

## Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina<sup>1</sup>

Carla C. Lange<sup>2\*</sup>, Maria A.V.P. Brito<sup>2</sup>, José R.F. Brito<sup>3</sup>, Edna F. Arcuri<sup>2</sup>,  
Guilherme N. Souza<sup>2</sup>, Marco A. Machado<sup>2</sup>, Robert Domingues<sup>4</sup>  
e Alessandra P.S. Salimena<sup>5</sup>

**ABSTRACT.-** Lange C.C., Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Arcuri E.F., Souza G.N., Machado M.A., Domingues R. & Salimena A.P.S. 2011. [Identification of *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis by PCR and 16S rDNA sequencing.] Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(1):36-40. Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento 610, Juiz de Fora, MG 36030-330, Brazil. E-mail: [clange@cnpagl.embrapa.br](mailto:clange@cnpagl.embrapa.br)

The objective of this study was to identify the species of 100 isolates of *Staphylococcus* from mastitis in dairy cows from herds located in the state of Minas Gerais, Brazil. PCR reactions were carried out using specific primers described previously for *S. aureus* (*femA* gene), *S. intermedius* (16S rDNA) and *S. hyicus* (16S-23S rDNA spacer region). In addition, products of amplification of variable regions of the 16S rDNA gene of the strains were sequenced. According to the results of the PCR, 83 strains were identified as *S. aureus*, 13 as *S. intermedius*, two as *S. hyicus* and two isolates were not identified. The sequencing of 16S rDNA was applied to 23 strains identified by PCR amplifications: six *S. aureus* and the strains identified as *S. intermedius* (n=13), *S. hyicus* (n=2) or not identified (n=2). The sequencing of 16S rDNA confirmed the six strains as *S. aureus*. The others 17 strains were identified as *S. chromogenes* (13 isolates) and *S. hyicus* (four isolates). Each sample was related to a specie according to the smallest E-value and highest similarity ( $\geq 99\%$ ). The identification of *S. hyicus* and *S. chromogenes* was accomplished only by 16S rDNA sequencing.

INDEX TERMS: Coagulase-positive staphylococci (CPS), coagulase-negative staphylococci (CNS), intramammary infection, *Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*.

**RESUMO.-** O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Staphylococcus* (n=100) isoladas de mastite em rebanhos bovinos do Estado de Minas Gerais. Para esta

finalidade foram utilizadas reações de PCR empregando oligonucleotídeos iniciadores descritos anteriormente para amplificar genes específicos de *S. aureus* (*femA*), *S. intermedius* (rDNA 16S) e *S. hyicus* (rDNA 16S-23S) e o sequenciamento do rDNA 16S. De acordo com as reações de PCR, 83 isolados foram identificados como *S. aureus*, 13 isolados como *S. intermedius*, dois como *S. hyicus* e dois isolados não foram identificados. Foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S seis isolados identificados como *S. aureus* e os 17 restantes. Os seis isolados identificados como *S. aureus* confirmaram essa identificação. Dos outros 17 isolados, 13 foram identificados como *S. chromogenes* e quatro como *S. hyicus*, com similaridade de igual ou superior a 99%. Baseando-se nos resultados da reação de PCR do gene *femA* e do sequenciamento do

<sup>1</sup> Recebido em 20 de abril de 2010.

Aceito para publicação em 8 de setembro de 2010.

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento 610, Juiz de Fora, MG 36038-330, Brasil. E-mail: [clange@cnpagl.embrapa.br](mailto:clange@cnpagl.embrapa.br)

<sup>3</sup> Pólo de Excelência do Leite/SECTES (Secretaria Estadual de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior), Rua Eugênio do Nascimento 610, Juiz de Fora, MG.

<sup>4</sup> Biólogo, Bolsista de Apoio Técnico da Fapemig, Rua Raul Pompéia 101, Belo Horizonte, MG 30330-080, Brasil.

<sup>5</sup> Estudante do Curso de Biologia, Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF), Av. Luz Interior 345, Bairro Estrela Sul, Juiz de Fora, MG 36030-776.

rDNA 16S, foram identificados 83 *S. aureus*, 13 *S. chromogenes* e quatro *S. hyicus*. Neste estudo os oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR para *S. intermedius* não foram específicos, pois amplificaram também *S. chromogenes*; e os empregados na reação de PCR para *S. hyicus* não foram sensíveis, pois falharam na identificação de dois isolados de *S. hyicus*. A identificação definitiva das duas últimas espécies somente foi possível pelo sequenciamento do rDNA 16S.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Estafilococos coagulase positivos, estafilococos coagulase negativos, infecção intramamária, *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*.

## INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina. Entre as espécies mais frequentemente isoladas, *S. aureus* é um patógeno primário, responsável por infecções clínicas e subclínicas e altas contagens de células somáticas (CCS) no leite (National Mastitis Council 2004). Duas outras espécies coagulase positivas, *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido relatadas como causas de mastite, mas são encontradas menos frequentemente nos rebanhos leiteiros (Hodges et al. 1984, Roberson et al. 1996, Capurro et al. 1999, Giannechini et al. 2002). As demais espécies de *Staphylococcus*, classificadas como coagulase negativas, são consideradas patógenos secundários. O grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativos compreende cerca de 40 espécies e subespécies (Bannerman 2003), cuja identificação completa depende de muitos testes fenotípicos ou de testes moleculares, nem sempre disponíveis na rotina do diagnóstico microbiológico. A presença de estafilococos coagulase negativos na glândula mamária está, geralmente, associada a quadros moderados de inflamação. Entretanto, em rebanhos com baixa CCS essas bactérias contribuem para o aumento da CCS do leite total do rebanho (Schukken et al. 2009).

A taxonomia do gênero *Staphylococcus* foi melhor esclarecida nos últimos anos graças ao emprego de técnicas de biologia molecular que permitiram relacionar ou comparar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos. Novas espécies foram descritas (Foster et al. 1997, Devriese et al. 2005) e reclassificações ocorreram (Sasaki et al. 2007). Entre esses métodos, a análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas tem sido empregada para a classificação de microrganismos. Um exemplo dessas macromoléculas é o RNA ribossomal, essencial para a sobrevivência dos organismos, e altamente conservado entre as bactérias. O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética (Becker et al. 2004) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (Nolte & Caliendo 2003). As sequências encontradas são comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e

Ribosomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM) (Becker et al. 2004).

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina no Estado de Minas Gerais, presuntivamente identificadas como *Staphylococcus* coagulase positivos. Para esta finalidade foram utilizadas reações de PCR para amplificar genes específicos das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* e o sequenciamento do rDNA 16S.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados bacterianos

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Leite, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. Foram analisados 100 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de vacas bovinas com mastite clínica ou subclínica, presuntivamente identificados como coagulase positivos. Os isolados se originaram de um estudo anterior, realizado em propriedades leiteiras de diferentes municípios do Estado de Minas Gerais, nos anos de 2002 e 2003 (Souza et al. 2009). As bactérias foram classificadas no gênero *Staphylococcus* de acordo com as características das colônias em ágar-sangue, morfologia e coloração de Gram, teste de catalase, Voges-Proskauer (produção de acetoina) e coagulase (NMC 2004). As bactérias permaneceram estocadas a -20°C e a -80°C em meio contendo leite em pó desnatado e glicerol até o momento dos testes moleculares.

### Reações de PCR

Todos os isolados foram submetidos a três diferentes reações de PCR, visando à identificação de três espécies coagulase positivas, *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. Para identificação de *S. aureus* foram usados oligonucleotídeos descritos por Mehrotra et al. (2000), que amplificam um fragmento do gene *femA*, de 132 pares de bases (pb). Para a identificação de *S. intermedius* foram usados oligonucleotídeos descritos por Wakita et al. (2002), que amplificam um fragmento do rDNA 16S, de 901 pb. E para a identificação de *S. hyicus* foram usados oligonucleotídeos descritos por Forsman et al. (1997), que amplificam um fragmento do rDNA 16S-23S, de 250 pb.

A extração de DNA das culturas foi realizada de acordo com Hesselbarth & Schwarz (1995). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuantpro, Amersham Biosciences) e as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100 µg/µl).

Para a amplificação do gene *femA*, as reações foram incubadas a 94°C por 4 min., submetidas a 5 ciclos de 94°C por 45 seg., 56°C por 45 seg. e 72°C por 45 seg.; 20 ciclos de 72°C por 45 seg., 94°C por 45 seg. e 72°C por 45 seg.; e uma extensão final de 72°C por 5 min. Para amplificação dos genes rDNA 16S e rDNA 16S-23S, as reações foram incubadas a 94°C por 5 min., submetidas a 25 ciclos de 94°C por 1 min., 53°C por 1 min. e 72°C por 1 min. e 30 seg., com uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v). O registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).

As cepas-padrão *S. aureus* ATCC 51651, *S. hyicus* ATCC 11249, *S. intermedius* ATCC 29663, *S. capitis* ATCC 35661, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. gallinarum* 700401, *S. haemolyti-*

*cus* ATCC 29970, *S. lentus* ATCC 700403, *S. lugdunensis* ATCC 49576, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. sciuri* ATCC 29061, *S. simulans* ATCC 27851, *S. warneri* ATCC 49454 e *S. xylosum* ATCC 29971 foram usadas como controles das reações.

### Sequenciamento do rDNA 16S

Foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S seis isolados identificados como *S. aureus* (pelo PCR do gene *femA*) e todos os isolados não identificados como *S. aureus*. As cepas-padrão citadas acima foram usadas como controles.

O DNA bacteriano foi extraído como citado anteriormente. O DNA foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3', que amplificam um produto de 536 pb. O programa de PCR iniciou-se com uma etapa de desnaturação de 5 min., seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. e 74°C por 2 min., com uma extensão final de 74°C por 5 min. Os produtos obtidos foram purificados com um kit de purificação (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota de 200ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais foi utilizado o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, NYSE, Germany) e 0,5µM do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare, NYSE, Germany) e submetidas a 6 kV por 160 min. As reações foram preparadas separadamente com os dois oligonucleotídeos iniciadores de modo a se obter duas sequências para cada amostra analisada.

Os pares de sequências foram editados e reunidos utilizando-se o software SeqMan (LaserGene package, DNASTAR). As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações de PCR para amplificação dos genes *femA* (*Staphylococcus aureus*), rDNA 16S (*S. intermedius*) e rDNA 16S-23S (*S. hyicus*) foram inicialmente estabelecidas com as cepas-padrão citadas no Material e Métodos. Apresentaram produtos de amplificação específicos para os genes citados acima *S. aureus* ATCC 51651, *S. intermedius* ATCC 29663 e *S. hyicus* ATCC 11249, respectivamente.

Dos 100 isolados, 83 apresentaram um produto de amplificação (132 pb) na reação de PCR para *S. aureus*, enquanto que 17 isolados não apresentaram nenhum produto de amplificação nesta reação. Treze isolados apre-

sentaram um produto de amplificação de 901 pb na reação de PCR para identificar *S. intermedius* (87 isolados foram negativos). Dois isolados apresentaram um produto de amplificação específico de 250 pb na reação de PCR para identificar *S. hyicus*, além de um fragmento inespecífico de cerca de 400 pb, cuja ocorrência também foi relatada por Forsman et al. (1997). Os demais isolados (n=98) foram negativos nesta reação. Resumindo, pelas reações de PCR, 83 isolados foram identificados como *S. aureus*, 13 isolados como *S. intermedius*, dois como *S. hyicus* e dois isolados não foram identificados (Quadro 1).

Dos 83 isolados identificados como *S. aureus* pela reação de PCR do *femA*, todos apresentaram resultado positivo na prova da coagulase em tubo e 77 deles (93%) apresentaram resultado positivo no teste de Voges-Proskauer. Nenhum isolado de *S. chromogenes* e *S. hyicus* foi positivo no teste de Voges-Proskauer, confirmando a importância deste teste na identificação fenotípica de *S. aureus*.

Em virtude da coincidência dos resultados dos testes fenotípicos e do PCR do *femA*, seis isolados foram submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S para a confirmação da identidade. Os 17 isolados restantes, não identificados como *S. aureus*, foram também submetidos ao sequenciamento do rDNA 16S, além das 14 cepas-padrão citadas anteriormente. O sequenciamento confirmou a identificação dos seis isolados de *S. aureus*. Treze isolados foram identificados como *S. chromogenes* e quatro isolados como *S. hyicus*.

A identidade das quatorze cepas-padrão incluídas neste estudo também foi confirmada pelo sequenciamento. Cada isolado foi relacionado a uma espécie de acordo com o menor valor E (E-value) e a maior similaridade. Todos os isolados apresentaram similaridade maior ou igual a 99%. Apenas um isolado apresentou o valor E diferente de zero (a cepa-padrão *S. intermedius* ATCC 29663).

No fragmento de 536 pb sequenciado, o número de pares de bases diferentes entre as espécies avaliadas variou de 6 a 28. Entre *S. aureus* e *S. hyicus* houve diferença em 22 pares de bases, entre *S. aureus* e *S. intermedius* (cepa-padrão) foram encontradas diferenças em 28 pares de bases e entre *S. aureus* e *S. chromogenes*, em 23 pares de bases. Entre *S. hyicus* e *S. intermedius* (cepa-padrão) foram encontradas diferenças em seis pares de bases, entre *S. hyicus* e *S. chromogenes*, em nove pares de bases e entre *S. intermedius* (cepa-padrão) e *S. chromogenes*, também uma diferença em nove pares de bases. Conclu-

**Quadro 1. Resultados dos testes usados na identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas neste estudo**

Espécie <sup>a</sup>	Isolados		Nº de isolados positivos/Total			
	Nº	Coagulase	VP	PCR <i>femA</i> <sup>b</sup>	PCR rDNA 16S <sup>c</sup>	PCR rDNA 16S-23S <sup>d</sup>
<i>S. aureus</i>	83	83/83	77/83	83/83	0/83	0/83
<i>S. chromogenes</i>	13	7/13	0/13	0/13	13/13	0/13
<i>S. hyicus</i>	4	4/4	0/4	0/4	0/4	2/4

<sup>a</sup> Identificação baseada na reação de PCR do gene *femA* e no sequenciamento do rDNA 16S. <sup>b</sup> Descrito por Mehrotra et al. (2000). <sup>c</sup> Descrito por Forsman et al. (1997). <sup>d</sup> Descrito por Wakita et al. (2002).

indo, entre *S. aureus* e as outras três espécies (*S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius*) o número de pares de bases não coincidentes foi maior do que 20, enquanto que entre as espécies *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius* o número de pares de bases não coincidentes foram de seis a nove. Portanto, neste fragmento de 536 pb, houve uma grande similaridade entre *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. chromogenes*.

Com a identificação da espécie *S. chromogenes* pelo sequenciamento do rDNA 16S, a prova da coagulase em tubo foi refeita para estes isolados, confirmando a positividade em alguns deles. Nestes últimos isolados deverá ser pesquisada a atividade de coagulação, que pode também ser causada por interferência de proteases, conforme estudos realizados por Wegrzynowicz et al. (1979), Chomarat & Flandrois (1984) e Vandenesch et al. (1994).

Comparando os resultados do sequenciamento com os das reações de PCR, a reação de PCR para *S. intermedius* identificou corretamente a cepa-padrão *S. intermedius* ATCC 29663 e não identificou as outras cepas-padrão, entretanto produtos de amplificação de 901 pb foram obtidos de todos os isolados identificados como *S. chromogenes* pelo sequenciamento. A reação de PCR para *S. hyicus* amplificou a cepa-padrão *S. hyicus* ATCC 11249 e não amplificou as outras cepas-padrão. Produtos de amplificação de 250 pb foram obtidos com dois isolados identificados como *S. hyicus* pelo sequenciamento. Entretanto, falhou em identificar outros dois isolados identificados como *S. hyicus* pelo sequenciamento. Portanto neste estudo os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Wakita et al. (2002) para *S. intermedius* não foram específicos, pois amplificaram também *S. chromogenes*; e os empregados para *S. hyicus* (Forsman et al. 1997) não foram sensíveis, pois falharam na identificação de dois isolados de *S. hyicus*.

O isolamento de *S. chromogenes* está de acordo com resultados encontrados por Birgersson et al. (1992), Aarestrup & Jensen (1997), Taponen et al. (2006, 2008), Gillespie et al. (2009) e Sampimon et al. (2009), que mostraram a disseminação deste agente em rebanhos bovinos. De acordo com Pyörälä & Taponen (2009) *S. chromogenes* e *S. simulans* são atualmente os estafilococos coagulase negativos mais frequentemente isolados de mastite bovina.

O isolamento de *S. hyicus* também foi descrito por Aarestrup & Jensen (1997), Capurro et al. (2002), Giannechini et al. (2002), Taponen et al. (2006) e Sampimon et al. (2009), todos em rebanhos bovinos. Em estudos mais antigos (anos 80) *S. hyicus* era isolado com maior frequência, que pode ter sido em decorrência de uma identificação errônea por causa dos sistemas propostos na época (Bes et al. 2000), ou pelo fato de *S. chromogenes* ser caracterizado na época como *S. hyicus* (*S. hyicus* subsp. *chromogenes*) (Sampimon et al. 2009).

## CONCLUSÕES

Foram identificadas as espécies *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. chromogenes* dos 100 isolados de *Staphylococcus* spp. analisados.

*S. aureus* foi identificado por PCR do gene *femA* e a identificação foi confirmada pelo sequenciamento do rDNA 16S.

As reações de PCR para identificar *S. intermedius* e *S. hyicus*, utilizando oligonucleotídeos descritos na literatura, não foram eficientes para identificar estas espécies.

Os isolados não identificados como *S. aureus* foram identificados como *S. chromogenes* e *S. hyicus* pelo sequenciamento do rDNA 16S.

A identificação definitiva das duas últimas espécies somente foi possível pelo sequenciamento do rDNA 16S.

**Agradecimentos.** - À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CVZ 1816/06) e à Embrapa (MP 03.07.05.013.00/Agrofuturo) pelo apoio financeiro. José Renaldi Feitosa Brito e Robert Domingues foram bolsistas da Fapemig (Convênio 10132/07 e Pronex 4695/EDT 470/07). Alessandra Pereira Sant'Anna Salimena foi bolsista da Fapemig (CVZ 1816/06).

## REFERÊNCIAS

- Aarestrup F.M. & Jensen N.E. 1997. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *J. Dairy Sci.* 80:307-312.
- Bannerman T.L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically, p.384-404. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C. & Tenover R.H. (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington.
- Becker K., Harmsen D., Mellmann A., Meier C., Schumann P., Peters G. & von Eiff C. 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 42(11):4988-4995.
- Bes M., Guérin-Faubleé V., Meugnier H., Etienne J. & Freney J. 2000. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet. Microbiol.* 71:287-294.
- Birgersson A., Jonsson P. & Holmberg O. 1992. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. *Vet. Microbiol.* 31:181-189.
- Capurro A., Concha C., Nilsson L. & Ostensson K. 1999. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scandinavica* 40(4):315-321.
- Chomarat M. & Flandrois J.-P. 1984. Frequency of pseudocoagulase production in *Staphylococcus aureus*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A* 258:441-448.
- Devriese L., Vancanney M., Baele M., Vanechoutte M., De Graef E., Snauwaert C., Cleenwerck I., Dawyndt P., Swings J., Decostere A. & Haesebrouck F. 2005. *Staphylococcus pseudointermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. System. Evolution. Microbiol.* 55:1569-1573.
- Forsman P., Tilsala-Timisjärvi A. & Alatossava T. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143:3491-3500.
- Foster G., Ross H.M., Hutson R.A. & Collins M.D. 1997. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. System. Bacteriol.* 49:489-502.
- Giannechini R., Concha C., Rivero R., Delucci I. & Moreno Lopes J. 2002. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 43(4):221-230.
- Gillespie B.E., Headrick S.I., Boonyayatra S. & Oliver S.P. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol.* 134:65-72.

- Hesselbarth J. & Schwarz S. 1995. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Vet. Microbiol.* 45:11-17.
- Hodges R.T., Jones Y.S. & Holland J.T. 1984. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. *N. Z. Vet. J.* 32(9):141-145.
- Mehrotra M., Wang G. & Johnson W.M. 2000. Multiplex PCR for the detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032-1041.
- National Mastitis Council 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4<sup>th</sup> ed. National Mastitis Council, Verona. 47p.
- Nolte F.S. & Caliendo A.M. 2003. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington.
- Pyörälä S. & Taponen S. 2009. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134:3-8.
- Roberson J.R., Fox L.K., Hancock D.D., Gay J.M & Besser T.E. 1996. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 57(1):54-57.
- Sampimon O.C., Barkema H.W., Berends I.M.G.A., Sol J. & Lam T.J. G.M. 2009. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 134:37-44.
- Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., Takahashi N., Kamata S. & Hiramatsu K. 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45(9):2770-2778.
- Schukken Y.H., González R.N., Tikofsky L.L., Schulte H.F., Santisteban C.G., Welcome F.L., Bennett G.J., Zurakowski M.J. & Zadoks R.N. 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? *Vet. Microbiol.* 134:9-14.
- Souza G.N., Brito J.R.F., Moreira E.C., Brito M.A.V.P. & Silva M.V.G.B. 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:1015-1020.
- Taponen S., Simojori H., Haveri M., Larsen H.D. & Pyörälä S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 115:199-207.
- Taponen S., Björkroth J. & Pyörälä S. 2008. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *J. Dairy Res.* 75:422-429.
- Vandenesch F., Lebeau C., Bes M., Lina G., Lina B., Greenland T., Benito Y., Brun Y., Fleurette J. & Etienne J. 1994. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. *J. Clin. Microbiol.* 32(2):388-392.
- Wakita Y., Kawano J., Shimizu A., Hajek V., Tomisaka E., Yasuda R. & Matsuo E. 2002. Development of a PCR test for the identification of *Staphylococcus intermedius* based on the 16S rDNA sequence. *J. Vet. Med. Sci.* 64(7):603-605.
- Wegrzynowicz Z., Heczko P.B., Jeljaszewicz J., Neugebauer M. & Pulverer G. 1979. Pseudocoagulase activity in staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 9(1):15-19.