/ano (SANTOS e FONSECA, 2007). A mastite também gera consideráveis prejuízos na indústria de laticínios devido à queda de rendimento dos derivados lácteos, especialmente na produção de queijos e pela redução da vida de prateleira, incluindo o leite pasteurizado.

A manutenção de vacas portadoras de mastite crônica em um rebanho, especialmente quando infectadas por *S. aureus*, é um dos principais fatores de risco para a perpetuação e disseminação deste patógeno para animais suscetíveis (BARRET, 2002). A segregação de animais portadores de *S.aureus* é uma prática que pode ser utilizada como alternativa para reduzir os riscos de transmissão deste agente entre vacas nos rebanhos. No entanto, é necessária uma correta e eficiente identificação dos animais, o que, muitas vezes, inviabiliza a adoção desta prática nas propriedades. Com isso, torna-se fundamental o descarte de vacas portadoras de mastite crônica para o controle da enfermidade (BARRET, 2002).

O leite é um dos alimentos mais completos nutricionalmente e sua qualidade refere-se principalmente à composição físico-química e microbiológica. Nesse sentido, o controle do leite fresco representa papel fundamental para a qualidade geral do produto. Para tanto, deve-se assegurar a qualidade sanitária do rebanho, principalmente quanto à ocorrência de mastite e, também, garantir a execução dos cuidados higiênico-sanitários essenciais durante a ordenha (ARCURI et al., 2006).

O adequado manejo de ordenha é uma das etapas de maior importância quando se busca um produto final de qualidade, devido à possibilidade de contaminação da matéria-prima durante ou após a ordenha, mesmo em rebanhos com bom status sanitário. Alguns cuidados devem ser considerados durante a ordenha, tais como: segregação dos animais, ordenhando inicialmente os animais que nunca apresentaram problemas na glândula mamária, limpeza com água de qualidade e secagem dos tetos com papel toalha descartável e de forma individualizada; rigorosa desinfecção antes e após a ordenha; realização do teste da caneca de fundo preto antes de cada ordenha para detecção dos casos de mastite clínica e tratamento imediato dos mesmos, além da realização do *California Mastitis Test* (CMT), que detecta mastite subclínica (FONSECA E SANTOS 2000;



CHASSAGNE et al., 2005). Além disso, o estudo demonstrou que o fornecimento de alimentação aos animais em um período máximo de 30 minutos antes e até 60 minutos após a ordenha resultou em animais que permaneceram mais tempo em pé após a ordenha, permitindo um melhor fechamento do esfíncter do teto. Ainda, vacas que deitaram pela primeira vez de 40 a 60 minutos após a ordenha apresentaram chance 1,4 vezes menor de adquirirem infecção da glândula mamária por agentes ambientais quando comparadas com animais que deitaram dentro de 40 minutos, demonstrando que o manejo de alimentação após a ordenha é essencial na prevenção de mastites ambientais (DEVRIES et al., 2010).

Do ponto de vista de saúde pública, o leite pode veicular agentes patogênicos e/ou suas toxinas. Com isso, é extremamente importante o tratamento e controle das mastites, a fim de se produzir e comercializar produtos de melhor qualidade. Além do manejo higiênico durante a ordenha, recomenda-se, também, o controle da mastite baseado na prevenção da sucção entre animais jovens, controle de moscas, nutrição adequada, medidas de conforto, especialmente no período do periparto e manejo ambiental da propriedade (DE VLIEGHER et al., 2012).

## 2.2 GÊNERO *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e compreende 43 espécies e subespécies, que estão amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente isolados da pele e mucosas de aves e mamíferos. Atuam como patógenos oportunistas e causam infecções piogênicas graves em humanos e animais (QUINN et al., 2011).

A produção da coagulase está diretamente relacionada à patogenicidade e, entre as espécies coagulase positiva ou variável, *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *S. hyicus* são consideradas as principais. No entanto, apesar das espécies coagulase negativa geralmente apresentarem baixa virulência, algumas vezes podem causar enfermidades em animais e humanos (QUINN et al., 2011).

Caracterizam-se como cocos Gram-positivos (0,5 - 1,5 µm de diâmetro), anaeróbios facultativos e catalase-positivos, podendo ser observados em arranjo individual, aos pares, como correntes curtas ou ainda, em aglomerados em formato de cacho de uva. A estrutura da parede celular é típica de bactérias Gram-positivas, apresentando peptidoglicano, ácidos teicoicos e proteínas. Apresentam

metabolismo fermentativo com produção de ácido e não de gás, não esporulado e são capazes de multiplicação em meios de cultura contendo 10% de cloreto de sódio. São micro-organismos mesófilos, com capacidade de desenvolvimento entre 7 e 48°C, apresentando como temperatura ótima 37°C. Toleram pH na faixa de 4,0 a 10,0, com nível ótimo entre 6,0 e 7,0 (QUINN et al., 2011).

*S. aureus* é a espécie de maior importância por estar relacionada com uma série de infecções e intoxicações no homem e nos animais. Vários fatores de virulência são responsáveis pelos sinais clínicos e gravidade das infecções causadas por *S. aureus*, incluindo as hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e a leucocidina, entre outros (BANNERMAN, 2003).

Em bovinos, o *S. aureus* destaca-se como o principal micro-organismo causador de mastite contagiosa, de difícil tratamento devido, entre outros fatores, à elevada resistência aos antimicrobianos. As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em saúde pública, pois as toxinas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumidor. O risco à saúde humana está associado ao consumo de leite dos rebanhos infectados, uma vez que a maioria dos casos diagnosticados é de mastites subclínicas (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Diversos fatores de virulência foram descritos como importantes em infecções causadas por *Staphylococcus* sp., sendo a maioria destes estudados em *S. aureus* (AKINEDEN et al., 2001; AGUILAR, AMORENA e ITURRALDE, 2001). Um importante fator de virulência é a capacidade que algumas cepas apresentam em formar biofilmes. Em resposta a alterações ambientais, *S. aureus* pode regular a produção de fatores de virulência em relação à densidade de células e disponibilidade de energia. Estes sinais são ativados por um complexo sistema de regulação, sendo codificado por um gene regulador acessório (AGR), o qual desempenha importante função no *quorum sensing*, descrito como a capacidade de comunicação entre as bactérias (XU et al., 2006).

A detecção rápida e precisa de cepas de *S. aureus* é fundamental para implantação de programas de controle. Além disso, a tipificação molecular de *S. aureus* é uma ferramenta importante que pode fornecer informações sobre as características genéticas de clones específicos responsáveis por quadros de mastite (ÇİFTÇI et al., 2009). Os resultados de diferentes estudos, com raras exceções (JOO et al., 2001), sugerem que relativamente poucos clones de *S. aureus* são

responsáveis pelo desenvolvimento da maioria dos casos de mastite bovina e, além disso, esses clones apresentam diferenças de acordo com a distribuição geográfica (MATTHEWS et al., 1994; KAPUR et al., 1995; FITZGERALD et al., 1997; MORK et al., 2005; ÇIFTCI et al., 2009).

### **2.2.1 Fatores de patogenicidade de *Staphylococcus aureus***

As lesões observadas em infecções estafilocócicas decorrem de dois mecanismos principais: invasão tecidual e inflamação. Isto inclui mecanismos de colonização, síntese de moléculas extracelulares que facilitam a aderência e a capacidade de evadir do sistema imune do hospedeiro (QUINN et al., 2011).

Pequenos traumas ou comprometimento da resposta imune do hospedeiro podem predispor ao desenvolvimento de infecções causadas por este patógeno. Dentre os fatores de virulência associados à *S. aureus* podemos citar os fatores responsáveis pela promoção da colonização, evasão do sistema imune e lesão do tecido. Proteínas de superfície, por exemplo, encontradas na parede celular bacteriana, que se ligam à fibronectina e ao fibrinogênio, facilitam a fixação bacteriana aos tecidos. Por outro lado, características estruturais como a cápsula de polissacarídeos, ácidos teicoicos da parede e a proteína A interferem na opsonização e subsequente fagocitose. A enzima catalase auxilia na sobrevivência dentro dos fagócitos, assim como a coagulase é responsável pela proteção bacteriana contra as células fagocíticas, sendo esta última um importante fator de patogenicidade. Outras enzimas como as quinases e hialuronidasas promovem a invasão dos tecidos e as exotoxinas como a hemolisina e a leucocidina lisam a membrana das células hospedeiras (SOMERVILLE et al., 2002; LE LOIR et al., 2003; QUINN et al., 2011).

Vários fatores de virulência são codificados por genes localizados em elementos genéticos móveis, tais como fagos e ilhas de patogenicidade (PAI). As PAIs são segmentos de DNA de variados tamanhos que codificam fatores de virulência, como invasinas, adesinas e toxinas (KAPPER e HACKER, 1999; O'NEILL et al., 2007). Estas apresentam conteúdo de guanina e citosina (G+C) diferente do restante do cromossomo, muitas vezes porque são originadas de outras espécies de bactérias (HACKER e KAPER, 2000) e geralmente estão localizadas em regiões específicas no genoma bacteriano, associadas à genes que codificam RNA

transportador (RNAt). Pelo menos 16 PAIs foram sequenciadas, e a PAI 1 é considerada o protótipo (NOVICK e SUBEDI, 2007).

Também encontram-se nas PAIs fagos temperados, sequências de inserção e integrases (elementos envolvidos na mobilidade genética) nas extremidades da ilha, indicando a presença de “hot spots” (pontos quentes), ou seja, local no genoma onde a inserção ou deleção é facilitada, possibilitando a transferência horizontal de fatores de virulência entre bactérias (YAMAGUSHI et al., 2000; YOSHIZAWA et al., 2000). Além dos genes principais, quase todas as PAIs codificam enterotoxinas ou toxina do choque tóxico. A PAI<sub>bov2</sub> é uma exceção e contém a proteína de adesão conhecida como Bap, que desempenha um papel importante nas mastites crônicas em bovinos (TORMO et al., 2005).

#### 2.2.1.1 Coagulase e outras enzimas

Coagulase é uma proteína extracelular que se liga à protrombina no hospedeiro para formar um complexo chamado estafilotrombina. A atividade de protease é ativada levando à conversão de fibrinogênio em fibrina. Desta forma, as bactérias protegem-se do sistema imune, devido a sua localização dentro do coágulo (GYLES et al., 2010). O teste de coagulase pode ser realizado em lâmina ou em tubo. Nestes, uma suspensão de *Staphylococcus* sp. é adicionada a uma mesma quantidade de plasma de coelho, na qual o fibrinogênio do plasma é convertido em fibrina pela ação da coagulase. O teste em lâmina detecta a coagulase ligada, onde se visualiza a presença de grumos, sendo a leitura realizada de um a dois minutos. Já o teste em tubo, detecta a coagulase livre. Este é considerado como teste definitivo, sendo que a reação positiva caracteriza-se pela formação de um coágulo no fundo do tubo após incubação a 37°C por um período de até 24h (QUINN et al., 2011).

A síntese desta proteína é restrita à *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* (BANNERMAN, 2003) e *Staphylococcus pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005; DEVRIESE et al., 2009). A coagulase é produzida por todas as cepas de *S. aureus*, sendo utilizada como principal critério nos laboratórios de microbiologia para identificação desta bactéria, além de ser um importante fator de virulência (GYLES et al., 2010).

Em amostras clínicas de humanos, a detecção da coagulase é suficiente para

a identificação e distinção de *S. aureus* dos estafilococos coagulase negativa. No entanto, este procedimento não diferencia *S. aureus* das outras espécies coagulase positivas do gênero. Para amostras de origem animal, é importante a distinção, pois *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. pseudintermedius* são frequentemente isolados de amostras de várias espécies animais e do ponto de vista epidemiológico é importante determinar a origem dos micro-organismos envolvidos na etiologia das mastites (GYLES et al., 2010; DEVRIESE et al., 2005; DEVRIESE et al., 2009).

As cepas de *S. aureus* secretam um grupo de exoproteínas como as enzimas lipase, hialuronidase e proteases. A função principal destas proteínas é auxiliar na invasão dos tecidos do hospedeiro, bem como converter esses tecidos em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (DINGES et al., 2000). Em resposta a uma infecção, a lipase age de forma negativa sobre a função imunológica do hospedeiro. Além disso, esta enzima está associada à captura de nutrientes a partir do ambiente. Já a hialuronidase, é considerada como importante fator de virulência, pois está associada à degradação do ácido hialurônico presente no tecido conjuntivo, o que favorece a disseminação do agente no hospedeiro. As proteases, por sua vez, inativam a ação dos anticorpos. A protease melhor descrita é a V8. Esta tem a capacidade de inativar imunoglobulinas da classe IgG *in vitro*. Ainda, protege a bactéria da ação dos neutrófilos e contribui para a destruição dos tecidos, melhorando a capacidade de invasão bacteriana pela destruição da fibronectina. Outro possível papel desta enzima é a obtenção de nutrientes a partir do ambiente (GYLES et al., 2010).

#### 2.2.1.2 Exotoxinas

*S. aureus* produz exotoxinas que possuem atividade citolítica, formando poros na membrana plasmática e, com isso, permitem o extravasamento do conteúdo celular (FOSTER, 2005). Dentre estas, podemos citar  $\alpha$ -hemolisina,  $\beta$ -hemolisina,  $\gamma$ -hemolisina, leucocidina e a Leucocidina Panton-Valentine (LPV) (KANEKO e KAMIO, 2004).

A toxina alfa, também denominada de alfa hemolisina por sua capacidade de lisar hemácias, além de atuar na membrana celular de leucócitos, promovendo a evasão do conteúdo da célula e morte celular, é a citotoxina melhor caracterizada até o momento, sendo também a mais potente. Esta toxina leva à formação de poros

na membrana celular, desencadeando uma reação secundária, com liberação de citocinas e atração dos mediadores inflamatórios. Estes eventos, geralmente, ocorrem em infecções graves como no choque séptico (NILSSON et al. , 1999). Acredita-se que os eritrócitos de coelhos possuem um maior número de sítios de ligação, justificando a ação tóxica desta hemolisina nestas células (BOHACH e FOSTER, 2000).

A toxina beta ou beta hemolisina é uma proteína que atua na membrana citoplasmática, causando danos às membranas ricas em lipídios. Os poros formados na membrana tornam a célula instável e permitem o extravasamento do conteúdo celular. Uma das funções desta hemolisina é a obtenção de ferro (HUSEBY et al., 2007). A beta hemolisina diferencia-se da alfa hemolisina por apresentar lise em eritrócitos de carneiro e não de coelhos, sendo encontrada em aproximadamente 20% dos isolados de *S. aureus*; sua identificação está relacionada especialmente a cepas de mastite bovina (BOHACH et al., 1997). Esta hemolisina apresenta uma característica conhecida como *hot-cold*, ou seja, quando cultivada em ágar sangue de carneiro e incubada a 37°C, a hemolisina interage com as hemácias mas não causa lise, no entanto, se posteriormente colocada em temperatura de 4°C, pode observar-se a lise das células (HUSEBY et al., 2007). A atuação desta toxina é dependente da espécie, sendo os eritrócitos de carneiros, vacas e cobaios mais sensíveis que os de humanos, enquanto os de caninos são resistentes (BOHACH e FOSTER, 2000).

A toxina Gama e a leucocidina são proteínas que agem em conjunto, causando danos aos leucócitos e membranas lipídicas. Poucos isolados de *S. aureus* expressam a leucocidina, mas aproximadamente 90% das cepas isoladas de casos de lesões dermonecroticas graves e pneumonia necrótica em humanos produzem esta toxina, sugerindo que esta seja um importante fator de virulência em infecções necrosantes (STAALI, MONTEIL e COLIN, 1998). A atividade citotóxica de algumas leucotoxinas em neutrófilos polimorfonucleares de isolados de casos de mastite bovina tem sido caracterizada. Barrio, Rainard e Prevost (2006), estudando a atividade da gama hemolisina, determinaram que isolados de mastite produtores dessa toxina foram mais ativos contra neutrófilos polimorfonucleares de bovinos quando comparados a isolados que perderam estes genes.

A leucocidina Panton-Valentine (LPV) é uma exotoxina lesiva às membranas de leucócitos, que interfere na membrana fosfolipídica causando aumento de

permeabilidade, lise e morte celular, além de necrose tecidual (BARRIO, RAINARD e PREVOST, 2006; ARGUDIN et al. 2010). É codificada por dois genes cotranscritos, *lukS-PV* e *lukF-PV*, que podem ser carregados por quatro diferentes fagos (MA et al., 2006; FENG et al., 2008). As infecções causadas por *S. aureus* positivas para LPV têm sido associadas a casos graves, podendo levar a uma alta taxa de mortalidade em humanos, incluindo pacientes jovens imunocompetentes (GILLET et al., 2002). Em animais, a função primária da LPV pode estar associada à inibição da resposta imune do hospedeiro, contribuindo, assim, para a patogênese das mastites causadas por *S. aureus* (CONTRERAS et al., 2007; ARGUDIN et al., 2010). Além disso, estudo realizado por Ünal et al. (2012), avaliando a presença da Leucocidina Pantón-Valentine e resistência de cepas de *S. aureus* provenientes de pequenos ruminantes, demonstrou que 66,6% dos 21 isolados analisados apresentaram o gene para LPV.

As enterotoxinas estafilocócicas (ES) são membros de uma família de mais de 20 diferentes exotoxinas estafilocócicas. Estas proteínas estão associadas a enfermidades em humanos, geralmente intoxicações alimentares e síndrome do choque tóxico (FRASER e PROFT, 2008; PINCHUK, BESWICK, REYES, 2010). O consumo de leite proveniente de rebanhos infectados é um risco potencial à saúde humana, já que geralmente as mastites são subclínicas, ou seja, os animais não apresentam alterações visíveis na glândula mamária e no leite (FAGUNDES E OLIVEIRA, 2004). Em estudo de Brabes et al. (1999), avaliando 87 amostras de leite bovino oriundo de animais com mastite provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais, foram encontrados 18% de isolados apresentando pelo menos um gene que codificava enterotoxinas. Ainda, Unal e colaboradores (2012), encontraram genes relacionados às enterotoxinas em 13,4% das amostras avaliadas, no entanto, nenhum dos isolados expressava mais de um tipo de enterotoxina.

As ES, conhecidas como agentes eméticos, classificam-se como toxinas pirogênicas, além de exercerem atividade de superantígenos (BALABAN et al., 2001). Superantígenos fazem parte de uma classe de proteínas tóxicas que podem provocar a ativação de células T de forma não específica, além da liberação maciça de citocinas. Superantígenos de *S. aureus* incluem várias enterotoxinas, toxina 1 ou toxina do choque tóxico e toxina esfoliativa (FRASER e PROFT, 2008).

Os principais sintomas associados a casos de toxinfecções alimentares

devido à produção de enterotoxinas são náusea, vômito, diarreia e dores abdominais, ocorrendo geralmente de uma a seis horas após a ingestão da toxina (JAY, 2005). As ES mais comuns são ESA e ESB, sendo a primeira mais comumente relacionada a casos de intoxicação alimentar, bem como a ESB. Além disso, ESD é sugerida como a segunda enterotoxina mais importante em casos de intoxicações alimentares em todo mundo, sendo necessárias pequenas quantidades desta para induzir os quadros de intoxicações (LER, LEE e GOPALAKRISHNAKONE, 2006). Já infecções crônicas por *S. aureus* podem estar associadas à capacidade deste micro-organismo em produzir diferentes tipos de enterotoxinas simultaneamente, favorecendo a multiplicação e permanência deste agente no organismo do hospedeiro (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; HAVERI et al., 2007).

#### 2.2.1.3 Adesinas

Fatores de virulência associados à parede celular incluem adesinas, exopolissacarídeos e componentes da parede celular como peptidoglicano e ácido teicoico. *S. aureus* sintetiza duas categorias de adesinas, as proteínas de superfície, designadas por *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs), que parecem ter um papel fundamental na adesão, estando fortemente ligadas ao peptidoglicano, auxiliando na aderência bacteriana às diferentes matrizes extracelulares do hospedeiro como colágeno, fibrinogênio e fibronectina. Este grupo de adesinas inclui a proteína A (Spa), proteínas de ligação à fibronectina, entre outros (CLARKE e FOSTER, 2006). Além da aderência, a proteína A também auxilia na evasão do sistema imune (O'BRIEN et al., 2002), interferindo na resposta do hospedeiro pela sensibilização das células B ou depleção das células B inatas (GOODYEAR e SILVERMAN, 2004; BEKEREDJIAN-DING et al., 2007). Pode ainda, aumentar a agregação de plaquetas e prejudicar a fagocitose por ligação a anticorpos, incluindo IgG, IgA e IgE (O'BRIEN et al., 2002). O principal mecanismo de virulência está associado à ligação às regiões Fc de IgG, recobrando a superfície bacteriana com anticorpos não específicos (na orientação errada), ou seja, interferindo na opsonização e subsequente fagocitose, além de impedir a fixação do complemento (QUINN et al., 2011; RIGBY e DELEO, 2012).

O segundo grupo de adesinas, conhecido como *secreted expanded-repertoire*



*adhesive molecules* (SERAMs), é secretado, permanece parcialmente ligado à parede celular e inclui a proteína adesiva extracelular, proteína extracelular ligadora de fibrinogênio e proteínas da matriz extracelular, tendo como função modular a resposta imune do hospedeiro, inibindo a ação dos leucócitos, alterando a função das células T e impedindo a ação do sistema complemento (HAMMEL et al., 2007).

Em relação ao gene *cna*, codificador da proteína ligadora de colágeno, Smeltzer et al. (1997) relataram que linhagens de *S. aureus* provenientes de animais geralmente não possuem este gene. Resultado similar foi obtido na caracterização e comparação genotípica de isolados de *S. aureus* de amostras humanas, mastite bovina subclínica e de alimentos, sendo que neste estudo houve a detecção deste gene somente em cinco isolados humanos (REINOSO et al., 2008). Ainda existem poucos dados sobre essa adesina e sua atuação no processo de colonização da glândula mamária. No entanto, a investigação da presença do gene *cna*, realizada com 58 isolados de *S. aureus* de mastite bovina comprovadamente positivos para o gene *coa*, demonstrou que 84,5% dos isolados foram positivos para o gene *cna*, justificando pesquisas em relação a novas estratégias para prevenção da mastite, com base no bloqueio da adesão desta bactéria (SAEI, 2012).

Além do papel destas proteínas em relação à ligação aos tecidos do hospedeiro, sugere-se que as adesinas estejam associadas à formação de biofilmes (OTTO, 2008). Além das adesinas de composição proteica, os exopolissacarídeos constituem importantes fatores de virulência em *S. aureus*. A cápsula de polissacarídeos, que está envolvida na proteção bacteriana frente ao sistema imune do hospedeiro, atua através da interferência na fagocitose, favorecendo a sobrevivência bacteriana em neutrófilos (KAMPEN et al., 2005). Um segundo tipo de adesina, denominada adesina polissacarídica intercelular (PIA), está associada à agregação bacteriana e formação de biofilme (GÖTZ, 2002).

#### 2.2.1.4 *Quorum sensing*

Quorum sensing é um mecanismo de comunicação que permite às bactérias ações conjuntas em relação à densidade populacional pela secreção de pequenas moléculas químicas sinalizadoras. Através de um sistema específico de detecção dos sinais químicos, as bactérias vizinhas reconhecem a densidade populacional. Quando a concentração atinge um limite crítico, a expressão do gene cessa e, como

resultado, o comportamento populacional é alterado (BOYEN et al., 2009).

O quorum sensing foi descrito na década de 70, durante a investigação de bioluminescência de *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi* (NEALSON et al., 1970). A partir desta descoberta, tem-se atribuído ao quorum sensing um importante papel em diferentes mecanismos de virulência, dentre estes, destaca-se a formação de biofilme (IRIE e PARSEK, 2008). Esses mecanismos têm sido amplamente estudados em bactérias humanas e bactérias não patogênicas. No entanto, nos últimos anos, estudos têm sido realizados em espécies bacterianas de importância veterinária (BOYEN et al., 2009).

Este sistema ocorre como um importante fator de patogenicidade em determinados micro-organismos, fazendo com que a densidade celular bacteriana aumente antes da expressão de fatores de virulência amplificando sua ação e minimizando a ação das defesas do hospedeiro (de KIEVIT e IGLEWSKI, 2000).

O gene regulador acessório (*agr*) é um dos mais estudados em bactérias Gram positivas, especialmente em *S. aureus*. O locus *agr* consiste em quatro genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a fase estacionária, por um mecanismo autorregulatório que envolve um peptídeo modificado que sinaliza a densidade celular (VUONG et al., 2000). Hemolisinas, enterotoxinas, enzimas e proteínas de superfície são regulados pelo *agr*, estando este associado à patogênese de *S. aureus* (BOYEN et al., 2009).

Cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos, positivas para o gene *agr*, apresentaram capacidade significativamente aumentada para persistir na glândula mamária (BUZZOLA et al., 2007). Com isso, acredita-se que a formação de biofilmes associada à comunicação através do sistema *quorum sensing* pode favorecer a disseminação de cepas de *S. aureus* dentro do rebanho, causando infecções crônicas (TRABER et al., 2008).

#### 2.2.1.5 Biofilmes

Biofilme é uma comunidade microbiana séssil, caracterizada por células irreversivelmente ligadas a um substrato, incorporadas em uma matriz de polímero extracelular produzido pelos micro-organismos, apresentando fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes (DONLAN e COSTERTON, 2002). Este arranjo é associado à troca de material genético, patogenicidade e

resistência aos antimicrobianos (SOTO et al., 2006). A matriz de biopolímeros extracelulares de natureza polissacarídica ou proteica, conhecida como glicocálice, constitui-se em uma estrutura composta de diversas fibras de polissacarídeo ou proteínas globulares, contendo de 98% a 99% de água, o que protege as células da desidratação (FIGUEIREDO, 2000).

A adesão superficial dos micro-organismos forma o glicocálice (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000), além disso, os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, formando uma espécie de crosta, sob a qual os micro-organismos se multiplicam em cultivo puro ou em associação com outras espécies (RICHARD et al., 2003; MARQUES, 2005).

Devido ao seu tamanho e agregação, os biofilmes não são suscetíveis aos macrófagos e são resistentes a diversos antimicrobianos (CUCARELLA et al., 2004). Os mecanismos responsáveis pela resistência bacteriana quando estas crescem em biofilme podem estar relacionados ao atraso na penetração das drogas antimicrobianas na matriz do biofilme, taxa de crescimento bacteriano alterada ou ainda outras alteração fisiológicas (DONLAN E COSTERTON, 2002). Além disso, pode ocorrer a transferência horizontal de genes de virulência e resistência (WUERTZ et al., 2004).

Dentre as teorias sobre a formação dos biofilmes, Marques (2005) sugere que a formação ocorra em cinco etapas: preparo da superfície pela ligação de material orgânico, transporte de células e nutrientes para o local de aderência, adesão bacteriana inicialmente reversível, multiplicação bacteriana e adesão irreversível.

A formação do biofilme ocorre a partir da ligação inicial da bactéria a uma superfície sólida, mediada pela produção de um polissacarídeo capsular (PS/A), seguido da multiplicação bacteriana e acúmulo de grupos de células em multicamadas para a formação final do biofilme, que está associado à produção da adesina polissacarídica intercelular (PIA). O locus de adesão intercelular (*ica*) é formado pelos genes *icaADBC* que codificam as proteínas mediadoras da síntese do PIA e PS/A em espécies de *Staphylococcus* (MCKENNEY et al, 1998;. CRAMTON et al, 1999). Este gene é regulado em resposta a fatores ambientais tais como teor de glicose, anaerobiose, falta de ferro, alta osmolaridade e temperatura, sendo este gene considerado fundamental para a formação dos biofilmes e resistência dos micro-organismos (O' TOOLE et al., 2000; STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

Esta estrutura de crescimento foi observada em diversos patógenos de

interesse veterinário, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* (CLUTTERBUCK et al., 2007). Em casos de mastite, a presença de biofilmes em *S. aureus* e *S. epidermidis* está relacionada à cronicidade da infecção (MELCHIOR et al., 2006).

#### 2.2.1.5.1 Formação de biofilme em *Staphylococcus aureus*

Como discutido anteriormente, *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de mastite contagiosa em bovinos, podendo apresentar-se de forma subclínica, clínica e crônica (MELCHIOR et al., 2011). O tratamento desta enfermidade geralmente é baseado na utilização de antimicrobianos, sendo aconselhável a realização prévia do teste de antibiograma. No entanto, tem sido verificada uma discrepância entre os resultados *in vitro* e a eficácia dos antimicrobianos utilizados *in vivo* (MELCHIOR et al., 2006). Tais infecções muitas vezes são resistentes à terapia com antimicrobianos, sugerindo que a capacidade do *S. aureus* de crescer na forma de biofilme está associada ao curso crônico das mastites causadas por este agente (MELCHIOR et al., 2006; MELCHIOR et al., 2007).

Cepas multiplicando-se na forma de biofilme diferem *in vivo* em sua capacidade de disseminação nos rebanhos (SMITH et al., 1998), em sua capacidade de causar a elevação na CCS, mastite clínica ou infecções persistentes (HAVERI et al., 2005), além de perdas de produção de leite (MIDDLETON e FOX, 2001). Existem evidências crescentes de que *S. aureus* pode formar biofilmes no úbere de vacas que apresentam quadros de mastite causada por este agente, sendo que o crescimento na forma de biofilme prejudica a ação do sistema imune do hospedeiro, bem como reduz a ação dos antimicrobianos, permitindo a persistência das infecções (MERCHIOR et al., 2009). O estudo demonstrou, ainda, que cepas de *S. aureus* produtoras de biofilme têm capacidade invasiva *in vitro*, em células epiteliais da glândula mamária de bovinos, maior quando comparadas às cepas não produtoras de biofilme (OLIVEIRA et al., 2011).

A implicação dos biofilmes em infecções crônicas despertou interesse crescente na caracterização de genes relacionados à sua formação (CAIAZZA e O'TOOLE, 2003; LIM et al., 2004; TORMO et al., 2005B). Diversos genes podem estar envolvidos na capacidade individual de cada cepa em formar biofilmes. Dentre

estes podemos citar o *agr* (gene regulador acessório), *trap* (GILOT et al., 2002; GILOT e VAN LEEUWEN, 2004), o gene *ica* (adesão intercelular), *bap* (proteína associada a biofilme) entre outros (CRAMTON et al., 1999; CUCARELLA et al., 2004; KOZITSKAYA et al., 2004). Os genes *agr*, *trap* e *ica* estão envolvidos no mecanismo de comunicação entre os micro-organismos, conhecidos como *quorum sensing* (MELCHIOR et al., 2009).

O gene *ica* é relacionado ao mecanismo de formação de biofilmes mais estudado em *Staphylococcus* sp. e geralmente apresenta-se em isolados clínicos de humanos, assim como de casos de mastite bovina (O`GARA, 2007). O “cluster” *icaADBC*, presente em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* participa da formação de biofilmes pela codificação de proteínas envolvidas na síntese da matriz de polissacarídeos, chamada PIA/PNAG (SADYKOV et al., 2008; ZHU et al., 2009).

Dentre os genes *ica*, *icaA* e *icaD* desempenham importante papel na formação de biofilme em *S. aureus* e *S. epidermidis*. O gene *icaA* codifica a N-acetilglucosaminil transferase, uma enzima envolvida na síntese de N-acetilglicosamina a partir de UDP-N-acetilglucosamina (ARCIOLA et al., 2001). Além disso, *icaD* tem sido associado à expressão de N-acetilglicosaminiltransferase, levando à expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (GERKE et al., 1998).

Embora a base genética e fenotípica para a produção de biofilmes tenha sido bem caracterizada em várias espécies de estafilococos em infecções associadas à presença de próteses, existem poucos estudos em relação à produção de biofilmes em isolados de *S. aureus* de mastite bovina (VASUDEVAN et al., 2003; MELO, 2008; MELCHIOR et al., 2009; MILANOV et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

#### 2.2.1.5.2 Detecção da formação de biofilme em *Staphylococcus aureus*

A capacidade de formação de biofilmes pode ser inferida fenotipicamente pelo cultivo dos isolados de *S. aureus* em meio de cultura Ágar Vermelho Congo. Cepas com capacidade de formar biofilmes apresentam-se na forma de colônias de cor preta, enquanto cepas sem a capacidade para formar biofilmes apresentam-se na forma de colônias de cor rosa ou vermelha (GRECO et al., 2008). Outra técnica para avaliação fenotípica da formação de biofilmes é a aderência em microplacas (MERINO et al., 2009).

Freeman, Falkiner e Keane (1989), propuseram o Agar Vermelho Congo como método alternativo para detectar a produção de biofilme. No entanto, Çiftci et al. (2009), afirmam que o Agar Vermelho Congo, apesar de ser um teste facilmente realizado em laboratório, ainda se constitui em um método ineficiente para a determinação da capacidade de produção de biofilme por isolados clínicos. Além disso, Mathur et al. (2006), avaliando a produção de biofilme por *Staphylococcus* sp., encontraram apenas 1,97% de isolados positivos no Agar Vermelho Congo, não recomendando o método para a detecção de formação de biofilme em isolados de *Staphylococcus* sp.

Em relação ao teste de aderência em placas Vasudevan et al. (2003) encontraram 68,57% dos isolados produtores de biofilmes pela aderência em placas, no entanto no estudo genotípico, 100% dos isolados possuíam os genes *icaA* e *icaD*, demonstrando que o teste de aderência não apresentou boa concordância com o teste genotípico.

Vários estudos indicam que o “locus” *ica* pode ser um importante marcador, diferenciando cepas patogênicas de cepas contaminantes (ROHDE et al., 2004; LI et al., 2005), pois a maioria dos isolados clínicos de *S. aureus* contem o operon *ica* (ROHDE et al., 2004).

Com isso, enfatiza-se a importância de técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do biofilme, pois estas representam ferramentas de identificação precisas de cepas virulentas formadoras dessa estrutura (ARCIOLA et al., 2002).

### 2.3 CARACTERIZAÇÃO DE GRUPOS CLONAIIS DE *S. aureus*

Devido ao seu papel primário na etiologia da mastite, dificuldade de controle e facilidade em desenvolver resistência aos antimicrobianos, *S. aureus* tem sido objeto de estudos epidemiológicos (BARKEMA et al., 2006; PLATA et al., 2009). Esses, por sua vez, têm utilizado técnicas moleculares na discriminação de grupos clonais de *S. aureus*, tais como fagotipagem, ribotipagem, análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), análise do conteúdo plasmidial, polimorfismo do gene *coa*, macrorestrição do DNA total, seguidas da separação dos fragmentos por meio de eletroforese de campo pulsado (PFGE), entre outras (ZADOKS et al., 2002; MORK et al., 2005; ARGUDÍN et al., 2010).

Métodos moleculares são eficientes por diferenciarem isolados fenotipicamente idênticos, sendo portanto, ferramenta útil na epidemiologia molecular (OLIVEIRA e DE LENCASTRE, 2002).

Embora diferentes técnicas moleculares estejam disponíveis para diferenciação de *S. aureus*, nenhum método é superior em todas as condições. A utilização da fagotipagem pode ser limitada pela baixa reprodutibilidade dos resultados e pela ocorrência de cepas de *S. aureus* não tipáveis por este método. A análise do conteúdo plasmidial está limitada às cepas que carregam plasmídeos, sendo assim, esta técnica torna-se bastante instável (DARINI et al., 1998).

A técnica de ribotipagem é utilizada com sucesso para tipagem bacteriana (SCHLICHTING, 1993), no entanto, não é a metodologia mais indicada por apresentar um poder discriminatório menor que outras técnicas (SOLH et al., 1990; PREVOST et al., 1992). O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é um método de tipagem bacteriana que auxilia na caracterização de clones e estudos de evolução de *S. aureus* em determinada população de cepas, no entanto, o MLST captura a estrutura populacional em grande escala de uma espécie, mas é incapaz de discriminar os isolados proximamente relacionados (ENRIGHT et al., 2000; COOKSON et al., 2007).

O *Spa-typing*, por sua vez, consiste na análise da sequência do DNA da região polimórfica repetida do gene da proteína A do *S. aureus* (*spa*) (COOKSON et al., 2007). A proteína estafilocócica A é uma proteína de superfície que auxilia na evasão do sistema imune do hospedeiro por se ligar em fragmentos Fc das imunoglobulinas G, evitando a fagocitose (ATKINS et al., 2008). É uma técnica que envolve uma única região do cromossomo, sujeita à recombinação entre clones independentes, enquanto a PFGE e o MLST analisam várias regiões do cromossomo, representando, portanto, uma ferramenta intermediária em relação à discriminação de clones (HARMSEN et al., 2003; COOKSON et al., 2007).

A macrorestrição do DNA total, por meio da clivagem com enzimas de corte raro, seguida da separação dos fragmentos por meio de eletroforese de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE), tem sido uma das técnicas mais utilizadas para esse propósito (TENOVER et al., 1995; LANGE et al., 1999; STROMMINGER et al., 2006; ISHINO et al., 2007).

A PFGE é considerada a técnica referência devido ao alto poder discriminatório e reprodutibilidade, com poder de detectar pequenas mutações ou

rearranjos (ANDERSON e LYMAN, 2006; LAPLANA et al., 2007), além de ser um bom método para estabelecer relações clonais em estudos epidemiológico-moleculares (TENOVER et al., 1995; ZADOKS et al., 2002). Em estudos comparando a PFGE com outras técnicas para caracterização de grupos clonais (HENNEKINNE et al., 2003; HATA et al., 2006), a PFGE apresentou o melhor poder discriminatório. A enzima de restrição *Sma*I é a mais utilizada nestes estudos, pois gera perfis de fácil interpretação com 13 a 17 fragmentos de 20 à 750kb (TENOVER et al., 1996; FARIA et al., 2008). Com isso, a PFGE é considerada a técnica “padrão ouro” para tipagem de *S. aureus* (BANNERMAN et al., 1995; PREVOST et al., 1992).

Os padrões de restrição obtidos em diferentes isolados são comparados para determinar a sua relação (TENOVER et al., 1995). O padrão de PFGE dos isolados de um surto deve ser indistinguível entre si e distinguível quando comparado com cepas de um surto diferente (HALEY et al., 1995). Da mesma forma, o resultado de análise com esta técnica demonstrou que poucos clones são responsáveis pelos casos de mastite em bovinos (DENDANI et al., 2010).

Uma considerável heterogeneidade genética foi demonstrada em populações naturais de *S. aureus*. Esta variedade tem contribuído para a emergência de diferentes perfis epidemiológicos, dependentes da cepa prevalente em determinado rebanho (SILVA e SILVA, 2005).

## 2.4 RESISTÊNCIA DE *S. aureus* AOS ANTIMICROBIANOS

O tratamento antimicrobiano é uma ferramenta importante no controle da mastite, pois reduz o número de animais acometidos em um rebanho. No entanto, segundo Brito et al. (2001), estudos têm demonstrado aumento nos índices de resistência de *S. aureus* frente aos principais antimicrobianos comumente utilizados para tratamento dos casos de mastite. Estudo realizado com isolados de *S. aureus* provenientes de rebanhos do estado do Rio de Janeiro demonstrou altos índices de resistência à penicilina e ampicilina (55,1%), provavelmente devido à ampla utilização destes fármacos em casos de mastite bovina (RABELLO et al., 2005). Além disso, Zafalon et al. (2008) encontraram elevadas taxas de resistência à penicilina, quando avaliaram amostras de leite de estabelecimento do Estado de São Paulo.

Além do exposto, existem relatos da ocorrência de enfermidades em



humanos causadas por cepas de *S. aureus* de origem animal, multirresistentes, tornando importante a avaliação da suscetibilidade dos isolados deste agente em relação aos antimicrobianos. O crescente número de isolados multirresistentes provenientes de casos de mastite, mundialmente distribuídos, é um grave problema que acarreta em aumento nos custos de tratamento e maior possibilidade de transmissão dentro dos rebanhos devido à permanência da bactéria (SABOUR et al., 2004; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004)

*S. aureus* possui uma grande capacidade de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Inicialmente, com a utilização da penicilina, ocorreu uma diminuição nos casos de enfermidades graves associadas a este agente. No entanto, em pouco tempo surgiram cepas resistentes a este princípio ativo. Com isso, foram introduzidos novos antimicrobianos para o tratamento das infecções relacionadas à *S. aureus*, tais como a meticilina. No entanto, da mesma forma, rapidamente surgiram cepas resistentes a este antimicrobiano, conhecidas como *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (WEESE, 2010).

A resistência à meticilina ocorre pela presença do gene *mecA*, que produz modificação nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), proteínas de membrana envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana. Os beta-lactâmicos, que interagem com as PBPs, impedem a formação completa da camada de peptidoglicano da parede celular, desencadeando a morte bacteriana (KATAYAMA, ZHANG, CHAMBERS, 2004). No entanto, a presença do gene *mecA* codifica uma nova proteína alvo, a PBP2a, conferindo uma baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (AARESTRUP et al., 2001). Além disso, não raramente, são descritos isolados MRSA também resistentes a outras classes antimicrobianas, dificultando o tratamento das infecções (WEESE, 2010).

O surgimento de cepas MRSA em hospitais humanos na década de 60 foi considerado como casos restritos, mas no final da década de 70 e início da década de 80, o número de casos aumentou, gerando preocupação na comunidade médica (CHAMBERS e DELEO, 2009). No entanto, na década de 90, houve o surgimento de casos de enfermidades causadas por cepas MRSA na comunidade, chamadas de CA-MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina associados à comunidade), sendo os primeiros relatos associados a cepas inicialmente descritas em pessoas enfermas e que haviam sido atendidas em hospitais. Mais tarde,

passaram a surgir casos de infecções por CA-MRSA, alguns destes fatais, em pessoas sem fatores de risco e sem histórico de atendimento em unidades de saúde (DIEDEREN e KLUYTMANS, 2006; FRAZEE et al. 2005 a,b). Com isso, MRSA tem sido considerado como principal causador de infecções graves de pele e pneumonia associadas à comunidade em algumas regiões (FRAZEE et al., 2005 a,b; MILLER et al., 2005).

O contato próximo entre humanos e animais, bem como a utilização indiscriminada dos antimicrobianos para tratamento de afecções nas espécies animais, fez com que surgissem cepas MRSA em populações animais. No entanto, o mecanismo exato de transmissão ainda não está totalmente esclarecido (WEESE, 2010).

Embora o primeiro isolado de MRSA tenha sido identificado a partir de amostras de bovinos com mastite (DEVRIESE, VAN DAMME e FAMAREE, 1972), somente casos esporádicos, com baixa prevalência de mastite bovina associada a cepas MRSA têm sido descritos. Estudo realizado na Turquia identificou diferentes isolados MRSA Panton-Valantine negativos provenientes de amostras de leite bovino (TURKYILMAZ et al., 2009). Ainda, Monecke et al. (2007), avaliando isolados de *S. aureus* de bovinos na Alemanha, encontraram apenas duas cepas MRSA dentre os 128 isolados estudados.

Estudos recentes têm mostrado que existe similaridade genética entre isolados de MRSA oriundos de alimentos, animais, incluindo vacas leiteiras, e isolados de seres humanos, sugerindo transmissão de cepas resistentes entre espécies (MOON et al., 2007). A transmissão de MRSA via leite é facilmente minimizada pela pasteurização, sendo os casos de contaminação alimentar geralmente associados a alimentos contaminados pelos manipuladores (JONES et al., 2002). No entanto, os elevados índices de resistência de *S. aureus* aos principais antimicrobianos utilizados para tratamento de enfermidades de animais e humanos representam um problema em nível mundial, sendo importante o controle e prevenção de enfermidades causadas por este agente (COELHO et al., 2007).

### 3. ARTIGO

#### **Clonal groups and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* on small dairy farms in southern Brazil**

##### **ABSTRACT**

*Staphylococcus aureus* is the primary microorganism associated with bovine contagious mastitis. Chronic infections can be caused by bacterial growth in the form of biofilms, which are associated with the persistence of the bacteria in the mammary gland and resistance to various antibiotics. Epidemiological studies employing techniques such as macro-restriction followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) have been performed to identify clones and characterize *S. aureus* infections. The objectives of this study were to assess the frequency of *S. aureus* isolation in milk samples collected periodically in a group of dairy farms from Taquari Valley, RS; evaluate the profile of antimicrobial susceptibility of identified *S. aureus* isolates; classify these isolates into clonal groups; assess the distribution and the persistence of clonal groups in dairy herds over time and verify the presence of genes related to biofilm formation (*icaA* and *icaD*) and the *mecA* gene. Milk samples were collected from all lactating cows from 21 dairy farms every six months for two years, totaling 1060 samples. The presence of *S. aureus* in the samples was detected by isolation and identification. Confirmed isolates were tested for susceptibility to thirteen antimicrobials using the disk diffusion technique. The isolates also underwent macro-restriction of total DNA followed by PFGE and were subsequently tested using polymerase chain reaction (PCR) to detect *icaA* and *icaD*. Coagulase-negative *Staphylococcus* sp. was identified in 262 samples, and *S. aureus* was identified in 136 samples. The frequency of *S. aureus* isolation ranged from 3.45% to 70.59% in 17 herds in which this agent was present. Most *S. aureus* isolates (75.7%) were sensitive to all antimicrobials; most frequently, penicillin (18.2%) and ampicillin (14.4%) resistance were observed. In 27.3% of *S. aureus* isolates, genes associated with biofilm formation were detected, of which *icaD* was the most prevalent, followed by the presence of both *icaA* and *icaD*. The 122 isolates cleaved by *Sma*I and submitted for PFGE were classified into 38 clonal groups. There were few persistent clonal groups; only six groups were described

consecutively in at least two time points. There is a large variety of pulsotypes among isolates on these farms, but few clonal groups persist over time. However, long-term persistence was not associated with the presence of *icaA* and *icaD* or a profile of antimicrobial resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, clonal group, antimicrobial resistance, biofilm.

### 3.1 INTRODUCTION

Brazil is one of the largest bovine milk producers in the world; in 2011, the country produced 21.6 billion liters of milk (IBGE, 2012). Most of the dairy farms and milk production are concentrated in the southern and southeastern regions. In southern Brazil, small dairy farms based on family labor contribute with a large amount of the total produced milk. These independent farmers are usually engaged in cooperatives that own processing plants, where the milk is pasteurized, packed and distributed.

Mastitis is an important cause of decreased milk production in dairy farms, accounting for 12-15% of profit losses for the dairy industry in Brazil (Reis et al., 2005). *Staphylococcus aureus* is the most important cause of contagious mastitis in dairy cattle (Aires-De-Sousa et al., 2007). Chronic infection caused by *S. aureus* predominates in affected herds as a result of persistent bacterial colonization of the mammary tissue and the failure of antimicrobial treatment (Boyen et al., 2009).

In chronically infected herds, few clones are believed to be involved in mastitis cases (Dendani et al., 2010); thus, the identification of these clones by molecular techniques, such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), should be considered to elucidate the transmission routes occurring on farms (Smith et al., 2005, a, b).

Antimicrobial therapy is one method for mastitis control in dairy herds. However, the increase in the resistance rates against routinely used drugs has hampered the success of these treatments (Brito et al., 2001; Fagundes and Oliveira, 2004). Thus, monitoring antimicrobial resistance profiles at the herd level is important to achieve better control of mastitis (Platform et al., 2009).

One important constraint of dairy cooperative system in Brazil is the lack of technical assistance, leading to failures in animal management and mastitis control (Bitencourt et al., 2000). Small-scale production may influence the profile of pathogen transmission and resistance, resulting in an epidemiological scenario quite different

from those occurring in dairy farms with large-scale production. Therefore, the objective of this study was to assess the distribution over time and antimicrobial resistance profile of *S. aureus* clonal groups in small dairy farms of southern Brazil.

## 3.2 MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1 Selection of Herds and Sampling

The study population consisted of 1,185 small dairy herds associated to one cooperative located in Taquari Valley. This is a region of approximately 4,821 square kilometers located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (UTM zone 22S, 6.69.000N, 350.000E, 6.830.000N, 450.000E).

Firstly, farms were stratified according to the average number of cows in lactation ( $\leq 10$ , 11-15, 16-20, 21-25 and  $\geq 25$ ). Afterwards, the sample size was calculated, taking into account an expected 20% of *S. aureus* isolation (Brito et al., 2001), and a precision of 10% at the 95% confidence level. According to these parameters, a total of 21 farms were required to obtain the number of *S. aureus* isolates necessary to the study. The number of farms of each stratum to be included in the study was determined such that their representativeness in the target population was maintained (80% of farms with  $\leq 15$  cows in lactation). In each stratum, farms to be sampled were randomly selected using Microsoft Excel 2010 software.

All farms were sampled every six months in 2010 and 2011. At each sampling event, milk samples were collected from all lactating cows in the herd. Animals that were receiving antimicrobial treatment were excluded from sampling. Farms included in the study population are depicted in Table 1, along with the main characteristics of each herd. Jersey and Holstein were the predominant animal breeds on these farms.

### 3.2.2 Origin and Collection of Samples

The procedures for the collection and transport of milk samples and the isolation and identification of the causative agents of mastitis followed the recommendations of National Mastitis Council (2004). Milk samples were collected before milking. The teats were washed and dried individually with disposable paper

towels before sampling. The first three streams of milk were discarded, and the teats were then disinfected with 70% alcohol. A composite sample of milk from all teats of each cow was collected in one sterile screw-cap flask. Samples were transported under refrigeration to the laboratory for processing.

### **3.2.3 Isolation and Identification of *S. aureus***

Ten microliters of each milk sample was streaked onto 5% sheep blood agar and incubated at 37 °C for 24 - 48 hours. After incubation, predominant colonies (at least three colonies present on the agar plate) with similar morphology were isolated and identified as described previously (NMC, 2004). Identifications were confirmed using the tube coagulase and Voges-Proskauer (VP) tests. Isolates exhibiting results compatible with the *S. aureus* designation except for the VP test result were classified as *Staphylococcus* coagulase positive, as recommended by the NMC (2004).

### **3.2.4 Macro-restriction of the total DNA and Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)**

One isolate of *S. aureus* from each positive cow was submitted to macro-restriction and PFGE. Total DNA was prepared according to the protocol proposed by McDougal et al. (2003). Initially, 200 µl aliquots of an overnight culture of each strain was centrifuged, and the pellet was resuspended in 300 µl of Tris-EDTA solution (pH 8.0) and incubated in a water bath at 37 °C for 10 min. DNA-soaked agarose plugs were submitted to treatment with lysostaphin (4 µL, 1:10 dilution of 1 mg / mL). The solidified plugs were transferred to 3 mL of buffer lysis solution (6 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij-58, 0.2% sodium deoxycholate, and 0.5% sodium-lauryl-sarcosine) and incubated at 37 °C in a water bath with stirring for 4 h or overnight. The plugs were washed four times with TE solution (10 mM Tris and 1 mM EDTA, pH 8.0) for 10-15 min each and stored at 4°C.

Next, a DNA-plug portion was submitted to digestion with 20 U of the enzyme *Sma*I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 2-3 hours at 25°C. Electrophoresis was performed in a 1% agarose gel using 0.5X Tris-borate-EDTA buffer with a CHEF DR-II system (BioRad Laboratories, Hercules, CA) at 6 V/cm for 20 h at 14 °C with an

initial switching time of 5 seconds and a final switching time of 40 seconds. *Salmonella* Braenderup (ATCC# BAA-664) was included as a size reference. After PFGE, the gel was stained with ethidium bromide (2 µg/mL, Sigma, St. Louis, USA) and photographed under UV transillumination, and image digitalization was performed using a Kodak 2200 system (Rochester, New York, USA).

### 3.2.5 Test for Antimicrobial Susceptibility

Isolates of *S. aureus* were tested for antimicrobial susceptibility using the disk diffusion test in Müller-Hinton agar (Oxoid, Thermo Scientific, UK), according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards International document M31-A3 (2008). The following antimicrobial disks (Oxoid, Thermo Scientific, UK) were selected: ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), cefoxitin (30 µg), ceftiofur (30 µg), clindamycin (2 µg), enrofloxacin (5 µg), streptomycin (10 µg), gentamicin (10 µg), oxacillin (10 µg), penicillin (10 IU), sulfonamide (300 µg), sulfa + trimethoprim (25 µg) and tetracycline (30 µg). *S. aureus* ATCC 25923 was used as the quality control.

### 3.2.6 Detection of Genes *icaA*, *icaD* and *mecA*

DNA was extracted after disrupting the bacterial cell wall with guanidine EDTA-sarkosyl as described by Rademaker and De Bruijn (1997). Polymerase chain reaction (PCR) detection of the genes *icaA* and *icaD* was performed according to Vasudevan et al. (2003). PCR for *icaA* and *icaD* detection included 4 µl of the DNA suspension in 11 µL of the PCR mix containing 20 pmol/µL of each primer (*icaA* R: AAG ATA TAG CGA TAA GTG C; *icaA* F: CCT AAC TAA CGA AAG GTA G; *icaD* R: GGC AAT ATG ATC AAG ATA C; *icaD* F: AAA CGT AAG AGA GGT GG), 2.5 mM DNTPs, 1.5 µL of 10X PCR buffer (750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.1% Tween20) and 0.3 µL *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Foster City, CA, USA) at 5 U/µL. The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 2 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing for 45 s at 49.8°C, a 1 min extension at 72°C and a final extension of 7 min at 72°C. In all reactions, negative controls (without target DNA) were used, and the strain *S. aureus* ATCC 25923 was used as a positive control. Aliquots of the reactions were separated on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (2 µg/mL, Sigma, St.

Louis, USA), and the image was captured and digitized using the Kodak 2200 system (Rochester, New York, USA).

Isolates that were resistant to oxacillin or cefoxitin in the agar diffusion test were checked for the presence of the *mecA* gene as described by Murakami et al. (1991). The reactions had a total volume of 50  $\mu$ l composed of 45  $\mu$ L of PCR MasterMix, 1  $\mu$ L of each primer (*mecA* F: AAA TCG ATG GTA AAG GTT GGC; *mecA* R: AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C) and 1  $\mu$ L of template DNA. DNA amplification was performed for 40 cycles as follows: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 min with a final extension at 72°C for 5 min. Ten microliters of PCR product was analyzed using 2% agarose gel electrophoresis. The reactions were performed in a GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *S. aureus* ATCC 25923 was used as a negative control for the *mecA* gene. A *mecA*-positive strain of *S. epidermidis* received from G. M. Costa (Federal University of Lavras, Lavras, Brazil) was used as positive control.

### 3.2.7 Data Analysis

Pulsotypes were compared using the Gel-Compar II software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Dendrograms were constructed using the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the Dice coefficient. The pulsotypes were analyzed and defined following the recommendations of Tenover (1995). The amplification frequency of genes involved in biofilm formation was compared between clonal groups using Fisher's exact test with a significance level of  $P < 0.05$ .

## 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.3.1 Isolated Microorganisms

From a total of 1,060 milk samples originating from 21 farms, 395 samples (37.2%) tested negative for bacterial growth. In 19 farms (90.5%), at least one positive sample was obtained at all four time points, while two farms presented no bacteria isolation in two samplings. Coagulase-negative *Staphylococcus* sp. was



isolated from 262 samples (24.71%), followed by *S. aureus* from 136 samples (12.83%), and coagulase-positive *Staphylococcus* sp. from 28 samples (2.64%). Other microorganisms (*Corynebacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Nocardia* sp., *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella* sp., yeast and *Escherichia coli*) were isolated from the remaining 239 samples (22.54%; Table 2).

The most prevalent bacteria were coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN), which can colonize the udder without causing illness. Nevertheless, in many regions around the world, SCN has become the predominant bacteria in milk samples from cows and heifers, and their significance as a mastitis pathogen is under debate (De Vliegher et al., 2012). Because composite milk samples in this study were collected from all lactating cows, independent of the presence of any milk alteration, there is no way to confirm the role of SCN as a causative agent of mastitis in the region sampled.

On the other hand, the second most isolated species was *S. aureus*, which was found in 12.8% of the total of samples analyzed. *S. aureus* is a major mastitis pathogen and one of the most difficult udder pathogens to control (De Vliegher et al., 2012). Studies that investigated *S. aureus* in milk and dairy products reported prevalences between 4.2% and 6.25% (Mork et al., 2012; Thaker et al., 2013). However, higher rates have been reported in studies conducted in herds with high prevalence of subclinical mastitis. In these herds, over 20% of cows were infected with *S. aureus*, and the persistence of infection over time was commonly observed (Ferguson et al., 2007; Capurro et al., 2010). In Brazil, *S. aureus* is widespread in herds. Ferreira et al. (2007) found *S. aureus* prevalence of 21.5%, and conclude that this pathogen was the main cause of subclinical mastitis in the region. Additionally, *S. aureus* (44.0%) was found to predominate in clinical cases (Martins et al., 2010).

In the present study, *S. aureus* was isolated in 17 of the 21 farms sampled, at frequencies ranging from 3.4% to 70.6% of the positive samples (Table 3). Among the *S. aureus*-positive farms, in 14 farms isolates were obtained in two or more samplings, and five farms were positive in all four samplings. The presence of chronically infected cows in the herd is one of the main risk factors for the perpetuation and spread of this pathogen to susceptible animals (Barret, 2002). The segregation of animals with *S. aureus* is a practice that can reduce the risk of transmission of this agent among cows in dairy herds. However, the correct and efficient identification of infected animals, which is not often conducted on farms with

low technical standards, is required. Data from a longitudinal study conducted in Egypt also identified *S. aureus* in 52.5% of milk samples (Rady and Abdel-Sayed, 2009.) In this case, the animals were raised on different farms but under similar conditions. In our study, however, farms presented a high diversity in management, hygiene and infrastructure. The heterogeneous profile among farms characterizes many cooperatives in southern Brazil and contributes to the difficulty of mastitis control in this region. However, we observed that most farms failed to maintain prescribed hygiene before and after milking (Table 1), which may allow the continued presence of *S. aureus* on the skin of the udder and facilitate its access to the mammary gland.

### 3.3.2 Test for Antimicrobial Susceptibility

From a total of 132 isolates of *S. aureus* tested using the disk diffusion method, the majority (75.7%) were susceptible to all tested antimicrobials. Resistance was detected to penicillin (18.2%), ampicillin (14.4%), clindamycin (9.1%), sulfonamide (8.3%), tetracycline (8.3%), streptomycin (6.1%), cephalothin (5.3%), enrofloxacin (5.3%), ceftiofur (1.5%) and gentamicin (1.5%). All strains were susceptible to sulfa/trimethoprim. The rates of susceptibility to antimicrobial agents presented in this study corroborate the study of Anderson et al. (2006), which found 86% of *S. aureus* isolates to be susceptible to all antimicrobials tested. Similar results were reported in Brazil by Ferreira et al. (2006), who found that 75.3% of isolates were susceptible to antimicrobials. Resistance to penicillin and ampicillin usually predominates and can reach frequencies above 70% (Unakal and Kaliwal, 2010). In Brazil, Coelho et al. (2007) reported a high resistance to penicillin (67.7%) and ampicillin (64.4%), while Rabello et al. (2005) identified 55.1% of strains resistant to penicillin/ampicillin.

Regarding cefoxitin and oxacillin, 8.4% and 7.6% of isolates, respectively, were resistant in the agar diffusion test. Resistance to oxacillin mediated by the *mecA* gene can be tested by broth microdilution or by the disk diffusion test using oxacillin and cefoxitin disks (CLSI, 2008). However, the phenotypic results often do not corroborate the results of *mecA* detection. In the present study, all isolates that were resistant to oxacillin also showed resistance to cefoxitin in the disk diffusion test, however none carried the gene *mecA* and were thus considered susceptible.

In addition to the one hundred isolates that were susceptible to all antimicrobials, 14.4% (19/132) presented profiles with a low number of resistance markers ( $\leq 2$ ). The most prevalent resistance profile was to ampicillin and penicillin, observed in 10 isolates (7.6%). Eleven isolates (8.3%) were resistant to three or more classes of antimicrobial agents and were considered multi-resistant. These isolates were found on seven farms (G, I, K, M, N, O and P). No farm presented a common resistance profile among isolates from the four samplings. Several studies report *S. aureus* multi-resistance (Baptiste et al., 2005); however, most of them were conducted in farms with high milk production that use antimicrobial therapy as a tool for subclinical mastitis control. The low rate of resistance and multi-resistance in our study may be associated with the fact that the isolates may not have been subjected to strong selection pressure, as treatment was only performed on clinically affected animals. As a result, there was a tendency of persistence of *S. aureus* infections due to the lack of dry-period treatment and mastitis control programs, but the strains presented low resistance profiles.

### 3.3.3 Identification of Genes *icaA* and *icaD*

Biofilm-producing strains of *S. aureus* have a greater ability to colonize the mammary gland, as adhesion to surfaces is an important step in the establishment of persistent infections (Cucarella et al., 2004; Fox et al., 2005). An *in vivo* study demonstrated the ability of this agent to persist in the mammary gland of cattle, increasing therapeutic failure and chronic infections, despite *in vitro* results suggesting antimicrobial susceptibility (Melchior et al., 2011). In the present study, among the 132 isolates tested for genes *icaA* and *icaD*, which are associated with biofilm formation in *S. aureus*, only 27.3% presented one or both of the genes. The gene *icaD* alone was the most prevalent (14.4%), followed by the presence of both genes (8.3%), while *icaA* alone was the least frequent (4.5%).

The presence of *icaA* alone induces low biofilm formation, while the concomitant presence of *icaA* and *icaD* markedly increases the biofilm-forming phenotype (Arciola et al., 2001). Dhanawade et al. (2010) detected both genes in 35 out of 102 *S. aureus* isolates from subclinical mastitis. Furthermore, Melo et al. (2012) found 95.7% of *S. aureus* isolates positive for *icaA* and *icaD*. In our study, *S. aureus* isolated from farms with four positive samplings were more likely to be

positive for the *ica* genes compared to strains originating from the other farms (32.2%;  $p=0.078$ ). The presence of biofilms has also been considered important for the persistence of antimicrobial-resistant *S. aureus* strains (Türkyilmaz and Eskiizmirli, 2006). However, in our study, no relationship could be found between the presence of genes *icaA* and *icaD* and the resistance of the isolates to antimicrobials. The number of positive strains was too low to draw any conclusions about the relevance of *ica* genes, and further studies are needed to elucidate the role of these genes in *S. aureus* circulating in this region.

### 3.3.4 Clonal Groups of *S. aureus*

The presence of *S. aureus* in milk samples over the sampling period may be related to the existence of persistently infected animals in the herd. After performing macro-restriction and PFGE in the *S. aureus* isolates and using the criteria proposed by Tenover (1995), which considered strains with similarity  $\geq 70\%$  as a pulsotype, we classified 122 strains into 30 pulsotypes (Figure 1 and Table 4). Ten isolates from distinct sources were not cleaved by the enzyme *Sma*I.

The diversity of pulsotypes was high, since 18 out of 30 pulsotypes were detected in only one farm. A high diversity was also observed by other authors (Lim et al., 2004; Said et al., 2010), demonstrating that a high number of *S. aureus* clonal groups circulates in dairy farms. However, other studies report that generally only a few clonal groups are responsible for mastitis (Cabral et al., 2004, Anderson et al., 2006; Aires-de-Sousa, et al., 2007; Rabello et al., 2007). In our study, pulsotype 5 was detected in five farms, and pulsotypes 8 and 9 in four farms each (Table 4), but only pulsotype 9 included strains isolated at all four time points on one farm (K). Moreover, in eight farms persistent pulsotypes were observed, and may be considered endemic in those farms. Considering the sampled animals, ten cows were infected with *S. aureus* in two samplings and one in three samplings. However in all except one case the pulsotypes found presented a low similarity. For instance animal number 163 (farm Q) was positive in the first, second and third sampling but three different pulsotypes (3, 6 and 8) were identified. Only one cow (340 of farm K) presented a same pulsotype (#9) in two consecutive samplings (third and fourth). These results are consistent with the study of Anderson and Lyman (2006), demonstrating the persistence of *S. aureus* over time. Similarly, the results partly

corroborate those found by Aarestrup et al. (1995) who concluded that specific strains of *S. aureus* isolated between 1952 and 1956 were found in the same region in 1992, indicating that clonal groups can persist for years. Buzzola et al. (2001) reported that specific genotypes persisted for a period of eight years in Argentina. However, neither study evaluated the persistence of pulsotypes in a same herd. Mork et al. (2012) showed that only certain strains of *S. aureus* are responsible for persistent infections within herds. Cabral et al. (2004) evaluated 87 isolates of *S. aureus* and found that specific strains were distributed regionally. Dendani et al. (2010), in a study conducted in France, also reported that select clonal groups are responsible for mastitis. Several virulence factors associated with these bacteria may enhance their persistence in the herds, and the most important factor pointed out was the ability to form biofilms. Cucarella et al. (2004) demonstrated that the ability to form biofilms, as found in some strains of *S. aureus*, was associated with persistent infections in the mammary glands of cattle. However, in our study, *icaA* and *icaD* were not highly prevalent and they were absent in pulsotype 9, which was the most persistent over time. Therefore, other biofilm genes or factors may have played a role in the persistence of these strains.

The great diversity of observed clonal groups indicates the wide variability of *S. aureus* on small dairy farms in this region and showed that clones remained endemic on only a few farms, a characteristic typically found in intensive production systems in other countries. The diversity and characteristics of *S. aureus* strains in a herd can be influenced by a variety of factors, including herd size, introduction of new strains by the acquisition of new animals (Middleton et al., 2002b) and the selective pressure resulting from treatment with antimicrobials (Sommerhäuser et al., 2003). In our study, all sampled farms were characterized by low milk production and poor management and hygiene. The *S. aureus* infection profile may therefore have been influenced by low antimicrobial selective pressure, allowing the colonization of the udder by various clonal groups at same time and over time.

In conclusion, *S. aureus* strains found on small farms in southern Brazil are not antimicrobial resistant and have a large variety of pulsotypes; moreover only few clonal groups are able to persist over time at the herd level.

### 3.5 ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq / Proc. 578430/2008-8) for financial support.

## REFERÊNCIAS

Aarestrup, F. M., H. C. Wegener, V. T. Rosdahl. 1995. A comparative study of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis during 1952–1956 and 1992. *Acta Vet. Scand.*36: 237–243.

ABDEL-RADY, A., and M. Sayed. 2009. Epidemiological Studies on Subclinical Mastitis in Dairy cows in Assiut Governorate. *Vet. World.* 2 (10): 373-380.

aires de SOUSA, M., C. E. S. R. Parente, O. vieira da MOTTA., I. C. F. Bonna, D. A. Silva, H. de Lencastre. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3845-3849.

Anderson, K. L., R. L. Lyman, S. M. bodeis-Jones, D. G. White. 2006. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. *Am. J. Vet. Res.* 67: 1185-1191.

Arciola, C. R., L. Baldassarri, L. Montanaro. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 39 (6): 2151-2156.

Baptiste, K. E., K. Williams, J. Williams, A. Wattret, P. D. Clegg, S. Dawson, J. E. Corkill, T. O'Neill, C. A. Hart. 2005. Methicillin resistant staphylococci in companion animals. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (12): 1942-1944.

Barkema, H. W., Y. H. Schukken, R. N. Zadoks. 2006. *Invited Review:* The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.*,89: 1877–1895.

Barret, D. 2002. High somatic cell counts - a persistent problem. *Irish Vet. J.* 55 (4): 173- 178.

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

Brito, M. A. V. P., J. R. F. Brito, M. A. S. Silva, R. A. Carmo. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 53 (5): 10-17.

Buzzola, F. R., L. Quelle, M. I. Gomez, M. Catala, L. Steele-Moore, D. Berg, E. Gentilini, G. Denamiel, D. O. Sordelli. 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol. Infect.* 126: 445–452.

Cabra, L. K. G., C. Lämmler, M. Zschöck, H. Langoni, M. E. de Sá, C. Victória, A. da Silva. 2004. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50: 901-909.

Capurro, A., A. Aspán, E. H. Unnerstad, K. Persson Waller, K. Artursson. 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *J. Dairy Sci.* 93: 180–191.

Coelho, S. M. O., R. A. M. Moraes, L. C. Soares, I. A. Pereira, L. P. Gomes, M. M. S. Souza. 2007. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais, *Ciênc. Rural.* 37 (1): 195-200.

de Oliveira, A. P., J. L. Watts, S. A. Salmon, F. M. Aarestrup. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and United States. *J. Dairy Sci.* 83 (4): 855-862.

CLSI. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Inaccessible from Animals; Approved Standard – 3th ed. CLSI **document M31-A3. v.28**, n.8, 116p.

CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; **Twenty-Second Informational Supplement**. CLSI document M100-S22, v.31, n.1, 188p.

Cucarella, C.; M. A. Torma, C. U'beda, M. P. Trotonda, M. Monzo'n, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa, J. R. Penade's. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72 (4): 2177-2185.

Çiftci, A., E. Emek onuk, A. Findik, T. Yildirim, M. U. Sogut. 2009. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction based on coagulase and protein A gene polymorphisms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 849–853.

Dendani, Z., M. A. Arcangioli, P. Bezille, R. Ouzroutand, N. Laouabdia Sellami. 2010. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis by pulse-field gel electrophoresis (PFGE). *J. Anim. Vet. Adv.* 9 (1): 5-11.

Dhanawade, N. B., D. R. Kalorey, R. Srinivasan, S. B. Barbuddhe, N.V. Kurkure. 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 34 (1): 81-89.

Erskine, R. J., R. D. Walker, C. A. Bolin, P. C. Barlett, D. G. White. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.* 85: 1111–1118.

Fagundes, H., and C.A.F. Oliveira. 2004. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciênc. Rural.* 34 (4): 1315-1320.



Ferguson, J. D., G. Azzaro, M. Gambina, G. Licitra. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J. Dairy Sci.* 90: 5798–5813.

Ferreira, J. L., J. L. H. A. Lins, T. V. Cavalcante, N. A. Macedo, A. Borjas. 2007. Prevalência e etiologia da mastite bovina - município de Teresina, Piauí. *Ciênc. Anim. Bras.* 8 (2): 261-266.

Ferreira, L. M., A. Nader filho, E. Oliveira, L. F. Zafalon, V. Souza. 2006. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. *Ciênc. Rural.* 36 (4): 1228-1234.

Fonseca, L. F. L., and M. V. Santos. 2000. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 175p.

Fox, L. K., R. N. Zadoks, C. T. Gaskins. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107: 295–299.

Giannechini, R. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta. Vet. Scand.* 43: 221-230.

Guler, L., U. Ok, K. Gündüz, Y. Gülcü, H. H. Hadimli. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J. Dairy Sci.* 88: 3149-3154.

Haveri, M., M. Hovinen, A. Roslöf, S. Pyörälä. 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin Microbiol.* 46 (11): 3728-3735.

Joo, Y. S., L. K. Fox, W. C. Davis, G. A. Bohach, Y. H. Park. 2001. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet. Microbiol.* 80: 131–138.

Kaszanyitzky, E. J., S. Z. Ja-si, Z. Egyed, G. Agost, G. Semjen. 2003. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species

according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. *Acta Vet. Hung.* 51: 451-464.

Katsuda, K., E. Hata, H. Kobayashi, M. Kohmoto, K. Kawashima, H. Tsunemit, M. Eguchi. 2004. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 105: 301-315.

Kwon, N. H., K. T. Park, J. S. Moon, W. K. Jung, S. H. Kim, J. M. Kim, S. K. Hong, H. C. Koo, Y. S. Joo, Y. H. Park. 2005. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC mec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 624–632.

Lee, J. H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolates from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (11): 6489-6494.

Lim, S., Y. Joo, J. Moon, A. Lee, H. Nam, S. Wee, H. Koh. 2004. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 581-584.

Martins, R. P., J. A. Gonçalina, L. Nakazato, V. Dutra, E. S. Almeida Filho. 2010. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Ci. Anim. Bras.* 11 (1): 181-187.

McDougal, L. K., C. D. Steward, G. E. Killgore, J. M. Chaitram, S. K. McAllister, F. C. Tenover. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* 41 (11): 5113–5120.

Melchior, M. B., M. H. J. Van Osch, R. M. Graat, E. Van Duijkeren, D. J. Mevius, M. Nielen, W. Gaastra, J. Fink-Gremmels. 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.

Melchior, M. B., M. H. J. Van Osch, T. J. G. M. Lam, J. C. M. Ver-Oij, W. Gaastra, J. Fink-Gremmels. 2011. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J. Dairy Sci.* 94: 5926–5937.

Melo, P. C., L. M. Ferreira, A. Nader-Filho, L. F. Zafalon, H. I. G. Vicente. 2012. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Biosci. J.* 28 (1): 94-99.

Middleton, J., L. K. Fox, J. M. Gay, J. W. Tyler, T. E. Besser. 2002a. Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. *Epidemiol. Infect.* 129: 387-395.

Middleton, J. R., L. K. Fox, J. M. Gay, J. W. Tyler, T. E. Besser. 2002b. Influence of *Staphylococcus aureus* strain-type on mammary quarter milk somatic cell count and milk N acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in cattle from eight dairies. *J. Dairy Sci.* 85: 1133-1140.

Mork, T., H. J. Jorgensen, M. Sunde, B. Kvitle, S. Sviland, S. Waage, T. Tollersrud. 2012. Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. *Vet. Microbiol.* 159: 171-180.

Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, S. Watanabe. 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29 (10): 2240-2244.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 2004. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality.** 4th ed. Verona: NMC, 47p.

Ivemeyer, S., U. Knierim, S. Waiblinger. 2011. Effect of human-animal relationship and management on udder health in Swiss dairy herds. *J. Dairy Sci.* 94: 5890–5902.

Oliveira, M., R. Bexiga, S. F. Nunes, C. L. Vilela. 2011. Invasive potential of biofilm-forming staphylococci bovine subclinical mastitis isolates. Short Communication. *J. Vet. Sci.* 12 (1): 95-97.

Pitkalä, A., M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, T. Honkanen-Buzalski. 2004. Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87: 2433–2441.

Plata, K., A. E. Rosato, G. Węgrzyn. 2009. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta. Biochim. Pol.* 56 (4): 597-612.

Rabello, R. F., C. R. V. M. Souza, R. S. Duarte, R. M. M. Lopes, L. M. Teixeira, A. C. D. Castro. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 88: 3211–3219.

Rabello, R. F., B. M. Moreira, R. M. M. Lopes, L. M. Teixeira, L. W. Riley, A. C. D. Castro. 2007. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J. Med. Microbiol.* 56: 1505-1511.

Rademaker, J.L.W.; F.J. De Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, Pages 151-171. In: Caetano-Anollés G. & Gresshoff P.M. (ed.) **DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews**. J. Wileyand Sons, New York.

Reis, G. L. et al. 2005. Efeito do tipo de ordenha sobre a saúde do úbere e a qualidade do leite. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Ed. FEP MVZ. v. 48. Pages 6-13.

Roesch, M., V. Perreten, M. G. Doherr, W. Scheren, M. Schalbaum, J. W. Blum. 2006. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *J. Dairy Sci.* 89: 989-997.

de Sá, M. E. P., M. L. Ribeiro, S. Cunha, A. O. Elias, C. Victória, H. Langoni. 2004. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41 (5): 320-326.

Sabour, P. M., J. J. Gill, D. Lepp, J. C. Pacan, R. Ahmed, R. Dingwell, K. Leslie. 2004. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. *J. Clin. Microbiol.* 42 (8): 3449–3455.

Said, K. B., J. Ismail, J. Campbell, M. R. Mulvey, A. M. Bourgault, S. Messier, X. Zhao. 2010. Regional Profiling for Determination of Ge-type Diversity of Mastitis-Specific *Staphylococcus aureus* Lineage in Canada by Use of Clumping Factor A, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and *spa* Typing. *J. Clin. Microbiol.* 48 (2): 375–386.

Smith E. M., L. E. Green, G. F. Medley, H. E. Bird, L. K. Fox, Y. H. Schukken, J. V. Kruze, A. J. Bradley, R. N. Zadoks, C. G. Dowson. 2005a. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4737–4743.

Smith, E. M., L. E. Green, G. F. Medley, H. E. Bird, C. G. Dowson. 2005b. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4731–4736.

Sommerhäuser, J., B. Kloppert, W. Wolter, M. Zschöck, A. Sobiraj, K. Failing. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol.* 96: 91-102.

Tenover F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns

produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233–2239.

Thaker, H. C., T. T. M. N. Brahmha, J. B. Nayak. 2013. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat. *Vet. World.* 6 (1): 10-13.

Türkyilmaz, S. and S. Eskiizmirli. 2006. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in staphylococcus strains isolated from various animal clinical samples. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30: 201-206.

Unakal, C. G., and B. B. Kaliwal. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet. World.* 3 (2): 65-67.

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

Young, B., D. Platt, D. Logue, H. Ternent, J. Fitzpatrick. 2001. Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis: strain recognition and dynamics of infection. *J. Dairy Res.* 68: 377-388.

Zafalon, L. F., J. R. P. Arcaro, A. Nader Filho, L. M. Ferreira, L. Castelani, F. Benvenuto. 2008. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobia-s em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 67 (2): 118-125.

Table 1: Characterization of herds included in the study population

| Characteristic                         | A  | B   | C  | D  | E   | F  | G   | H  | I   | J   | K   | L   | M  | N  | O  | P  | Q   | R   | S   | T   | U   |
|--|----|-----|----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Average number of animals in lactation | 4  | 19  | 15 | 3  | 18  | 7  | 50  | 8  | 11  | 27  | 14  | 15  | 8  | 7  | 7  | 8  | 18  | 8   | 12  | 7   | 8   |
| Daily milk production                  | 20 | 340 | NI | 24 | 250 | 35 | 900 | 70 | 200 | 500 | 200 | 160 | ND | 80 | 90 | 80 | 350 | 100 | 200 | 150 | 120 |
| Production system                      | P  | P   | SS | P  | P   | P  | P   | P  | P   | SS  | P   | P   | ND | P  | P  | P  | P   | P   | SS  | P   | P   |
| Type of milking                        | M  | M   | M  | M  | M   | M  | M   | M  | M   | M   | M   | M   | ND | M  | M  | M  | M   | M   | M   | M   | M   |
| Place of milking                       | C  | MP  | MP | C  | MP  | C  | MP  | MP | C   | MP  | C   | C   | ND | C  | C  | C  | C   | C   | C   | C   | C   |
| Teat washing before milking            | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +   | +   | +   | +   | ND | +  | +  | +  | +   | +   | +   | +   | +   |
| Teat drying after washing              | +  | +   | +  | -  | +   | -  | -   | ND | +   | +   | -   | +   | ND | +  | +  | -  | +   | +   | -   | +   | +   |
| Pre-dipping                            | -  | -   | +  | -  | -   | -  | +   | -  | -   | -   | +   | -   | ND | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | -   |
| Post-dipping                           | +  | -   | +  | -  | +   | -  | +   | +  | -   | +   | +   | +   | ND | +  | -  | +  | -   | -   | -   | +   | -   |
| Clinical mastitis treatment            | +  | +   | +  | +  | +   | +  | +   | +  | +   | +   | +   | +   | ND | +  | +  | +  | +   | +   | +   | +   | +   |
| Dry period treatment                   | +  | +   | +  | -  | +   | -  | +   | +  | +   | +   | +   | +   | ND | +  | -  | +  | -   | -   | +   | -   | -   |

ND: not determined; P: pasture; SS: semi-stabled; M: mechanic; C: corral; MP: milking parlor; (+) yes; (-) no.

Table 2: Results of bacteriological tests performed on milk samples collected from 21 dairy farms in 2010 and 2011

| Farm  | Negative N (%) | <i>S. aureus</i> N (%) | Coagulase-                                 | Coagulase-                                 | Other* N (%) | Total |
|-------|----------------|------------------------|--|--|--------------|-------|
|       |                |                        | positive<br><i>Staphylococcus</i><br>N (%) | negative<br><i>Staphylococcus</i><br>N (%) |              |       |
| A     | 4 (27)         | 1 (7)                  | 1 (7)                                      | 5 (33)                                     | 4 (27)       | 15    |
| B     | 26 (34)        | 2 (3)                  | 1 (1)                                      | 30 (39)                                    | 17 (22)      | 76    |
| C     | 21 (35)        | 4 (7)                  | 2 (3)                                      | 13 (22)                                    | 20 (33)      | 60    |
| D     | 4 (33)         | 2 (17)                 | 0 (0)                                      | 2 (17)                                     | 4 (33)       | 12    |
| E     | 30 (43)        | 14 (20)                | 0 (0)                                      | 7 (10)                                     | 19 (27)      | 70    |
| F     | 5 (19)         | 4 (15)                 | 3 (11)                                     | 9 (33)                                     | 6 (22)       | 27    |
| G     | 98 (49)        | 16 (8)                 | 5 (2)                                      | 48 (24)                                    | 34 (17)      | 201   |
| H     | 5 (16)         | 3 (10)                 | 1 (3)                                      | 16 (52)                                    | 6 (19)       | 31    |
| I     | 12 (27)        | 10 (22)                | 1 (2)                                      | 10 (22)                                    | 12 (27)      | 45    |
| J     | 51 (47)        | 2 (2)                  | 2 (2)                                      | 28 (26)                                    | 26 (24)      | 109   |
| K     | 20 (37)        | 24 (44)                | 3 (6)                                      | 6 (11)                                     | 1 (2)        | 54    |
| L     | 13 (22)        | 6 (10)                 | 0 (0)                                      | 12 (20)                                    | 28 (47)      | 59    |
| M     | 3 (18)         | 9 (53)                 | 0 (0)                                      | 3 (18)                                     | 2 (12)       | 17    |
| N     | 16 (62)        | 3 (12)                 | 2 (8)                                      | 0 (0)                                      | 5 (19)       | 26    |
| O     | 16 (53)        | 3 (10)                 | 1 (3)                                      | 4 (13)                                     | 6 (20)       | 30    |
| P     | 6 (19)         | 9 (29)                 | 0 (0)                                      | 11 (35)                                    | 5 (16)       | 31    |
| Q     | 17 (24)        | 24 (34)                | 2 (3)                                      | 16 (23)                                    | 11 (16)      | 70    |
| R     | 10 (32)        | 0 (0)                  | 0 (0)                                      | 11(35)                                     | 10 (32)      | 31    |
| S     | 16 (33)        | 0 (0)                  | 3 (6)                                      | 20 (41)                                    | 10 (20)      | 49    |
| T     | 10 (67)        | 0 (0)                  | 1 (7)                                      | 0 (0)                                      | 4 (27)       | 15    |
| U     | 12 (38)        | 0 (0)                  | 0 (0)                                      | 11 (34)                                    | 9 (28)       | 32    |
| Total | 395 (37.2)     | 136 (12.83)            | 28 (2.64)                                  | 262 (24.71)                                | 239 (22.54)  | 1,060 |

\**Corynebacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Nocardia* sp., *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. and yeast.



Table 3: Frequency of *S. aureus* isolation in relation to the total number of positive samples per farm, in four sampling events, between 2010 and 2011

| Farm  | Total positive samples | Sampling |        |       |        | %Total |
|-------|------------------------|----------|--------|-------|--------|--------|
|       |                        | First    | Second | Third | Fourth |        |
| A     | 11                     | 0        | 0      | 1     | 0      | 9.1    |
| B     | 50                     | 1        | 1      | 0     | 0      | 4.0    |
| C     | 39                     | 1        | 0      | 2     | 1      | 10.3   |
| D     | 8                      | 0        | 1      | 1     | 0      | 25.0   |
| E     | 40                     | 2        | 7      | 2     | 3      | 35.0   |
| F     | 22                     | 1        | 2      | 0     | 1      | 18.2   |
| G     | 103                    | 6        | 3      | 6     | 1      | 15.5   |
| H     | 26                     | 2        | 1      | 0     | 0      | 11.5   |
| I     | 33                     | 2        | 3      | 3     | 2      | 30.3   |
| J     | 58                     | 0        | 1      | 1     | 0      | 3.4    |
| K     | 34                     | 5        | 5      | 8     | 6      | 70.6   |
| L     | 46                     | 1        | 1      | 0     | 4      | 13.0   |
| M     | 14                     | 5        | 4      | 0     | 0      | 64.3   |
| N     | 10                     | 3        | 0      | 0     | 0      | 30.0   |
| O     | 14                     | 3        | 0      | 0     | 0      | 21.4   |
| P     | 25                     | 8        | 0      | 0     | 1      | 36.0   |
| Q     | 53                     | 1        | 8      | 9     | 6      | 45.3   |
| Total | 586                    | 41       | 37     | 33    | 25     | 23.2   |

Table 4: Distribution of pulsotypes of *S. aureus* in milk samples from Taquari Valley farms in four semi-annual collections, 2010-2011.

| Farm | Pulsotypes (number of strains)  |                                 |                           |                                     |
|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
|      | Sampling 1                      | Sampling 2                      | Sampling 3                | Sampling 4                          |
| A    |                                 |                                 | 11(1)                     |                                     |
| B    | 9(1)                            |                                 |                           |                                     |
| C    | <b>9(1)</b>                     |                                 | <b>9(1), 25(1)</b>        | 22(1)                               |
| D    |                                 |                                 | 14(1)                     |                                     |
| E    | <b>17(2)</b>                    | <b>17(7)</b>                    | 20(2)                     | <b>17(3)</b>                        |
| F    | <b>5(1)</b>                     | <b>5(2)</b>                     |                           | 2(1)                                |
| G    | <b>5(1), 8(1), 27(2), 28(2)</b> | <b>5(2), 26(1)</b>              | 4(1), 25(1), <b>26(1)</b> | <b>27(1)</b>                        |
| H    | <b>14(2)</b>                    | <b>14(1)</b>                    |                           |                                     |
| I    |                                 | 5(3)                            | 23(2)                     | 8(2)                                |
| J    |                                 | 5(1)                            |                           |                                     |
| K    | <b>9(4), 18(1)</b>              | <b>9(2), 13(3)</b>              | <b>9(1), 11(4), 12(2)</b> | <b>9(6)</b>                         |
| L    | <b>19(1)</b>                    | 10(1)                           |                           | 3(1), 17(1),<br><b>19(1), 27(1)</b> |
| M    | 5(5)                            | 7(1), 8(3)                      |                           |                                     |
| N    | 21(1), 30(1)                    |                                 |                           |                                     |
| O    | 1(1), 9(1), 14(1)               |                                 |                           |                                     |
| P    | 10(2), 15(2), 29(2)             |                                 |                           |                                     |
| Q    | <b>4(1)</b>                     | <b>6(4), 8(1), 23(2), 24(1)</b> | <b>4(5), 6(3), 16(1)</b>  | <b>8(6)</b>                         |

\*In bold pulsotypes that were identified more than once in the dairy farm.

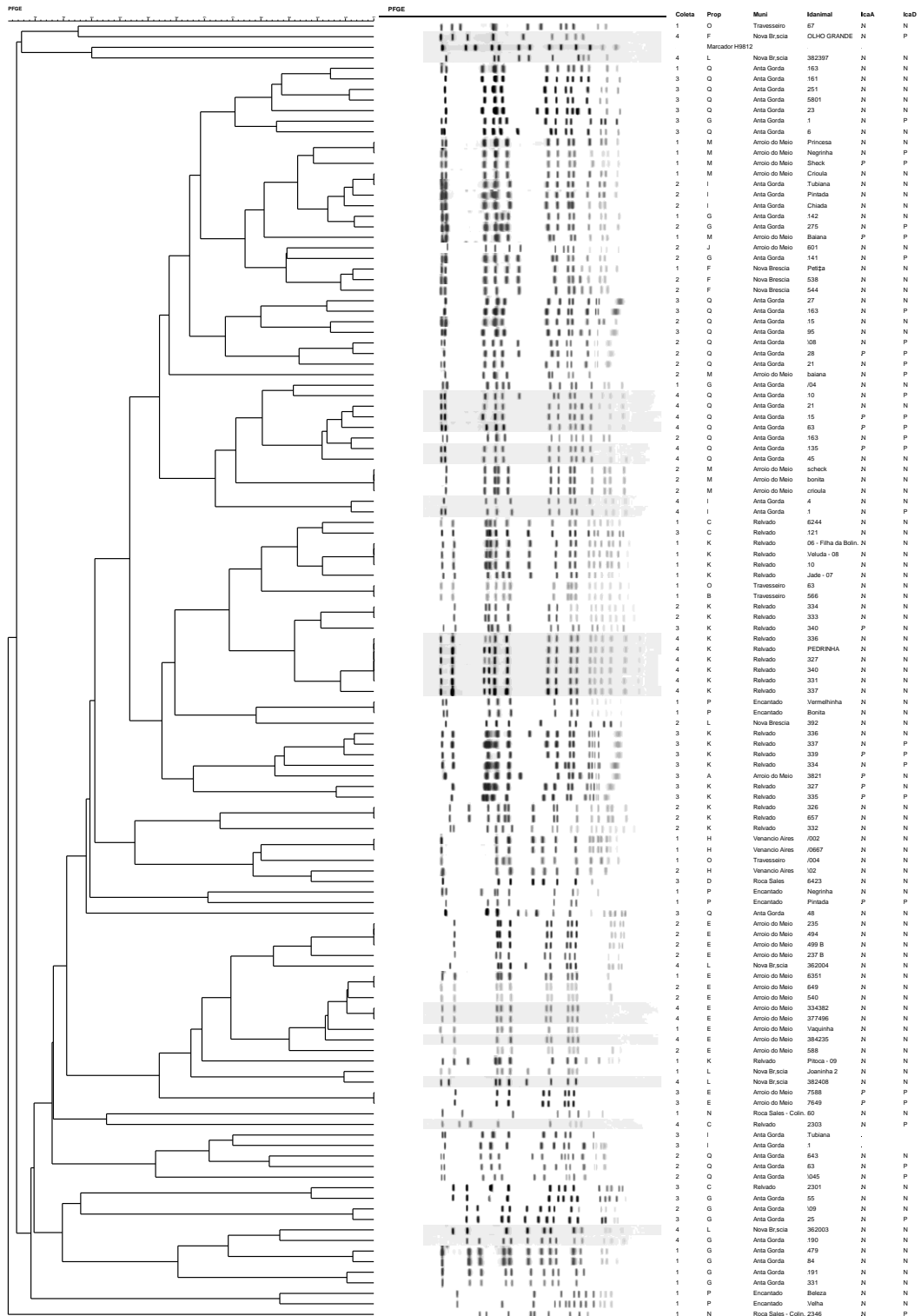


Figure 1: Dendrogram representing the similarity grouping of *S. aureus* isolates derived from farms with multiple isolation of *S. aureus* from milk samples in a two-year period. Total DNA of isolates was cleaved with *Sma*I and separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo possibilitam concluir que:

- *Staphylococcus aureus* está presente na glândula mamária de bovinos em lactação em pequenas propriedades da região, porém não é o agente bacteriano mais prevalente;
- Os isolados apresentam baixa frequência de resistência aos antimicrobianos;
- Há uma grande variabilidade de pulsotipos entre os isolados presentes nessas propriedades, porém poucos grupos clonais persistem nas propriedades amostradas;
- Não foi possível associar a permanência dos grupos clonais nos rebanhos à presença dos genes *icaA* e *icaD*;
- Não houve associação entre os grupos clonais, presença dos genes *icaA* e *icaD* e a resistência aos antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. et al. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2054-2059, 2001.

AGUILAR, B., AMORENA, B., ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.78, p.183–191, 2001.

AKINEDEN, O. et al. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. **Clin. Diag. Lab. Immun.**, v.8, n.5, p.959–964, 2001.

ANDERSON, K.L. e LYMAN, R.L. Long-term persistence of specific genetic types of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* on three dairies. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.4551-4556, 2006.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.6, p.2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERNELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials, Amsterdam**, v.23, n.21, p.4233-4239, 2002.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ARGUDIN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food Poisoning and

*Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v.2, p.1751–1773, 2010.

ATKINS, K.; BURMAN, J.; CHAMBERLAIN, E.; COOPER, J.; POUTREL, B.; BAGBY, S.; JENKINS, T.; FEIL, E.; VAN DEL ELSEN, J. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. **Mol. Immunol.**, v.45, p.1600-1611, 2008.

BALABAN, N. et al. Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNA-III-activating protein (TRAP). **J. Biol. Chem.**, v.276, p.2658-2667, 2001.

BANNERMAN, T. L. et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.551–555, 1995.

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

BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, p.31-36, 2001.

BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. *Invited Review*: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.1877–1895, 2006.

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.

BARRET, D. High somatic cell counts- a persistent problem. **Irish Veterinary Journal**, v.55, n.4, p.173- 178, 2002.

BARRIO, M. B., RAINARD, P., PREVOST, G. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. **Microbes and Infection**, v.8, p.2068–2074, 2006.

BEKEREDJIAN-DING, I.; INAMURA, S.; GIESE, T.; MOLL, H.; ENDRES, S.; SING, A.; ZÄHRINGER, U.; HARTMANN, G. *Staphylococcus aureus* protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. **J. Immunol**, v.178, n.5, p.2803-2812, 2007.

BOHACH, G.A. et al. Exotoxins, p. 83-111. In: K.B. **Crossley and G.L. Archer**. (ed.) *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, N.Y, 1997.

BOHACH, G.A.; FOSTER, T.J. *S. aureus* exotoxins In: FISCHETTI, V.A. et al *Gram-Positive Pathogens*. **American Society for Microbiology**, p. 367-378, 2000.

BOYEN, F.; EECKHAUT, V.; VAN IMMERSEEL, F. et al. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v.135, p.187-195, 2009.

BRABES, K.C.S. et al. Participação de species coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Napgama**, v.3, p.4-11, 1999.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, n.3, p.547-568, 2004.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n.2, p.116-128, 2002.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.

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. **Infect. Immun.**, v.75, p.886–891, 2007.

CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v.185, p.3214–3217, 2003.

CHAMBERS, H.F. e DELEO, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat Rev Microbiol**, v.7, p.629-641, 2009.

CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J.; LE GUENIC, M. Expert Assessment Study of



Milking and Hygiene Practices Characterizing Very Low Somatic Cell Score Herds in France. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.5, 2005.

CLARKE, S. R. E FOSTER, S. J. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Adv Microb Physiol**, v.51, p.187-224, 2006.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J., KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Vet. Microbiol.**, v.121, p.1-7, 2007.

COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P.; SOUZA, M.M.S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais, **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.195-200, jan-fev, 2007.

COOKSON, B. D.; ROBINSON, D. A.; MONK, A. B.; MURCHAN, S.; DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M. J.; SCHEEL, C.; FUSSING, V.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; CUNY, C.; WITTE, W.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VINDEL, A.; GARAIZAR, J.; HAEGGMAN, S.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; RANSJO, U.; MULLER-PREMRU, M.; HRYNIEWICZ, W.; ROSSNEY, A.; O'CONNELL, B.; SHORT, B. D.; THOMAS, J.; O'HANLON, S. e ENRIGHT, M. C. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. **J Clin Microbiol**, v.45, n.6, p.1830-1837, 2007.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, p.145–153, 2007.

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. **Infect. Immun.**, v.67, p.5427–5433, 1999.

CUCARELLA, C.; TORMA, M. A.; U ´ BEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZO ´N, M.;

PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADE'S, J. R. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity, Washington**, v.72, n.4, p.2177-2185, 2004.

ÇIFTÇI, A.; EMEK ONUK, E.; FINDIK, A.; YILDIRIM, T.; SOGUT, M.U. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction based on coagulase and protein A gene polymorphisms. **J Vet Diagn Invest**, v.21, p.849–853, 2009.

DARINI, A.L.C. et al. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. **Medicina, ribeirão preto**, v.30, p.73-80, 1998.

DENDANI, Z.; ARCANGIOLI, M.A.; BEZILLE, P. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Clinical Mastitis by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.1, p.5-11, 2010.

DEVRIES, T. J.; DUFOUR, S.; SCHOLL, D. T. Relationship between feeding strategy, lying behavior patterns, and incidence of intramammary infection in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.93, p.1987–1997, 2010.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1569–1573, 2005.

DEVRIESE, L.A.; HERMANS, K.; BAELE, M.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v.133, p.206-207, 2009.

DE KIEVIT, T.R., IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infect. Immun.**, v. 68, p.4839–4849, 2000.

DE Vlieghe S., FOX L.K., PIEPERS S., MCDougall S.; BARKEMA H.W.

Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **J. Dairy Sci.**, v.95, n.3, p.1025-1040, 2012.

DEVRIESE, L.A.; VAN DAMME, L.R.; FAMAREE, L. Methicillin (cloxacillin)- resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.19, p.598-605, 1972.

DIEDEREN, B. e KLUYTMANS, J. The emergence of infections with community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect**, v.52, p.157-168, 2006.

DINGES M. M.; ORWIN P. M; SCHLIEVERT P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.1, p.16–34, 2000.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, p.167–193, 2002.  
EDMONSON, P. W. Influence of milking machines on mastitis. **In Practice**, v. 23, p.150-159, 2001.

ENRIGHT, M. C.; DAY, N. P.; DAVIES, C. E.; PEACOCK, S. J. e SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillinsusceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v.38, n.3, p.1008-1015, 2000.

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

FARIA, N.A.; CARRICO, J.A.; OLIVEIRA, D.C.; RAMIREZ, M.; DE LENCASTRE, H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p.136-144, 2008.

FENG, Y.; CHEN, C.J.; SU, L.H.; HU, S.; YU, J.; et al. Evolution and pathogenesis of

*Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. **FEMS Microbiol Rev**, v.32, p.23–37, 2008.

FERGUSON, J. D.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.5798–5813, 2007.

FERREIRA, J. L.; LINS, J. L. H. A.; CAVALCANTE, T. V.; MACEDO, N. A.; BORJAS, A. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.2, p.261-266, 2007.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.

FITZGERALD, J. R.; MEANEY, W.J.; HARTIGAN, P.J.; SMYTH, C.J.; KAPUR, V. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiol. Infect.**, v.119, p.261–269, 1997.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FORSYTHE S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre; Artmed, 2002. 424p.

FOSTER, T.J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.12, p.948–958, 2005.

FRASER, J. D. e PROFT, T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. **Immunol Rev**, v.225, p.226-243, 2008.

FRAZEE, B.; LYNN, J.; CHARLEBOIS, E.; LAMBERT, L.; LOWERY, D.; PERDREAU-REMGINGTON, F. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. **Ann**

**Emerg Med**, v.45, p.311-320, 2005a.

FRAZEE, B.; SALZ, T.; LAMBERT, L.; PERDREAU-REMGTON, F. Fatal community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in an immunocompetent young adult. **Ann Emerg Med**, v.46, p.401-404, 2005b.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Pathol.**, v. 42, p. 872-874, 1989.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 18586–18593, 1998.

GIANNECHINI, R. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.43, p.221-230, 2002.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J.C.; LINA, G.; et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, v.359, p.753–759, 2002.

GILLOT, P. et al. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.4060–4067, 2002.

GILLOT, P.; VAN LEEUWEN, W. Comparative analysis of agr locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.1265–1269, 2004.

GOMES, S. T. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: Vilela,

D.; Bressan, M.; Cunha, A. S. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento**. Brasília: MCT/CNPq, Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2001. p.21-37.

GOODYEAR, C.S. e SILVERMAN, G.J.. Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101, n.31, p.11392-11397, 2004.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol Microbiol**, v.43, n.6, p.1367-1378, 2002.

GRECO, C.; MASTRONARDI, C.; PAGOTTO, F.; MACK, D.; RAMIREZ-ARCOS, S. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. **Transfusion Complications, Malden**, v.48, n.5, p.969-977, 2008.

GUERREIRO, P.K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciênc. Agrotec.**, v.29, n.1, p.216-222, 2005.

GYLES, C.L. et al. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4. Ed. Ames: **Wiley-blackwell**. Iowa USA, 651p., 2010.

HACKER, J. & KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu Rev Microbiol**, v.54, p.641–679, 2000.

HALEY, R. W. et al. Eradication of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections from a neonatal intensive care unit. **J. Infect. Dis.**, v.171, p.614–624, 1995.

HAMMEL, M.; NEMECEK, D.; et al. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein (Eap) adopts an elongated but structured conformation in solution. **Protein Sci**, v.16, n.12, p.2605-2617, 2007.

HARMSSEN, D.; CLAUS, H.; WITTE, W.; ROTHGANGER, J.; TURNWALD, D. e VOGEL, U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university

hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. **J Clin Microbiol**, v.41, n.12, p.5442-5448, 2003.

HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWA, T.; ENDO, T.; EGUCHI, M. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in Hokkaido, Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v.68, p.165-170, 2006.

HAVERI, M. et al. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. **J. Clin. Microbiol**, v.43, p. 959–96, 2005.

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

HENNEKINNE, J.A.; KEROUANTON, A.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, n.2, p.321-329, 2003.

HUSEBY, M. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 23, p. 8719-26, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Diferença entre leite adquirido e industrializado - Unidades da Federação e Brasil - primeiro trimestre de 2012**. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Leite, 1º trimestre de 2012.

IRIE, Y. e PARSEK, M.R. Quorum sensing and microbial biofilms. **Curr.Top. Microbiol. Immunol.**, v.322, p.67–84, 2008.

ISHINO, K. et al. Usefulness of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

Typing of the Coagulase Gene To Discriminate Arbekacin-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, n.2, p.607–609, 2007.

JAY, J.M. Gastreenterite estafilocócica. In: JAY, JM. **Microbiologia de Alimentos**. 6<sup>a</sup>ed., Porto Alegre: Artmed, cap. 23, p.471-489, 2005.

JONES, T.; KELLUM, M.; PORTER, S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerg Infect Dis**, v.8, p.82-84, 2002.

JOO, Y.S.; FOX, L.K.; DAVIS, W.C.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. **Vet. Microbiol.**, v.80, p.131–138, 2001.

JORGENSEN, H.J. et al. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian Bulk Milk. **Applied on Environmental Microbiology**. v. 71, n.12, p. 8352-8361, 2005.

KAMPEN, A. H., TOLLERSRUD, T.; et al. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils in vitro. **Infect Immun**, v.73, n.3, p.1578-1583, 2005.

KANEKO, J. e KAMIO, Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures pore-forming mechanism organization of the genes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.68, p.981–1003, 2004.

KAPPER, J.B.; KACKER, J. Pathogenicity island and other mobile virulence elements. **ASM Press**. Whashington, DC, 1999.

KAPUR, V.; SISCHO, W.M.; GREER, R.S.; WHITTAM, T.S.; MUSSER, J.M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **J Clin. Microbiol.**, v.33, p.376–380, 1995.



KATAYAMA, Y.; ZHANG, Z.; CHAMBERS, F. PBP 2a Mutations Producing Very-High-Level Resistance to Beta-Lactams. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, v.48, p. 453-459, 2004.

KOZITSKAYA, S. et al. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. **Infect. Immun.**, v.72, p.1210–1215, 2004.

KWON, N. H. et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. **J. Antimicrob Chemother**, v.56, p.624–632, 2005.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.67, p.127-141, 1999.

LAPLANA, L.M.; CEPERO, M.A.; RUIZ, J.; ZOLEZZI, P.C.; CLAVO, M.A.; ERAZO, M.C.; GOMEZ-LUS, R. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates by pulse-field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome mec type determination and dissemination of antibiotic resistance genes. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.30, p.505-5013, 2007.

LER, S.G.; LEE, F.K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Trends in Detection of Warfare Agents. Detection Methods for Ricin, Staphylococcal Enterotoxin B and T-2 Toxin. **Journal of Chromatography A**, v.1133, n.1-2, p.1–12, 2006.

LE LOIR, I; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.**, v.2, p.63-76, 2003.

LI, H.; XU, L.; WANG, J.; WEN, Y.; VUONG, C.; OTTO, M.; GAO, Q. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. **Infect Immun**, v.73,

p.3188–3191, 2005.

LIM, S., JOO, Y.; MOON, J.; LEE, A.; NAM, H.; WEE, S.; KOH, H. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **J. Vet. Med. Sci.**, v.66, p.581-584, 2004.

MA, X.X., ITO T, CHONGTRAKOOL P, HIRAMATSU K. Predominance of clones carrying Panton-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985. **J Clin Microbiol**, v.44, p.4515–4527, 2006.

MACHADO, P.F.M.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.2765-3768, 2000.

MARQUES, C.S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.

MARTINS, R.P.; GONÇALINA, J.A.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E.S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ci. Anim. Bras.**, v.11, n.1, p.181-187, 2010.

MATTHEWS, K. R.; KUMAR, S.J.; O'CONNOR, S.A.; HARMON R.J.; PANKEY, J. W.; FOX, L. K.; OLIVER, S. P. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. **Epidemiol. Infect.**, v.112, p.177–186, 1994.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D. J.; FATMA, T.; RATTAN, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v.24, n.1, p.25-29, 2006.

MCKENNEY, D.; HÜBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. **Infect. Immun.**, v.66, p.4711–4720, 1998.

MELCHIOR, M. B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, v.53, p.326–332, 2006.

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

MELCHIOR, M. B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. **Vet. Microbiol.**, v.125, p.141–149, 2007.

MELCHIOR, M.B.; VAN OSCH, M.H.J.; GRAAT, R.M.; VAN DUJKEREN, 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.

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. **J. Dairy Sci.**, v.94, p.5926–5937, 2011.

MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Biosci. J.**, v. 28, n.1, p.94-99, 2012.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J. A.; FOSTER, T. J.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. Protein A-

Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology, Washington**, v.191, n.3, p.832-843, 2009.

MIDDLETON, J. R.; FOX, L. K. Influence of *Staphylococcus aureus* strain on mammary quarter milk production, p. 179– 180 in Proc. 39th Annu. Mtg. Natl. Mastitis Council., Atlanta, GA. **National. Mastitis Council.**, Madison, WI. 2001.

MILANOV, D.; LAZIC, S.; BRANKA,V.; \*, PETROVIC, J.; BUGARSKI, D.; SEGULJEV, Z. SLIME PRODUCTION AND BIOFILM FORMING ABILITY BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BOVINE MASTITIS ISOLATES. **Acta Veterinária**, v. 60, n.2-3, p.217-226, 2010.

MILLER, L.; PERDREAU-REMGTON, F.; RIEG, G.; MEHDI, S.; PERLROTH, J.; BAYER, A.; TANG, A.; PHUNG, T.; SPELLBERG, B. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. **N Engl J Med**, v.352, p.1445-1453, 2005.

MONECKE, S.; KUHNERT, P.; HOTZEL, H.; et al. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. **Vet Microbiol**, v.125, p.128–40, 2007.

MOON, J.S.; LEE, A.R.; KANG, H.M.; LEE, E.S.; KIM, M.N.; PAIK, Y.H.; PARK, Y.H.; JOO, Y.S.; KOO, H.C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **J Dairy Sci**, v.90, p.1176-1185, 2007.

MORK, T.; TOLLERSRUD, T.; KVITLÉ, B.; JØRGENSEN, H. J.; WAAGE, S. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine and caprine mastitis. **J. Clin. Microbiol.**,v.43, p.3979–3984, 2005.

NEALSON, K.H.; PLATT, T.; HASTINGS, J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J. Bacteriol.**, v.104, p.313–322, 1970.

NILSSON, I.M. et al. Alpha-Toxin and Gamma-Toxin Jointly Promote

*Staphylococcus aureus* Virulence in Murine Septic Arthritis. **Infection and Immunity**, v.67, n.3, p.1045-1049, 1999.

NOVICK, R. P. & SUBEDI, A. THE SAPIIS: MOBILE PATHOGENICITY ISLANDS OF STAPHYLOCOCCUS. **Chem Immunol Allergy**, v.93, p.42–47, 2007.

O'BRIEN, L., S. W. KERRIGAN, et al. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. **Mol Microbiol**, v.44, n.4, p.1033-1044, 2002.

O'GARA, J.P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v.270, p.179–188, 2007.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p.10-13, 1999.

OLIVEIRA, D. C. e DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.7, Jul, p.2155-2161. 2002.

OLIVEIRA, M. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.124, n.1-2, p. 187-191, 2007.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; VILELA, C.L. Invasive potential of biofilm-forming *Staphylococci* bovine subclinical mastitis isolates. Short Communication. **J. Vet. Sci.** v.12, n.1, p. 95-97, 2011.

OLIVEIRA, M.C.S. Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite. Documentos n. 50. São Carlos, SP: **Empresa Brasileira de Pesquisa**

**Agropecuária - Embrapa Pecuária Sudeste/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Dezembro, 2006.

O'NEILL, E., POZZI, C., HOUSTON, P., et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1379–1388, 2007.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.322, p.207-228, 2008.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.

PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B.; SUPRÉ, K.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRICKX, M.; DE VliegHER, S. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **J. Dairy Sci**, v. 94, n. 6, 2011.

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

PITKALA, A., M. et al. Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **J. Dairy Sci**.v. 87, p. 2433–2441, 2004.

PLATA, K.; ROSATO, A.E.; WĘGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, 597-612, 2009.

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, n. 1, p. 118-132, 2002.

PREVOST, G.; JAUL, B.; PIEMONT, Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Clin.Microbiol.**, v. 30, p. 967–973, 1992.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZ PATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. **Veterinary Microbiology and Microbial disease**. Second Edition. Wiley-Blackwell, 2011. Capítulo 14 *Staphylococcus* species (p.179-187). Total pg. 912.

RABELLO, R.F.; SOUZA, C.R.V.M.; DUARTE, R.S.; LOPES, R.M.M.; TEIXEIRA, L.M.; CASTRO, A.C.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates ecovered from Bovine Mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Dairy Sci.**, v.88, p.3211–3219, 2005.

REINOSO, E.B. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiol. Res.**, v. 163, n. 3, p. 314-22, 2008.

REIS, G. L. et al. Efeito do tipo de ordenha sobre a saúde do úbere e a qualidade do leite. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Editora FEP MVZ. v. 48, p. 6-13, setembro, 2005.

RICHARD, H. A. et al. BACTERIAL COAGGREGATION: An integral process in the development of multi-species biofilms. **Trens in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 94- 99, 2003.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2 p. 237-259, 2012.

ROHDE, H.; KALITZKY, M.; KROGER, N.; et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. **J Clin Microbiol**, v.42, p.5614–5619, 2004.

SÁ, M.E.P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, n. 5, p. 320-326, 2004.

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. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n.8, p. 3449–3455, 2004.

SADYKOV, M.R.; OLSON, M.E.; HALOUSKA, S.; ZHU, Y.; FEY, P.D.; et al. Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis. **J Bacteriol**, v.190, p.7621–7632, 2008.

SAEI, H.D. Distribution of collagen adhesin gene among various types of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mammary gland. **Comparative Clinical Patholog.** v. 21, n.5, p.571-576, 2012.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** Barueri: Manole, 2007. 314 p.

SCHLICHTING, C. et al. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.2, p.227–232, 1993.

SHUM, L.W.C.; MCCONNELL, C.S.; GUNN, A.A.; HOUSE, J.K. Environmental mastitis in intensive high-producing dairy herds in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v.87, n.12, p.469-475, 2009.

SILVA, E.R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, V. 69, P. 260-264, 2005.

SMELTZER, M.S. et al. Prevalence and chromosomal map location of



*Staphylococcus aureus* adhesin genes. **Gene**, v.196, p.249-259, 1997.

SMITH, T. H., FOX, L. K., MIDDLETON, J. R. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, v. 212, p. 553–556, 1998.

SMITH, E. M. et al. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4737–4743, 2005a.

SMITH, E. M. et al. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 4731–4736, 2005b.

SOLH, N.E.; et al. Use of *Bacillus subtilis* 16 S rRNA genes as a probe to identify species, subspecies, and types in the genus *Staphylococcus*. In: NOVICK RP. **Molecular biology of the Staphylococci**. VCH Publishers, New York, p.585-593, 1990

SOMERVILLE, G.A. et al. In vitro serial passage of *staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. **J. Bacteriol.**, v.184, p.1430-1437, 2002.

SOTO, S.M. et al. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infections by uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. and Infection**, v.12, p. 1021-1045, 2006.

STAALI, L.; MONTEIL, H.; COLIN, D.A. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca<sup>2+</sup> channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils, **J. Membr. Biol.**, v.162, p.209–216, 1998.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Mol. Microbiol.**, v.52, n.4, p.917-924, 2004.

STROMMINGER, B. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.461–465, 2006.

TEIXEIRA, L.M.; CASTRO, A.C.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered from Bovine Mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Dairy Sci.**, v.88, p.3211–3219, 2005.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.2233–2239, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICHELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, E.D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulse-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v.80, p.2233-2239, 1996.

THORBERG, B.M.; DANIELSSON-THAM, M.L.; EMANUELSON, U.; PERSSON WALLER, K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **J. Dairy Sci.**, v.92, n.10, 2009.

TORMO, M. A. et al. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. **J. Bacteriol.**, v.187, p. 2348–2356, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.**, 6 ed. São Paulo: Artmed, 2000. 827p.

TRABER, K.E.; LEE, E.; BENSON, S.; CORRIGAN, R.; CANTERA, M.; SHOPSIN, B.; NOVICK, R.P. Agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbiology-(UK)**, v.154, p.2265–2274, 2008.

TURKYILMAZ, S.; TEKBIYIK, S.; ORYASIN, E.; et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses Public Health**, 2009; in press.

ÜNAL, N.; ASKAR, S.; MACUN, H.C.; SAKARYA, F.; ALTUN, B.; YILDIRIM, M. Panton–Valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profiles of staphylococci isolated from milks of small ruminants. **Trop Anim Health Prod**, v.44, p.573–579, 2012.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p. 179–185, 2003.

VUONG, C. et al. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 6, p. 1688-1693, 2000.

WEESE, J.S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. **ILAR Journal**, v.51, n.3, 2010.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. **Water Science Technology**, v. 49, p. 327–336, 2004.

XU, L. et al. Role of the lux S quorum sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 488–496, 2006.

YAMAGUSHI, T. et al. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 694-705, 2000.

YOSHIZAWA, Y. et al. An exfoliative toxin A-convergent phage isolated from *Staphylococcus aureus* strain ZM. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, p. 189-191, 2000.

ZADOKS, R. N. et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiology of bovine and human *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1931–1939, 2000.

ZADOKS, R. N. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine

and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3894–3902, 2002.

ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CASTELANI, L.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.67, n.2, p.118-125, 2008.

ZHU, Y.; XIONG, Y.Q.; SADYKOV, M.R.; FEY, P.D.; LEI, M.G.; et al. Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus* in vivo virulence by selective inhibition of amino acid transport. **Infect Immun**, v. 77, p.4256–4264, 2009.