

Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite

[Detection of genes of *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in milk]

N.L. Dias¹, D.C.B. Silva², D.C.B.S. Oliveira²,
A.A. Fonseca Junior¹, M.L. Sales¹, N. Silva¹

¹Escola de Veterinária - UFMG
Caixa Postal 567
30123-970 – Belo Horizonte, MG
²Médica veterinária autônoma

RESUMO

Realizou-se a detecção do gene de *Staphylococcus aureus*, de enterotoxinas e de resistência à meticilina com extração de DNA feita diretamente de amostras de leite. Das 200 amostras estudadas, 145 (72,5%) amplificaram o gene *femA*, e estas foram analisadas quanto à presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *mecA*. Os genes das enterotoxinas mais prevalentes foram: *sea* (60%), *seb* (37,9%) e *sec* (6,9%). Foram encontradas 18 amostras de leite (11,0 %) com *S. aureus* portadores do gene *mecA*. A detecção de *S. aureus* diretamente do leite, sem a necessidade de isolamento bacteriano e a caracterização do potencial enterotoxigênico, demonstra que a técnica de PCR é muito útil para estudos epidemiológicos das infecções estafilocócicas da glândula mamária. O alto percentual (72,5%) de amostras de leite positivas para a presença do gene *femA* sugere que *S. aureus* constitui um dos principais agentes causadores de infecções intramamárias na microrregião de Sete Lagoas-MG e que seu potencial enterotoxigênico e presença do gene *mecA*, que identifica o *S. aureus* resistente à meticilina, representa um risco potencial à saúde pública.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, MRSA, PCR

ABSTRACT

This work was performed to detect the *Staphylococcus aureus* gene, enterotoxins resistance to methicillin with the extraction of DNA directly from milk samples. Of the 200 samples studied 145 (72.5%) amplified the *femA* gene, which were analyzed regarding the presence of *sea*, *seb*, *sec* and *mecA* genes. The most prevalent enterotoxins genes were: *sea* (60%), *seb* (37.9%) and *sec* (6.9%). 18 milk samples (11 %) had *S. aureus* carrying the *mecA* gene. The detection of *S. aureus* directly from the milk, with no need for bacterial isolation and the characterization of the enterotoxigenic potential demonstrate that the PCR technique is very useful for epidemiological studies of staphylococcal infections of the mammary gland. The high percentage (72.5%) of positive milk samples for the presence of the *femA* gene suggests that *S. aureus* constitutes of the main agents which cause intramammary infections in the micro region of Sete Lagoas-MG and that its enterotoxigenic potential and the presence of the *mecA* gene, which identifies the *S. aureus* resistant to methicillin, represent a potential risk to public health.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, MRSA, PCR

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* destaca-se como um dos microrganismos mais frequentemente associados às infecções intramamárias de bovinos em todos os continentes e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (Vasudevan *et al.*, 2003; Costa, 2008). No Brasil, *S. aureus* é considerado o principal agente causal da mamite bovina, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,2% (Costa, 2008).

S. aureus pode produzir enterotoxinas (SE) que são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e são caracterizadas por náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, câibra muscular, queda de pressão sanguínea e prostração (Lamaita *et al.*, 2005). As SE possuem uma estrutura compacta, que confere resistência a enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, renina e papaína (Bergdoll, 1989), e que, dessa forma, resiste à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão (Luz, 2008). Entre outras propriedades, as enterotoxinas são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, e não são inativadas totalmente pela pasteurização e por outros tratamentos térmicos usuais (Bergdoll, 1989).

Nas últimas décadas, tem-se observado a emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos, dentre os quais se destaca *S. aureus*, resistente à meticilina (MRSA – ou Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Essas linhagens não são comumente relatadas em animais, entretanto, nos últimos anos, há registros de aumento de casos de infecções em animais domésticos (Rich *et al.*, 2005),

sugerindo que as infecções mamárias por MRSA, em bovinos leiteiros, podem ser consideradas sério problema no campo (Lee *et al.*, 2004).

Devido à importância das enterotoxinas estafilocócicas veiculadas em alimentos e à resistência dos *S. aureus* a antibióticos utilizados no tratamento de mamite, este trabalho teve o objetivo de detectar, em leite de tanques de refrigeração, o gene *femA*, que é específico de *S. aureus*, e também genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas (SE) A, B e C, além do destaque para detecção dos genes específicos de MRSA.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 200 amostras de leite obtidas em tanque de refrigeração de propriedades rurais pertencentes à microrregião de Sete Lagoas, MG, coletadas no período de março a junho de 2009. Essas amostras foram cedidas pelo Laboratório de Análise de Leite da Escola de Veterinária da UFMG. O leite continha azidiol, substância bacteriostática que possui como princípio ativo clorafenicol e azida sódica, que permite a conservação estável da amostra por até uma semana, sem modificação dos seus componentes.

O protocolo de PCR empregado foi baseado nos trabalhos de Silva e Silva (2005) e Silva (2008). Utilizou-se a técnica da PCR para detecção do gene *femA*, que identifica o *S. aureus*. Esta mesma técnica foi utilizada para a detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, que estão relacionados ao potencial de produção das enterotoxinas A, B e C respectivamente. Foi também pesquisada a presença do gene *mecA*, que identifica MRSA. Na Tab. 1 mostra-se a sequência de iniciadores referente a cada gene pesquisado.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na PCR para identificação dos genes *femA*, *sea*, *seb*, *sec* e *mecA*.

Iniciador	Sequência de primers 5'-3'	Gene	Tamanho do produto (pb)
FemA 1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	<i>femA</i>	132
FemA 2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG		
SEA1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	<i>sea</i>	102
SEA2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG		
SEB1	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	<i>seb</i>	164
SEB2	CCAAATAGTGACGAGTTAAGG		
SEC1	AGATGAAGTTAGTTGATGTGTATGG	<i>sec</i>	451
SEC2	CACACTTTTAGAATCAACCG		
MecA1	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	<i>mecA</i>	533
MecA2	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C		

Detecção dos genes...

A sequência de nucleotídeos e a localização gênica foram derivadas de sequências publicadas dos genes *sea* (Betley e Mekalanos, 1988), *seb* (Johnes e Khan, 1988), *sec* (Bohach e Schillievert, 1987) *femA* (Berger-Bachi *et al.*, 1989) e *mecA*, descritos por Lee (2003).

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo proposto por Millar *et al.* (2000). Amplificações eficientes e reproduzíveis foram padronizadas no termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) com volume final de reação de 20µL. Utilizaram-se 20% de tampão especial IVB 5x (Phoneutria, Brasil), 10µmol/L dos iniciadores, 200pmol/L de dNTPs, 5,0U de Taq polimerase e aproximadamente 100ng de DNA. A quantidade de DNA foi mensurada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoVue GE Healthcare). As condições de ciclagem para análise dos genes *femA*, *sea* e *seb* foram de 94 °C por cinco minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 30 segundos a 72°C, e incubação final de quatro minutos a 72°C. Para análise dos genes *sec* e *mecA*, foi utilizada a seguinte programação: 94°C por cinco minutos, seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 57°C, um minuto a 72°C, e incubação final de 4 minutos a 72°C.

As amostras padrão de *S. aureus*: ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 possuem, respectivamente, os genes para produção de enterotoxinas (SE) A, B e C, e a amostra-padrão ATCC 33591 o gene *mecA*. Para os testes de especificidade analítica da PCR utilizou-se o sequenciamento dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *mecA* e *femA*, usando, respectivamente, o DNA das amostras de referência ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 e ATCC 33591 e ATCC 25923.

O DNA do fragmento amplificado foi submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. O programa de termociclagem foi o mesmo usado para a amplificação dos fragmentos dessa região. Para o sequenciamento, usou-se o sequenciador *ABI Prism 3700 DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Para a análise das sequências e a obtenção do dendrograma, foram utilizados *softwares*

específicos conforme metodologia utilizada por Wichert *et al.* (2009). Após a análise, as sequências de DNA qualificadas foram comparadas em banco de dados (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), por meio da ferramenta BLAST (Altschull *et al.*, 1997) para verificação da sua similaridade em relação às sequências já depositadas no Genbank.

As amostras de leite, após extração do DNA, foram inicialmente processadas com o iniciador FemA. Dessas amostras, apenas as com amplificação positiva foram submetidas à avaliação com os demais iniciadores (SEA, SEB, SEC e MecA).

As amostras-padrão de *S. aureus* ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 e ATCC 33591 foram utilizadas também para padronização da técnica de PCR, do teste de sensibilidade e do controle positivo de *S. aureus* produtor de enterotoxina A, *S. aureus* produtor de enterotoxina B, *S. aureus* produtor de enterotoxina C e MRSA. O DNA extraído do *S. epidermidis* (ATCC 12228) foi utilizado como controle negativo.

A sensibilidade analítica da técnica foi avaliada após a inoculação das amostras de referência de *S. aureus* em meio Brain Heart Infusion (BHI) e incubação à temperatura de 36°C por 24 horas. Após esse período, foram realizadas diluições decimais de cada amostra de referência em tubos de ensaio contendo 9mL de leite estéril que sabidamente não amplificavam nenhum dos genes estudados. No primeiro tubo, foi colocado 1mL da cultura crescida em meio BHI (diluição 10⁻¹), e seguidamente transferidos para os demais tubos até obter a diluição final de 10⁻⁹ (Silva *et al.*, 1997). O leite que estava nos tubos de ensaio com as diluições de *S. aureus* na base 10 foram submetidos à extração do DNA. Foi realizada a reação de PCR com os iniciadores específicos para cada amostra-padrão, com o objetivo de verificar em até qual diluição ocorreria a formação de produtos de PCR. Para obter o valor da contagem presuntiva de *S. aureus* nas diluições realizadas e avaliar a sensibilidade analítica da PCR utilizada, realizou-se contagem bacteriana em placa para cada uma dessas amostras-padrão de *S. aureus* empregando-se a técnica de profundidade em placa (*pour plate*) (Swanson *et al.*, 2001). Essa técnica foi utilizada da seguinte forma: o meio BHI fundido e à

temperatura de 47°C foi vertido sobre a placa de Petri contendo 1mL da suspensão diluída da amostra; após 24h de incubação, o número de colônias contadas foram multiplicadas pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da diluição correspondente à placa de contagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve amplificação do gene *femA* em 145 (72,5%) amostras de leite estudadas, sugerindo ser este um dos principais agentes causadores de mamite naquela região. A utilização do gene *femA*, como marcador epidemiológico para detecção e identificação de *S. aureus*, a partir de amostras de leite, mostrou-se útil em estudos populacionais sobre a dinâmica das infecções intramamárias (Veras, 2004; Costa, 2008).

A especificidade analítica foi verificada pelo sequenciamento, que constatou por meio da Blast altas porcentagens de identidade e valores de *e* e *score* confiáveis para os fragmentos obtidos dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *mecA* e *femA*. A especificidade dessa técnica foi também estudada por Costa (2008), que constatou, pela PCR, a amplificação do gene *femA* em 97,7% das 360 amostras de bactérias isoladas de casos de mamite clínica e subclínica, identificadas fenotipicamente como *S. aureus*.

O resultado da contagem bacteriana em placas foi de $1,90 \cdot 10^9$ UFC/mL para a amostra ATCC 13565; $1,32 \cdot 10^9$ UFC/mL para a amostra ATCC 14458, $1,98 \cdot 10^9$ UFC/mL para a amostra ATCC19095 e $2,07 \cdot 10^9$ UFC/mL para a amostra ATCC 33591. Observou-se que, para os cinco genes testados (*sea*, *seb*, *sec*, *mecA* e *femA*), houve amplificação de produtos de PCR dentro do tamanho esperado até a diluição de 10^{-9} constatado pela eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio (1,5mg/mL), visualizados sob luz ultravioleta.

Os limites de detecção dos genes de *S. aureus* alcançados neste trabalho foram maiores que os obtidos por Ramesh *et al.* (2005) e Silva (2008), que detectaram amplificação de produtos de PCR até a diluição de 10^{-8} e 10^{-9} , respectivamente. Essa diferença de sensibilidade pode ser explicada pela metodologia empregada na extração de DNA e, também, pela diferença dos iniciadores utilizados para a reação de PCR, entre os trabalhos.

Entre as amostras analisadas, 16 (11,0%) delas amplificaram o gene *mecA*, que é específico de MRSA. O primeiro trabalho a analisar a presença de MRSA em extração de DNA feita diretamente do leite, a partir da detecção do gene *mecA*, foi o realizado por Silva (2008), que identificou uma (3,3%) entre 30 amostras de leite de tanque de expansão, procedentes de várias regiões produtoras de leite de Minas Gerais. O maior número de amostras utilizadas neste trabalho, todas procedentes da microrregião de Sete Lagoas, cuja produção é de 186.605 mil litros de leite/ano (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas, 2009), torna este trabalho mais representativo, evidenciando a disseminação desse tipo de microrganismo entre os rebanhos produtores de leite, o que sugere serem as infecções mamárias por MRSA, em bovinos leiteiros, um sério problema no campo, como afirmaram Lee *et al.* (2004).

Das 145 amostras que amplificaram o gene *femA*, 87 (60%) amplificaram o gene *sea*, sendo este o mais prevalente, 55 (37,9%) amplificaram o gene *seb* e, 10 (6,9%) amplificaram o gene *sec*. Ocorreu coamplificação dos genes, *sea* + *seb*, em 42 amostras (28,9%), *sea* + *sec*, em nove amostras (6,2%) e de, *seb* + *sec*, em três amostras (2,06%). Ocorreu também a coamplificação dos três genes *sea* + *seb* + *sec* em três amostras (2,06%). Os resultados observados neste estudo foram coerentes com os encontrados por Veras (2004), Silva (2004) e Nader Filho *et al.* (2007), que também utilizaram a técnica de PCR, com predominância de amostras de *S. aureus* que possuíam o gene *sea*, seguida de *seb* e posteriormente *sec*. A associação de *sea*+*seb* também predominou entre os achados destes autores.

Resultados divergentes foram apresentados por Cardoso *et al.* (2000), ao caracterizarem a produção de enterotoxinas estafilocócicas por 127 amostras de *S. aureus*, isoladas de leite proveniente de vacas com mamite em Minas Gerais, pela técnica de OSP (dupla difusão em gel), em que observaram o predomínio de amostras produtoras de enterotoxina (SE) D, seguida de B, C e A. Luz (2008) também obteve resultado divergente ao deste trabalho no que se refere à presença das enterotoxinas clássicas, pois nos 94 isolados de *S. aureus* de amostras de leite provenientes de vacas com mamite, nenhum apresentava os genes *sea*, *seb* e *sec*, e houve

Detecção dos genes...

apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado nas amostras de referência usadas como controle positivo. Os genes identificados foram os responsáveis pela produção das enterotoxinas (SE) G, H, I e J. Segundo Pinheiro de Sá *et al.* (2004), as SEB predominaram em estudo realizado em amostras de *S. aureus* isoladas de rebanhos com infecções subclínicas. Para esses autores, os resultados apresentados diferem em sua grande maioria, o que deve refletir a importância da genotipagem de amostras de *S. aureus* para uma melhor interpretação. As variações observadas na distribuição dos genes toxigênicos neste e em outros estudos realizados podem estar relacionadas às diferenças geográficas, devido a diferentes condições ambientais, bem como à natureza dos isolados de *S. aureus*.

CONCLUSÕES

O alto percentual de amostras de leite que tiveram o gene *femA* amplificado sugere que o *S. aureus* constitui um dos principais agentes causadores de infecções intramamárias na microrregião de Sete Lagoas-MG. A técnica de PCR utilizada neste estudo apresentou alta especificidade e sensibilidade analítica para diagnóstico de *S. aureus*, enterotoxinas estafilocócicas e MRSA no leite. A técnica de PCR, que utilizou DNA de extrações realizadas diretamente do leite, para identificação de *S. aureus* e determinação do seu potencial enterotoxigênico, mostrou-se útil para estudos epidemiológicos sobre infecções intramamárias causadas por *S. aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: *FOODBORNE bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker, 1989. p.463-523.
- BERGER-BACHI, B.; BARBERIS-MAINO, L.; STRASSLE, A. *et al.* FemA, a hostmediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol. Gen. Genet.*, v.219, p.263-269, 1989.
- BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, v.170, p.34-41, 1988.
- BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.*, v.209, p.15-20, 1987
- CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.22, p.199-206, 2000.
- 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, MG.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. *Produção de origem animal por tipo de produto*. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=74&z=t&o=24&i=P>>. Acessado em: 25 ago. 2009.
- JOHNES, Jr., M.B.; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. *J. Bacteriol.*, v.170, p.4033-4039, 1988.
- LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S. *et al.* Contagem de *Staphylococcus sp.* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.702-709, 2005.
- LEE, J.H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.6489-6494, 2003.
- LEE, J.H.; JEONG, J.M.; PARK, Y.H. *et al.* Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, p.2780-2782, 2004.
- LUZ, I. S. *Caracterização molecular das toxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco*. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE.
- MILLAR, B.C.; JIRU, X.; MOORE, J.E. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J. Microbiol. Methods*, v.42, p.139-147, 2000.

- NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A. *et al.* Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.1316-1318, 2007.
- PINHEIRO de SÁ, M.E.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O. *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, p.320-326, 2004.
- RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.P.; CHANDRASHEKAR, A. *et al.* Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol Cel Probes.*, v.16, p.307-314, 2005.
- RICH, M.; DEIGHTON, L.; ROBERTS, L. Clindamycin resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet. Microbiol.*, v.111, p.237-240, 2005.
- SILVA, E.R. *Genotipagem e avaliação do potencial enterotoxigênico de amostras de Staphylococcus aureus isoladas de mastite caprina e bovina.* 2004. 57f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SILVA, E.R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.*, v.69, p.260-264, 2005.
- SILVA, M.A. *Utilização de PCR Multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina.* 2008. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.* São Paulo: Varela, 1997. p.32-36, 54-57.
- SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p.53-62.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.A. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.179-185, 2003.
- VERAS, J.F. *Identificação por PCR de genes para produção de SEA, SEB, SEC e SED em linhagens de Staphylococcus sp. Isolados de surtos de toxinfecção alimentar por leite e derivados.* 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- WICKERT, E.; GOES, A.; LEMOS, E.G.M. *et al.* Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2. *Rev. Bras. Frutic.*, v.31, p.360-380, 2009.