

BIÓTIPOS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE *in natura* DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

[*Staphylococcus aureus* biotypes isolated from raw milk of cows with subclinical mastitis]

Adelino da Cunha Neto¹, Edna Lopes Hardoim², Suzi da Cruz Monte³

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Nutrição - UFMT.

² Departamento de Botânica e Ecologia, Instituto de Biociências - UFMT.

³ Bióloga autônoma.

RESUMO - O presente estudo objetivou averiguar a origem de trinta cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras e não produtoras de enterotoxinas isoladas de leite de vacas com mastite subclínica. Para isto, as cepas foram submetidas ao sistema de biotipagem proposto por Devriese, verificando o comportamento destas aos testes bioquímicos de produção de estafiloquinase (K), beta - hemólise (β), coagulação de plasma bovino (CPB) e crescimento na presença de cristal violeta (CV). As 30 cepas de *S. aureus* foram subdivididas em nove biótipos sendo quatro com hospedeiro específico classificadas nos biótipos aviário (05), bovino (02), humano (01) e ovino (01), e cinco biótipos hospedeiros não específico com 21 cepas que apresentaram as seguintes características bioquímicas K-; β +;CPB-;CV:A (06), K-; β +;CPB-;CV:C (05), K-; β +;CPB-;CV:E (04), K-; β -;CPB-;CV:C (03) e K-; β -;CPB-;CV:E (03), que podem ser isoladas de humano, bovino, e ave. O biótipo hospedeiro não específico foi o mais freqüente tanto entre as cepas produtoras de enterotoxinas, como das não produtoras. O predomínio deste biótipo sugere que há deficiência, no manejo dos animais com riscos a saúde pública.

Palavras-Chave: *S. aureus*, biotipagem, enterotoxina, mastite, leite de vaca.

ABSTRACT - The present study aimed to determine the origin of thirty enterotoxin producing and non-producing strains of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis. For this, strains were screened by a biotyping method proposed by Devriese, basing on their production of staphylokinase (K), beta - hemolysis (β), coagulation of bovine plasma (CPB) and growth on crystal violet (CV). The 30 strains of *S. aureus* were grouped into nine biotypes and four of them were host-specific biotypes, as follows: aviary (05), bovine (02), human (01) and sheep (01). Twenty-one strains belonged to five non-host-specific biotypes with the following biochemical characteristics: K - β +; CPB -; CV: A (06), K- β +; CPB-; CV: C (05), K- β +; CPB-; CV: E (04), K- β -; CPB-; CV: C (03) and K- β -;-CPB; CV: E (03); strains grouped into some of these groups could be isolated from human, bovine, and bird. The non-host-specific was the most frequent biotype among enterotoxin producing and non-producing strains. The predominance of non-host-specific biotypes points to the occurrence of a deficient animal management with risks to public health.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biotyping, enterotoxin, mastitis, cow milk.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é conhecida como a doença que acarreta maior gasto às propriedades leiteiras representando 70% das suas perdas econômicas, as quais são atribuídas à queda na produção, ao descarte de leite contaminado, assistência veterinária, gastos com medicamentos e mão de obra, diminuição do valor comercial e reposição do plantel (Martins et al., 2006).

Os patógenos causadores de mastite bovina podem ser divididos em dois grandes grupos; os contagiosos, sendo os mais importantes *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *S. dysgalactiae*, e os patógenos ambientais, grupo no qual se destacam as espécies *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* (Martins et al., 2010).

Dentre as espécies de estafilococos coagulase-positivas, as de maior ocorrência na etiologia

infeciosa da mastite bovina são *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. aureus*, esta última espécie é a de maior importância, pela elevada prevalência (Zafalon et al., 2009) e por representar riscos à saúde pública, quando isolada de leite e produtos lácteos (Garcia et al., 1980). O *S. aureus* aparece como um dos mais prevalentes, e quando estabelecida nas glândulas mamárias do animal lactante, é difícil de ser erradicado (Brito et al., 2000).

Uma variedade de métodos é necessário para controlar a mastite causada por *S. aureus* e um dos caminhos é minimizar o contato do úbere com cepas virulentas hábeis para causar doenças crônicas. Neste propósito muitas informações são necessárias sobre a sua epidemiologia (Myllys et al., 1997).

O *S. aureus* tem como reservatório a pele dos quartos do úbere e tetos da vaca, e pode ser transmitido entre as vacas durante a ordenha. Todavia, cepas advindas de outras origens também podem ser disseminadas. A mistura desordenada existente no convívio dos animais pode possibilitar a transmissão desta espécie de um animal para outro, facilitando assim a contaminação destes (Behme et al., 1996; Silva et al., 2000).

Cepas desse microrganismo podem apresentar um potencial epidemiológico e de virulência variável. Portanto, estudos epidemiológicos detalhados dependem da disponibilidade de sistemas de biotipagem que diferenciem cepas pertencentes à mesma espécie de bactéria. A identificação da origem de contaminação e mecanismos de transmissão possibilita controlar a disseminação de infecções. Na microbiologia veterinária, várias técnicas são aplicadas para caracterização de cepas *S. aureus* isoladas de bovinos (Zadoks et al., 2000).

Segundo Aasrestrup, Wegener & Rosdahl, (1995) diferentes métodos de tipagem como tipagem por antibiograma, biotipagem, fagotipagem, ribotipagem e perfil plasmidial, podem ser aplicados em estudos epidemiológicos de mastite bovina causada por *S. aureus*. Estes pesquisadores concluíram que o melhor método de tipagem é a ribotipagem, mas também a fagotipagem e a biotipagem apresentaram bom poder discriminatório.

Myllys et al. (1997), estudando a epidemiologia da mastite bovina por *S. aureus* utilizando métodos baseados na PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*), ribotipagem e biotipagem, concluíram que os métodos moleculares apresentam vantagens, no entanto, os resultados usando

métodos convencionais de tipagem não deveriam ser desprezados inteiramente. Estes têm permitido uma indicação da origem da contaminação em produtos alimentícios, com o biótipo bem correlato com o animal hospedeiro (Lamprell et al., 2004).

O gênero *Staphylococcus* é adaptado ao hospedeiro e essa proximidade é um meio de conhecer espécies próprias de humanos e ou de outros animais. Estudos clássicos com *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de diferentes grupos de animais já mostravam que eles são bioquimicamente heterogênicos e podem ser separados em vários biótipos (Hajek, 1976). Neste aspecto, a diferença nas características observadas em diversas cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes animais, enfatiza a importância do animal hospedeiro no desenvolvimento de um biótipo específico de *S. aureus* e prove uma útil e prática ferramenta para traçar a origem de cepas isoladas de uma infecção ou de produtos alimentícios (Dimitracopoulos et al., 1977)

O envolvimento de *S. aureus* em doenças humanas e de animais, e sua vasta frequência no ambiente têm justificado investigações com método útil para subdividir esta espécie em variedades ou subespécies. Pesquisadores vêm extensivamente e há vários anos utilizando características bioquímicas tais como presença de estafiloquinase, coagulação de plasma bovino, tipo de crescimento em Agar cristal violeta, produção de β -hemólise e formação de pigmento, para dividir este organismo em variedades ou biótipo (Meyer, 1967; Hajek, 1976; Dimitracopoulos et al., 1977; Devriese, 1984; Shimizu et al., 1986; Al-Tarazi et al., 2009).

Devriese (1984) desenvolveu um sistema de biotipagem que é baseado em características bioquímicas usando quatro testes: presença de estafiloquinase, coagulação de plasma bovino, tipo de crescimento em Agar cristal violeta e produção de β -hemólise. De acordo com este sistema, a bactéria *S. aureus* é assinalada como humana, bovina, ovina, aviária e cinco biovars hospedeiro não específico {biótipo ou ecovar} (Al-Tarazi et al., 2009).

A reação do *S. aureus* ao cristal violeta, classificada como violeta (humana), branca (canina) ou amarela (bovina), tem sido usada para separar biótipos de origem humana e animais (Barer et al., 1992; Marques et al., 2006). Sua ampla distribuição na natureza, particularmente nas narinas de várias espécies de animais de sangue quente, evidencia que biótipos específicos possam ser reconhecidos com

características de cepas adaptadas ao hospedeiro particular (Silva et al., 2000).

Existem cepas de *S. aureus* sobre diferentes ecovares ou biovares, os quais são classificados em biótipos, por sistemas baseados em critérios bioquímicos, característico de cada ecovar distinto, de acordo com sua origem ecológica, isto é, o animal de origem (Devriese, 1984; Lange et al. 1997; Silva et al., 2000).

Segundo Lange et al., (1997), no Brasil ainda são poucas as informações sobre a epidemiologia do *S. aureus* causador de mastite bovina. Verificar a origem das cepas desses microrganismos isolados de leite de vacas com mastite clínicas e subclínica, principalmente aquelas produtoras de enterotoxina estafilocócica é de suma importância (Nagase et al., 2002). No intuito de contribuir com dados sobre a epidemiologia de *S. aureus* causadores de mastite, propõem-se realizar a biotipagem segundo o método proposto por Devriese (1984), em cepas previamente isoladas de leite *in natura* de vacas com mastite subclínica, e sendo algumas produtoras de enterotoxinas (Stamford et al., 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 30 cepas de *S. aureus* as quais foram selecionadas entre 109 cepas de *Staphylococcus* spp. oriundas de leite *in natura* de vacas com mastite subclínica e procedentes de oito fazendas localizadas no município de Garanhuns, região agreste de Pernambuco (Stamford et al., 2006). Cepas que estão armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Básicas em Saúde - DCBS, Faculdade de Ciências Médicas - FCM - Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT. Estas cepas que são mantidas em estoque sob refrigeração e foram revitalizadas para esta análise segundo método de Peresi et al. (1996).

Testes Bioquímicos para Biotipagem de *S. aureus* – para determinação dos biótipos foram realizados os testes de produção de estafiloquinase, β – hemólise, coagulação de plasma bovino e crescimento em meio com cristal violeta, de acordo com Devriese (1984).

Teste de produção de estafiloquinase - foi realizado para verificar a ação da estafiloquinase sobre o fibrinogênio bovino ou plasminogênio canino, foi realizada em placas de Agar nutritivo

com 1% de fibrinogênio bovino e 5% de plasma canino (Devriese, 1984).

Teste de produção de β -hemólise - A determinação do tipo de hemólise e classificação da hemolisina foi segundo de Devriese (1984), teste realizado com meio base para Agar sangue (DIFCO) adicionado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

Teste de coagulação de plasma bovino - Este teste foi realizado e interpretado segundo (Devriese, 1984), o plasma bovino foi obtido a partir do sangue de animais jovens, coletado com EDTA como anticoagulante. Alíquotas de 0,1 ml de crescimento bacteriano em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Merck) foram adicionadas a volumes de 0,5 ml de plasma diluído a 1: 3 e incubados à 37 ° C.

Crescimento em Agar cristal violeta - A verificação do crescimento em presença de cristal violeta, e a característica das cepas de *Staphylococcus aureus* foram interpretadas segundo Meyer (1967). As colônias com cor azul ou violeta receberam a denominação de tipo C, as amarelas pálidas ou brilhantes, com margem azul, tipo A e aquelas brancas ou brancas azuladas E. O teste de crescimento foi feito em placas de Agar nutritivo com 1 μ g / ml de cristal violeta (Devriese, 1984).

Classificação dos biótipos de *Staphylococcus aureus* - Após a realização das provas bioquímicas, a interpretação das reações e a classificação das cepas foram segundo critérios propostos por Devriese (1984); Shimizu et al. (1986).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 30 cepas de *Staphylococcus aureus* submetidas à biotipagem foram selecionadas entre 109 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite *in natura* de vacas com mastite subclínica, entre as quais se detectaram as espécies coagulase positiva *S. aureus*, *S. aureus* termonuclease negativa, *S. hyicus*, *S. intermedius* e cepas que permaneceram somente com a denominação de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva (SCP). Também foram isoladas cepas coagulase negativa como as espécies *S. carnosus*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. schleiferi*, *S. hyicus* e aquelas que permaneceram com a denominação *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Foram detectadas como produtoras de enterotoxinas pelo teste imunoenzimático, VIDAS SET *staph enterotoxin* (bioMérieux, inc. France)

(Vernozy-Rozand et al., 1998), as espécies *S. aureus*, *S. aureus* termonuclease negativa, *S. carnosus*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, SCP e SCN (Stamford et al., 2006).

As cepas de *S. aureus*, em número de 30 foram submetidas à biotipagem segundo sistema proposto por Devriese (1984), nove (30%) foram agrupadas em biótipos hospedeiros específicos e 21 (70%) destas incorporadas a biótipos hospedeiros não específicos (Tabela 1).

Pesquisadores em varias regiões do mundo realizando estudos epidemiológicos de *S. aureus* isolados de vacas com mastite, leite e derivados, utilizando o sistema simplificado de Devriese (1984), obtiveram quanto à classificação destes em biótipos hospedeiros específicos em percentuais similaridades aos encontrados neste estudo. Nagase et al., (2002) verificaram que 16,9% dos *S. aureus* isolados de vacas com mastite em 21 cidades no Japão foram biótipos hospedeiros específicos. Casciano et al., (2003), na Itália, averiguando a correlação entre diferentes métodos de tipagem de *S. aureus* isolados de leite, que a biotipagem permitiu agrupar 25,3% das cepas nestes biótipos. Brito et al., (2000), em Minas Gerais, caracterizando 218 cepas de *S. aureus* isoladas de infecções intramamárias de vacas leiteiras agruparam 28,9% nestes biótipos. Percentual inferior (7,6%) de biótipo hospedeiro específico foi detectado por Aarestrup et al., (1995), avaliando 105 cepas de *S. aureus* por diferentes métodos de tipagem fenotípicas e genotípicas. Já Myllys et al., (1997), verificando a persistência de clones de *S. aureus* em mastite bovina em infecções agudas e

após o tratamento com antibiótico terapia, em 40 cepas encontraram 55% destas pertenciam a biótipos hospedeiro específico, percentuais superiores deste estudo.

O método simplificado de Devriese (1984) apresenta baixo poder discriminatório para classificar cepas dos *S. aureus* de origem bovina. No entanto, Aarestrup et al., (1995) e Myllys et al., (1997), realizando estudos epidemiológicos utilizando métodos para avaliação de características genotípicas (métodos moleculares) e fenotípicas (métodos bioquímicos) em cepas do *S. aureus* isoladas de mastite bovina, afirmam que o sistema de biotipagem sugerido por Devriese (1984) foi encontrado como uma técnica com poder discriminatório relativo, fácil para se realizar em grande número de isolados, com resultados aproximados àqueles dos métodos moleculares, e este método fenotípico permite mesmo parcialmente mostrar diferenças entre as cepas isoladas de bovinos.

Entre os 10 biótipos descritos por Devriese (1984) nove biótipos foram detectados neste estudo. Sendo quatro biótipos específicos com o seguinte percentual de denominação: 16,6% biótipo aviário (05/30), 6,6% bovino (02/30), 3,3% humano e ovino (01/30), respectivamente, designação relativa ao seu hospedeiro original, perfazendo nove cepas de *S. aureus* (Tabela 1). Brito et al., (2000) encontraram os mesmos biótipos, porém, em percentuais diferentes, no estado de Minas Gerais: 16% biótipo bovino (35/218), 7,8% ovino (17/218), 4,6% aviário (10/218) e 0,5% humano (01/218). Todavia, Nagase et al., (2002) no Japão, utilizando o mesmo método detectou dois biótipos, sendo em percentuais de

Tabela 1. Biótipos de 30 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecções intramamária bovina, selecionada entre 109 cepas de *Staphylococcus* sp. de 8 fazendas do município de Garanhuns, PE.

Biótipo	Estafiloquinase	β -hemólise	Coagulação de plasma bovino	Reação em cristal violeta	N.º de amostra (%)	Classificação
1	-	+	-	A	6 (20)	NHS ¹
2	-	-	-	A	5 (16,6)	Aviário
3	-	+	-	C	5 (16,6)	NHS
4	-	+	-	E	4 (13,3)	NHS
5	-	-	-	C	3 (10)	NHS
6	-	-	-	E	3 (10)	NHS
7	-	+	+	A	2 (6,6)	Bovino
8	+	-	-	A	1 (3,3)	Humano
9	-	+	+	C	1 (3,3)	Ovino

¹NHS = "non host specific": características encontradas em amostras isoladas de homem, bovino, coelho, cabra, suíno e alimentos.

9,4% biótipo aviário (05/53) e 7,5% bovino (04/53). Casciano et al., (2003) na Itália, averiguaram a ocorrência de 20,7% das cepas de *S. aureus* no biótipo humano (18/87) e 4,6% biótipo bovino. Nota-se que a maior variedade de biótipos foi detectada entre *S. aureus* isolados de vacas leiteiras, leite e derivados nos trabalhos desenvolvidos no Brasil. Já naqueles estudos desenvolvidos noutros países a variedade é menor, chegando a um biótipo somente como nas pesquisas de Aarestrup et al., (1995) 7,6% em biótipo aviário (08/105) na Dinamarca, e Myllys et al., (1997) 55% no biótipo bovino (22/40), na Finlândia, em *S. aureus* isolados de mastite bovina.

Biótipos hospedeiros não específicos foram detectados, agrupando 21 cepas de *S. aureus* em cinco biótipos, classificadas de acordo com o

comportamento bioquímico que estas expressaram aos testes de estafiloquinase (k), beta-hemólise (β), coagulação do plasma bovina (CPB) e crescimento em cristal violeta (CV), nos seguintes comportamentos bioquímicos: 20% K- β + CPB-CV: A (06/30), 16,6% K - β + CPB - CV: C (05/30), 13,3% K- β + CPB- CV: E (04/30), 10% K- β - CPB-CV: C (03/30) e 10% K- β - CPB- CV: E (03/30), sem certeza do seu hospedeiro original (Tabela 2).

Quanto à produção de enterotoxina estafilocócica, entre as 30 cepas analisadas, 12 foram positivas para a produção destas toxinas e 18 negativas. Observando-se as cepas toxigênicas, verifica-se que 83% (10/12) cepas de *S. aureus* foram classificadas em biótipos hospedeiros não específico, e 17% (02/12) no biótipo aviário (Figura 1).

Tabela 2. Distribuição das cepas *Staphylococcus aureus* pelo seu comportamento aos testes bioquímicos, e sua classificação quanto ao seu biótipo.

Comportamento Bioquímico	Cepas de <i>S. aureus</i> e sua distribuição		
	Biótipo	Número	Código
Hospedeiros específicos			
K-; β -; CPB-; CV: A	Aviário	05	05, 15, 47B, 77, 121
K-; β +; CPB+; CV: A	Bovino	02	35, 97
K+; β -; CPB-; CV: C	Humano	01	04
K-; β +; CPB+; CV: C	Ovino	01	91
Hospedeiros não específicos			
K-; β +; CPB-; CV: A	Não específico	06	20, 26, 27, 36, 55, 02
K-; β +; CPB-; CV: C	Não específico	05	53, 57, 58, 82, 87
K-; β +; CPB-; CV: E*	Não específico	04	44, 46, 59, 81
K-; β -; CPB-; CV: C	Não específico	03	06, 47A, 68
K-; β -; CPB-; CV: E**	Não específico	03	07, 10, 109

Abreviaturas de estafiloquinase (K), beta-hemólise (β), coagulação de plasma bovina (CPB) e tipo de crescimento em cristal violeta (CV). *Cepas com outras características típicas de biótipo bovino; **Cepas com outras características típicas de biótipo aviário.

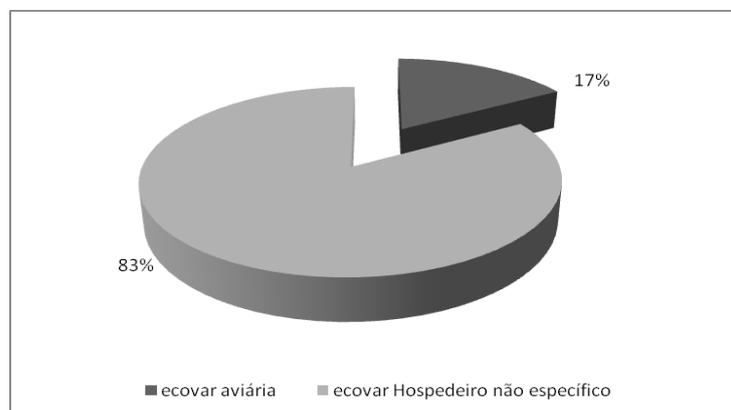


Figura 1. Distribuição percentual de biótipos (ecovar) entre 12 cepas enterotoxigênicas de *S. aureus*, isoladas de vacas com mastite subclínica, Garanhuns, PE.

Neste estudo observou-se que 40% das cepas foram positivas para produção de enterotoxinas estafilocócicas, (12/30) *S. aureus*. Nagase et al., (2002) verificaram que 17 cepas de *S. aureus* entre 53 isolados de mastite bovina, sendo 5,9% do biótipo aviário (01/17) e 94,1% hospedeiro não específico com o comportamento K-; β +; CPB-; CV: A (16/17). Tais resultados são similares ao observado neste estudo (17% para biótipo aviário e 80% para biótipo hospedeiro não específico).

Stamford et al. (2006), afirmam que os prejuízos econômicos causados pela mastite, aliados às questões de saúde pública, tornam a doença uma das maiores preocupações da Medicina Veterinária por várias razões: epidemiologia abrangente, ser de causa plurietiológica e apresentar controle complexo na dependência dos agentes envolvidos e do meio ambiente no qual os animais são criados.

Nagase et al. (2002), comentam que é necessária a caracterização de *S. aureus* isolados de bovinos, principalmente correlacionados a produção de enterotoxinas estafilocócicas, pois são poucas as informações sobre a relação da origem destas cepas de *S. aureus* e sua capacidade de produzir enterotoxinas.

A mastite em bovinos causada por *S. aureus* é determinada principalmente pelas práticas de controle da enfermidade, pelos fatores relacionados à concepção e aos equipamentos de ordenha, além dos fatores relacionados à interação hospedeiro-patógeno. A grande variedade de biótipos de *S. aureus* seja de hospedeiros específicos e não específicos, sugerem que as fontes de infecção para o rebanho foram diversificadas. Além disso, a ocorrência de cepas toxigênicas reforça a necessidade de identificar os fatores relacionados à contaminação e de se programar medidas de controle mais eficazes.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho nos permitem inferir as seguintes conclusões: As cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vaca com mastite subclínica foram classificadas nos biótipos: aviário, bovino, humano, ovino e em grupos hospedeiros não específicos que podem ocorrer em humanos e outros animais. Dentre os vários biótipos encontrados os mais frequentes foram os hospedeiro não específico, que também predominaram entre as cepas produtoras de enterotoxinas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Professor Doutor Rinaldo Aparecido Mota, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE, por ceder as cepas utilizadas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Aasrestrup, F. M.; Wegener, H. C.; Rosdahl, V. T. 1995. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Veterinary Microbiology*. 45: 139 – 150.
- Al-Tarazi, Y.H.; Albetar, M. A.; Alaboudi, A. R. 2009. Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International*. 42: 374-379. Disponível em: www.elsevier.com/locate/foodres.
- Barer, M. R.; Burdess, D.; Freeman, R. 1992 A study into of the mechanism of crystal violet reaction in *Staphylococcus aureus*. *Epidemiology and Infection*.109: 87-96.
- Behme, R. J.; Shuttleworth, R.; McNabb, A.; Colby, W. D. 1996. Identification of *Staphylococci* with a Self-educating system using fatty analysis and biochemical test. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(12): 3075 - 3084.
- Brito, M. A. V. P.; Brito, J. R. F.; Cordeiro, F. M.; Costa, W. A.; Fortes, T. O. 2000. Caracterização de biótipos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 52(5), outubro.
- Casciano, R.; Alberghini, L.; Peccio, A. Serraino, A.; Rosmini, R. 2003. Typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw Milk. *Veterinary Research Communications*. 27(1): 289 – 291.
- Devriese, L. A.1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Journal of Applied Bacteriology*. 56: 215 - 220.
- Dimitracopoulos, G.; Kalkani-Boussiakou, H.; Papavassiliou, J. 1977. Animal fecal carriership and biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 34(5): 461-464.
- Garcia, M. L.; Moreno, B.; Bergdoll, M. L. 1980. Characterization of *Staphylococci* isolated from mastitic cows in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(3): 548-553.
- Hajek, V. 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26(4): 401-408.
- Lamprell, H.; Villard, L.; Chamba, J.F.; Beuvier, E.; Borges, E.; Maurin, F.; Mazerolles, G.; Noel, Y.; Kojdo, A. 2004. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheese and their in vitro ability to produce enterotoxins. *Revue Médecine Vétérinaire*. 155(2): 92 – 96.
- Lange, C.; Cardoso, M.; Pianta, C. 1997. Epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolate from Bovine Mastitis in Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). *Revista de Microbiologia*. 28: 215 – 219.
- Marques, M.R.H.; Martins, R.P.; Cunha Neto, A. 2006. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em leite e queijo:

Identificação, perfil enzimático e biotipagem. Revista Higiene Alimentar. 21(40): 86 – 94.

Martins, R.P.; Marques, M.R.H.; Cunha Neto, A. 2006. Etiologia de mastite subclínica em vacas de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. Revista Higiene Alimentar. 20(139): 104 – 110.

Martins, R. P.; Silva, J. A. G.; Nakazato, L.; Dutra, V.; Almeida Filho, E. S. 2010. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. Ciência Animal Brasileira. 11(1): 181-187.

Meyer, W. A 1967. Proposal for subdividing the species *Staphylococcus aureus*. International Journal of Systematic Bacteriology.17 (4): 387 – 389.

Myllys, V.; Ridell, J.; Björkroth, J.; Biese, I.; Pyörälä, S. 1997. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. Veterinary Microbiology. 51: 245 – 251.

Nagase, N.; Shimizu, A.; Kawano, J.; Yamashita, K.; Yoshimura, H. Ishimaru, M.; Kojima, A. 2002. Characterization of *staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in japan. Journal Veterinary Medicine Science. 64(12): 1169 – 1172.

Peresi, J. T. M., et al., 1996. Comparação entre os caldos de enriquecimento “*Tryptic Soy*” com 10% cloreto de sódio e Giolitti - Cantoni usado na determinação de estafilococos coagulase positiva em alimentos. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 21(2): 83 -86.

Shimizu, A.; Kawano, J.; Kimura, S. 1986. Biotyping of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* strains isolated from various animals in Japan. Japan Journal Veterinary Science. 48(6): 1227 – 1235.

Silva, W. P.; Destro, M. T.; Landgraf, M.; Franco, B. D. G. M. 2000. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilians dairy farms. Brazilian Journal Microbiology. 31: 103 - 106.

Stamford, T.L.M.; Silva, C. G. M.; Mota, R. A. Cunha Neto, A. 2006. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite in natura. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 26(1): 41 – 45.

Vernozy-Rozand, C.; Meyrand, A.; Mazuy, C.; Delignette-Muller, M. L.; Jaubert, G.; Perrin, G.; Lapeyre, C.; Richard, Y. 1998. Behavior and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat’s milk lactic cheeses. Journal Dairy Research. 2: 273 – 281.

Zadoks, R.; Leeuwen, W. V.; Barkema, H.; Sampimon, O.; Verbrugh, H.; Schukken, Y. H.; Belkum, A. V. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. Journal of Clinical Microbiology. 38(5): 1931-1939.

Zafalon, L. F.; Aracaro, J. R. P.; Nader Filho, A.; Ferreira, L. M. 2009. Utilização do teste de Voges- Proskauer e da Coagulase para o diagnostico laboratorial de *Staphylococcus aureus* envolvidos na epidemiologia da mastite bovina. Ciência Animal Brasileira. 10(4): 1285-1293.