

## Identificação genotípica de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a drogas isolados de animais de produção

Stephanie Pedrosa de Oliveira<sup>1\*</sup>, Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier<sup>2</sup>, Cintya Neves de Souza<sup>3</sup>, Gabriel Santos Persiquini Cunha<sup>1</sup>, Afrânio Farias de Melo Júnior<sup>2</sup>, Mauro Aparecido de Sousa Xavier<sup>2</sup>, Demerson Arruda Sanglard<sup>4</sup>, Anna Christina de Almeida<sup>4</sup>

### Resumo

Métodos genotípicos asseguram a identificação dos micro-organismos ao nível de espécie. O gene *femA* (Factor Essential for Methicillin resistance) tem sido utilizado como marcador espécie específico para *Staphylococcus aureus* resistentes ou não a meticilina. O presente trabalho teve como objetivo verificar o uso do gene *femA* como ferramenta para a confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* dentre os isolados de animais de produção. Para tal, amostras coletadas da superfície de tetos e de leite bovino foram utilizadas para isolamento, seleção e identificação de micro-organismos por métodos microbiológicos padrão. Isolados previamente identificados como *S. aureus* e resistentes a oxacilina foram submetidos à extração de DNA genômico de acordo com recomendações do fabricante do kit *KAPA Extract*. Os DNAs foram quantificados e posteriormente submetidos à reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção do gene *femA*. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% e fotodocumentados. Todos os isolados presuntivamente identificados por métodos padrão microbiológicos (14/14) e cepa *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo) amplificaram um fragmento de 132 pares de bases correspondente ao gene parcial *femA*. A presença do gene *femA* em todos os isolados verificados pela análise molecular confirmou a identificação presuntiva microbiológica dos isolados como *S. aureus*.

**Palavras-chave:** Antibióticos. Identificação molecular. Resistência.

## Genotypic identification of multiresistant *Staphylococcus aureus* isolates from the production animals

### Abstract

Identification of microorganisms at the species level is ensured by genotypic methods analyses. The *femA* gene (Factor Essential for Methicillin resistance) has been used as marker specie specific of *Staphylococcus aureus*, independently if it is methicillin-resistant or not. This study aimed to verify the use of *femA* gene as a tool for confirmation of the *Staphylococcus aureus* species in production animals. Samples harvested from the ceiling surface e of cattle's milk were used for isolation, selection and iden-

<sup>1</sup>Acadêmico em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais. Campus Montes Claros. Montes Claros, MG

\*Autora para correspondência: stephanie\_pedrosa\_92@hotmail.com

<sup>2</sup>Docente da Universidade Estadual de Montes Claros. Montes Claros, MG

<sup>3</sup>Bióloga da Universidade Federal de Minas Gerais. Campus Montes Claros. Montes Claros, MG

<sup>4</sup>Docente da Universidade Federal de Minas Gerais. Campus Montes Claros. Montes Claros, MG

Recebido para publicação em 10 de outubro de 2016

Aceito para publicação em 07 de dezembro de 2016

tification of microorganisms by microbiological standard methods. All isolates previously identified as *S. aureus* and resistant to oxacillin were submitted to genomic DNA extraction according to the KAPA Extract kit manufacturer's recommendations. The DNAs were quantified and then submitted to Polymerase Chain reaction (PCR) to detection of the *femA* gene. The amplicons were visualized on 1.5% agarose gel and photodocumented. All isolates presumptively identified by microbiological standard methods (14/14) and *S. aureus* strain ATCC 25923 (positive control) amplified a fragment of 132 base pairs corresponding to the partial *femA* gene. The presence of the *femA* gene in all isolates by molecular analysis confirmed the microbiological method presumptive identification as *S. aureus*.

**Keywords:** Antibiotics. Molecular identification. Resistant.

## Introdução

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica de alta incidência e contaminação, sendo indicativo quando presente no leite de infecção na glândula mamária e ausência de boas práticas de higiene, podendo acarretar em contaminação de produtos derivados do leite (Arcure et al., 2006). Os *aureus* se multiplicam com facilidade em vários alimentos e produzem enterotoxinas termorresistentes, assim, leite cru e derivados, estão associados a surtos alimentares envolvendo os *Staphylococcus sp.* (SANTANA et al., 2010).

O uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais teve como consequência à resistência antimicrobiana de diferentes espécies bacterianas, não somente das *S. aureus*, mas também das *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), enterococos resistente à vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL), representando um risco para a saúde pública (SANTOS, 2004).

Para a realização do uso de antibióticos, deve ser feito um escalonamento, para identificar a etiologia do agente em questão, por meio de exames microbiológicos, sorológicos e de biologia molecular (MENDES; SAPOLNIK; MENDONÇA, 2007). As técnicas microbiológicas mais comumente utilizadas são realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos. As técnicas moleculares utilizadas na microbiologia podem destacar a análise do perfil plasmidial, análise de DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (REA), a ribotipagem e a eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE), essas técnicas utilizadas a mais de duas décadas (GANDRA et al., 2008).

Uma das técnicas para identificação do *S. aureus* são as técnicas moleculares como a de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é um meio eficaz, eficiente, rápido e específico sendo assim mais eficaz que os métodos tradicionais (MENDONÇA et al., 2016). A identificação genotípica do *S. aureus* pode ser feita utilizando o gene *femA* (TEIXEIRA, 2013) que é específico para esta espécie não aparecendo em outras espécies de *Staphylococcus* (SOUZA et al., 2005).

Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso do marcador *femA* como ferramenta para identificação genotípica de *S. aureus* dentre isolados de leite e teto bovinos.

## Material e métodos

Foram realizadas análises microbiológicas para detectar *Staphylococcus aureus* isoladas de superfície do teto de bovino e de leite de bovino pertencentes à bacterioteca do laboratório de sanidade animal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. Foram utilizadas 14 amostras sendo 7 isoladas de superfície do teto de bovino e 7 de leite de bovino. Estas foram submetidas a análises microbiológicas e bioquímicas para identificação de amostras puras e com características esperada, como crescimento em placa contendo ágar sangue, para observar as características morfológicas das colônias e a presença de hemólise, teste de coloração de Gram onde se buscava formação de cocos em aglomerações (CARTER, 1998), catalase para observar produção de bolhas que seriam produção de gases, sendo estas consideradas positivas (MAC FADDIN, 1976), coagulase utilizando plasmas de coelho (MAC FADDIN, 1976) e DNase onde observa-se a formação de halo transparente ao redor do inóculo, sendo está amostra positiva, quando não tem a presença do halo a amostra é negativa (SILVA et al., 1997).

Posteriormente foram realizados antibiograma pela técnica de difusão em disco (CLSI, 2015), sendo este realizado três repetições. Foram utilizados dez discos de antibióticos convencionais sendo estes: Tetraciclina (30µg), Sulfazotrim (25µg), Clindomicina (2µg), Eritromicina (15µg), Cefoxitina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Gentamicina (10µg), Vancomicina (30µg), Oxacilina (1µL) e Penicilina G (10µL) obtidos comercialmente. Para confirmação do micro-organismo em nível de espécie foi realizada a genotipagem por PCR através do rastreamento do gene *femA* (DIAS, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Para tal os isolados previamente identificados resistentes a oxacilina foram criopreservados, foram reativados através da sementeira em agar BHI (Laborclin®) e incubados a 37°C. Após 24 horas de crescimento, as suspensões microbianas foram semeadas em placas de 90 mm contendo meio agar BHI (Laborclin®) e incubadas durante 24 horas. Colônias isoladas das placas foram submetidas à extração de DNA com o kit *KAPAExtract*® conforme recomendações do fabricante. Os DNAs foram diluídos em um volume final de 100µl e posteriormente quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e utilizados nas reações de PCR. A presença do gene *femA* foi verificada pela reação em cadeia da polimerase com os primers *fem-A1* 5'AAAAAAGCACATAACAAGCG3' e *fem-A2* 5' GATAAAGAAGAAACCAGCAG3' gerando um amplicon de 132 pb (Dias, 2009). Os primers foram sintetizados pela *Integrated DNA Technology, USA*. As reações foram realizadas em um mix contendo 1x Tampão da Taq do kit *Kappa PCR*, MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), deoxinucleotídeos (1µM), *Taq Polimerase Kappa* (0,5U), 1,25 µM de cada primer e 1 µl (50ng/µl) de DNA bacteriano em um volume final de reação de 50 µl. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de

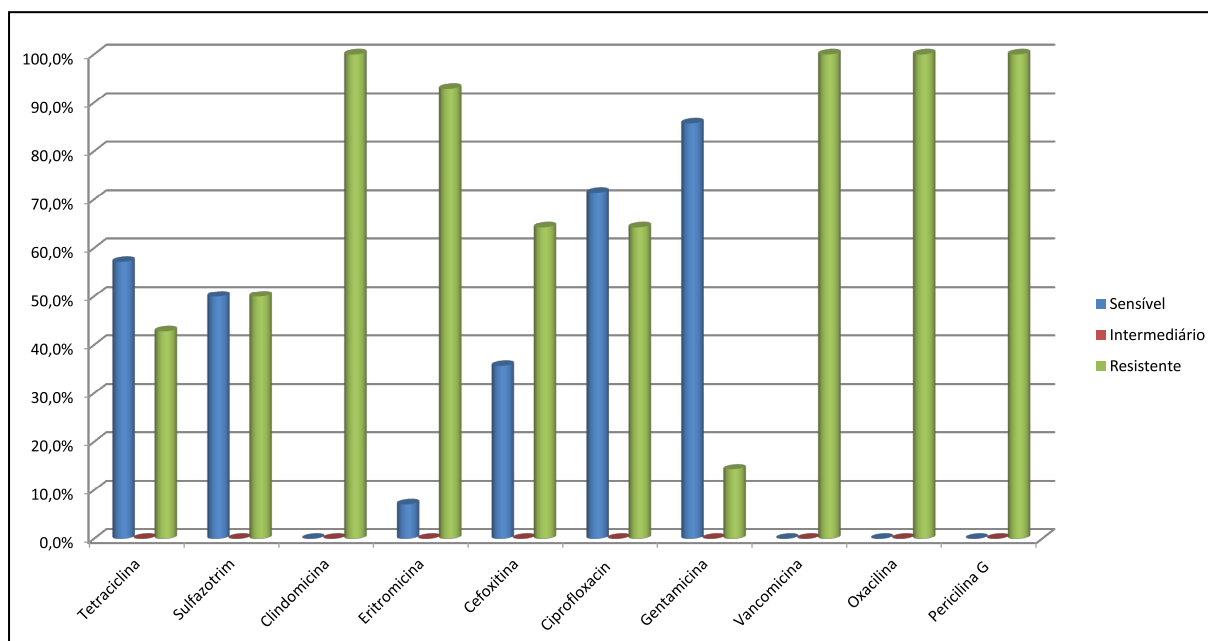
anelamento a 57°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 10 minutos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo e fotodocumentados. Como controle positivo da presença do gene *femA* foi utilizada uma cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 contendo esse gene gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro e uma cepa de *Escherichia coli*.

## Resultados e discussão

Nos testes microbiológicos e bioquímicos realizados todas as 14 amostras foram identificadas como *Staphylococcus aureus* sendo positiva em todos os testes realizados. Nos testes de difusão em disco verificou-se elevada resistência a Penicilina (100%), Oxalicina (100%), Vancomicina (100%), Clindamicina (100%) e Eritromicina (92,86%) dos microrganismos testados (GRÁFICO 1).

Em trabalho realizado por Zafalon *et al.*, (2005) analisando os perfis de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina frente a antimicrobianos convencionais, verificou-se que 68,2% dos microrganismos utilizados apresentaram resistência a mais de um princípio ativo e 87,9% das amostras foram resistentes a antimicrobianos beta-lactâmicos. Guimarães (2015) analisando 150 amostras de *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) e 150 *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) utilizando o método de difusão em disco, verificou que as amostras apresentaram maior incidência de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos. Dentre os antimicrobianos testados frente às linhagens de SCP e SCN verificaram maior resistência a penicilina G 36% e 24,7%, ampicilina 34% e 22,7%, oxacilina 16,7% e 13,3% respectivamente, resultado similar ao encontrado no presente estudo.

Gráfico 1 – Perfil de sensibilidade dos isolados oriundos da superfície do teto bovino e de leite bovino frente a antibióticos convencionais



Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

Um dos fatores que provocam a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos são a recombinação gênica e a mutação espontânea. Os microrganismos resistentes são aqueles que apresentam reação de resistência específico e que não ocorre a inibição por meios de concentrações padrões do antimicrobiano (MOTA *et al.*, 2005).

As bactérias são denominadas multiresistentes quando esta é resistente a três ou mais classes de antimicrobianos, para *Staphylococcus* é considerado a existência ou não da resistência a oxacilina (DELLINGER *et al.*, 2013). Assim como o trabalho proposto onde todos os microrganismos testados foram oxacilina resistentes e resistentes a mais de três antimicrobianos.

O microrganismo, *Staphylococcus aureus* tem destaque como sendo o maior causador de mastite contagiosa e de maior ocorrência nos rebanhos mundiais, e de tratamento muito dificuldade devido à elevada resistência aos antibióticos (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Cepas de *Staphylococcus aureus* são capazes de causar infecções de longa duração, podendo ter tendência a se tornarem crônicas, com baixas taxas de cura e grande perda na produção de leite (SABOUR *et al.*, 2004).

Inúmeros trabalhos vêm relatando a propagação de cepas resistentes aos antibióticos betalactâmicos, que antigamente tinham ação no tratamento das infecções estafilocócicas. Um dos principais mecanismos de resistência descritos é a modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), sintetizada pelo gene *mecA* (AARESTRUP *et al.*, 2001).

O conhecimento da genética de *S. aureus* através da busca de genes de resistência a antibióticos e ou fatores de virulência presentes em seu genoma é salutar. A identificação de *S. aureus* em nível de espécie pode ser realizada por meio da PCR através da detecção do gene *femA*, que tem como produto uma proteína de 48-50kDa, reconhecida como um fator específico e codificada cromossomicamente neste patógeno, sendo envolvido na estrutura da parede celular bacteriana (SILVA; SILVA, 2005; TEIXEIRA, *et al.*, 2014). Neste trabalho todos os isolados presuntivamente identificados como *S. aureus* (14/14) testaram positivos para a presença do gene *femA* (FIGURA 1), sendo considerados, portanto, *S. aureus*, assim como aquelas cepas de *S. aureus* genotipadas por Teixeira, *et al.* (2014). Os controles positivos e negativos, cepas de *S. aureus* previamente genotipada e *E. coli* apresentaram o perfil esperado. Em trabalho realizado por Teixeira (2014), avaliando 278 colônias de *S. aureus* pelo método microbiológico e fenotípico, observou-se que todas as co-

lônias testadas foram positivas para a presença do gene *femA*.

Apesar das cepas serem de origem distintas (superfície de tetos e leite bovinos) a multiresistência a antibióticos e a presença do gene *femA* foram fatores em comum aqui encontrados. Estudos de diversidade genética serão úteis para verificação da proximidade, distância ou clonalidade entre os isolados de *S. aureus* resistentes a oxacilina selecionados neste estudo.

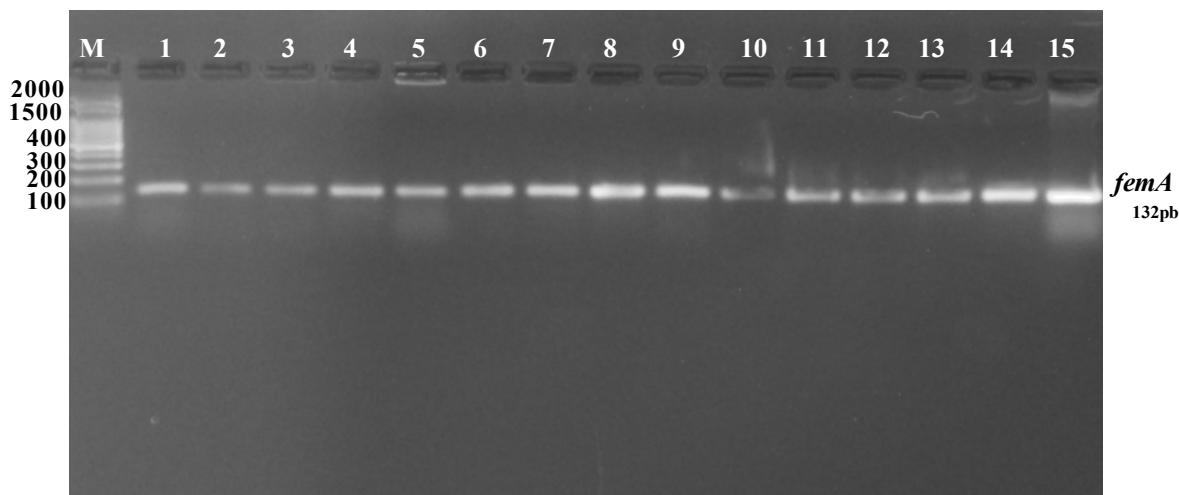
A utilização de cepas genotipadas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 como controles negativos e positivos, respectivamente permitiram verificar a especificidade da amplificação do gene *femA*. Não foi possível verificar a amplificação do gene *femA* na cepa de *E. coli* (resultados não mostrados) no entanto houve a amplificação de um fragmento de 132 pares de bases correspondente ao gene *femA* na cepa genotipada de *S. aureus* bem

como em todos os quatorze isolados identificados por técnicas microbiológicas e bioquímicas com *S. aureus* (FIGURA 1) estando nossos resultados em acordo com a literatura.

A utilização e a qualidade da técnica de PCR vêm sendo muito estudada, em trabalho realizado por Costa (2008) foi possível confirmar por meio da técnica de PCR que 97,7% das 360 amostras de cepas isoladas de casos clínicos e subclínicos de mastite foram identificadas fenotipicamente com *S. aureus* por meio da amplificação do gene *femA*.

Lange *et al.* (2011), realizaram testes utilizando PCR e sequenciamento de rDNA 16S para identificar cepas de *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina, confirmou que os *S. aureus* identificados na técnica de PCR utilizando o gene *femA* e a identificação destas cepas foram confirmadas no sequenciamento do rDNA 16S.

Figura 1 – Reação de PCR para a detecção do gene *femA* dentre os *Staphylococcus aureus* isolados do leite e da superfície do teto de vacas leiteiras



M: Marcador de massa molecular DNA 100 pares de base (*Norgen*); Linhas 1 a 7: Isolados da pele do teto das vacas leiteiras (CT1E, CT13A, CT11B, CT11C, CT11D, CT11A e CT23B). Linhas 8 a 14: Isolados do leite de vacas (25, 34, 29, 33, 32, 24 e 31). A linha 15 mostra o controle positivo (cepa *S. aureus* ATCC 25923). Gel de agarose a 1,5%. O tamanho do marcador 100 pares de base está indicado à esquerda. O fragmento esperado amplificado de 132 pares de base correspondente ao gene *femA* está indicado a direita no gel

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

De acordo com estudos científicos realizados por (COSTA, 2008; DIAS *et al.*, 2011), podem ser realizados testes utilizando a técnica do PCR e o gene *femA* para identificar e detectar cepas de *S. aureus* provenientes de amostras de leite, funcionando assim como marcador epidemiológico e verificando possíveis incidências de infecções intramamárias.

## Conclusão

No presente trabalho foi possível concluir que as cepas isoladas de diferentes origens possuem presença do gene *femA*, sendo assim nota-se que todas as cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas multiresistentes a antibióticos convencionais e resistentes a oxacilina possuem o mesmo gene.

Nota-se que o método de PCR é altamente eficiente e os métodos moleculares são cada vez mais recomendados para identificação de micro-organismos. Com perspectivas futuras pretende-se verificar a análise da diversidade genética entre os isolados identificados como *Staphylococcus aureus* utilizando para tal método de análise de polimorfismo RAPD-PCR.

## 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**, Copenhagen, v. 45, n. 7, p. 2054-2059, 2001.

ARCURI, E. F., *et al.* Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

CARTER G. R. **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 1988. Cap. 17, p. 145-154, 1998. 250 p.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests** - 2015. Disponível em: <<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/01-CLSI-M02-A11-2012.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008.123f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DELLINGER RP *et al.* Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 580-637, 2013.

DIAS, N. L. *et al.* Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1547-1552, 2011.

DIAS, N. L. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a metilina pela técnica de pcr em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas - MG**. 2010. 53 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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

LANGE, C. C. *et al.* Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.

## Comitê de Ética

Aprovado pelo CEUA UFMG sob Protocolo no. 230 / 2014.

## Agradecimentos

À FAPEMIG, CNPq e UFMG-PRPq.

GANDRA, E. A. *et al.* Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 30, n.1, p. 109-118, 2008.

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

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3. ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1976. 912 p.

MENDES, A. V. A.; SAPOLNIK, R.; MENDONÇA, N. Novas diretrizes na abordagem clínica da neutropenia febril e da sepse em oncologia pediátrica. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. S54-S63, 2007.

MENDONÇA, J. F. M. *et al.* **Detecção de células viáveis de *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho pela técnica de PCR em tempo real**. 2016. p.70. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – UFJF, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de fora, 2016.

MOTA, R. A., *et al.* Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, n. 6, v. 42, p. 465-470, 2005.

SABOUR, P. M. *et al.* Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Jornaul of Clinical Microbiology**. Canadá, n. 8. v. 42, p. 3449-3455, 2004

SANTANA, E. H. W., *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 3, v. 77, p. 545-554, 2010.

SANTOS, N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto e Contexto Enfermagem**, Santa Catarina, n. esp, v. 13, p. 64-70, 2004.

SAUNDERS, T. *et al.* Bactérias gram-positivas resistentes a antibióticos. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 62, n. 1/2, p. 23-26, 2005

SILVA N.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005.

TEIXEIRA, J. P. *et al.* Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *femA* e *mecA* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 272-279, 2014.

TEIXEIRA, J. P. **Caracterização fenotípica, genotípica e avaliação por PCR do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite cru refrigerado**. 2013. 69 f. Tese (Doutorado Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

ZAFALON, L. F. *et al.* Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: Custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 577-585, 2007.

ZAFALON, L. F. *et al.* Perfis de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite subclínica. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa v. 62, n. 3, p. 229-234, 2005.