



DIRCÉIA APARECIDA DA COSTA CUSTÓDIO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS
DE MASTITE BOVINA**

**LAVRAS - MG
2019**

DIRCÉIA APARECIDA DA COSTA CUSTÓDIO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *STAPHYLOCOCCUS*
COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador
Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Seles Dorneles
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Custódio, Dircéia Aparecida da Costa.

Caracterização Molecular e Fenotípica de *Staphylococcus*
coagulase Negativos isolados de mastite bovina / Dircéia Aparecida
da Costa Custódio. - 2019.

55 p. : il.

Orientador(a): Geraldo Márcio da Costa.

Coorientador(a): Elaine Maria Seles Dorneles.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Genes de virulência. 2. Infecção intramamária. 3. Doença de
bovinos. I. Costa, Geraldo Márcio da. II. Dorneles, Elaine Maria
Seles. III. Título.

DIRCÉIA APARECIDA DA COSTA CUSTÓDIO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *STAPHYLOCOCCUS*
COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

**MOLECULAR AND PHENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF COAGULASE
NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019.

Dr Geraldo Márcio da Costa	UFLA
Dr ^a Elaine Maria Seles Dorneles	UFLA
Dr ^a Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dr ^a Glei dos Anjos Carvalho-Castro	UNICOR

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador
Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Seles Dorneles
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

*Aos meus filhos Pâmela e Luiz Felipe, pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu
lado.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, cuja presença eu sinto todo os dias, como prova maior da minha existência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFLA, pela oportunidade de realizar este curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e fomento ao projeto.

Ao meu orientador Dr. Geraldo Márcio, por tantos ensinamentos transmitidos durante todo nosso convívio, pela paciência e ajuda incondicional durante todas as etapas deste trabalho.

À minha Co-orientadora Elaine Seles Dorneles, pela ajuda e incentivo na execução do trabalho.

À professora Christiane Rocha, por me inserir em seu grupo de trabalho e me apoiar e incentivar durante toda a etapa deste trabalho.

À professora Gláucia Frasnelli Mian, pelo apoio e incentivo.

À colega de pós-graduação, Veronica, pela grande ajuda e principalmente pela amizade e pelos muitos conselhos que sempre chegavam na hora certa.

À amiga querida da pós-graduação, Rafaella, pelo apoio e empenho na execução do experimento e também pelos conselhos, sempre nas horas difíceis estava ali para me apoiar.

À amiga querida da pós-graduação, Maysa, pelo apoio, companheirismo e empenho na execução do experimento.

À professora e amiga, Gleí, por sempre acreditar na minha capacidade.

À amiga, Juliana, pelo apoio em todos os momentos,

Às amigas do laboratório, Amanda, Maria Cristina, Marina Romano, Marina Martins, Carine, Núbia, pelo companheirismo.

À Yully, Cristiane, Mírian e demais colegas da Pós-graduação, pelas experiências trocadas ao longo do curso.

Às queridas amigas, Adjamara e Rosana, que considero como irmãs, que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis, sempre acreditaram em mim e nunca me deixaram desistir.

À querida D. Cida, pelas orações.

Aos amigos do DMV, Marcão, Willian, Marquinhos, Rose, Vilma e tantos outros que torceram por mim.

Ao meu esposo Carlos Alberto, pelo apoio, por me substituir na família nas horas quando eu não pude estar presente.

Aos meus queridos filhos Pâmela e Luiz Felipe, pelo amor incondicional.

À minha mãe Dona Maria e aos meus irmãos Adriano, Adilson, Sônia e minha cunhada Lúcia, pelo incentivo.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

RESUMO

Staphylococcus coagulase negativa (SCN) constituem um grupo heterogêneo de bactérias que apresentam grande importância na etiologia da mastite bovina, especialmente em rebanhos nos quais as infecções por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* foram controladas. Considerando a importância crescente que estes agentes apresentam na etiologia da mastite em rebanhos brasileiros, é de grande relevância a identificação precisa dos isolados e a caracterização dos mesmos quanto aos fatores de virulência envolvidos nas infecções intramamárias e quanto à resistência aos antimicrobianos e antissépticos. Diante disto, o presente estudo teve como objetivos: 1) identificar os isolados de SCN pela técnica de espectrometria de massas por ionização (MALDI-TOF); 2) fazer a prospecção dos genes que codificam as enterotoxinas A-E, (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*); as hemolisinas alfa e beta (*hla* e *hly*) e dos genes envolvidos na expressão de biofilme (*icaAD*); 3) Detectar fenotipicamente a produção de hemolisinas alfa e beta e a produção de biofilme. Para o estudo foram selecionadas 123 cepas isoladas de casos de mastite bovina em rebanhos da região sul de Minas Gerais. Para a realização dos testes moleculares, foi realizada a extração e purificação do DNA bacteriano pelo método de guanidina. A pesquisa dos genes codificadores para hemolisinas e enterotoxinas foi realizada por meio da PCR multiplex e do gene *icaAD* por meio da PCR simplex. A produção de biofilme *in vitro* foi avaliada por meio do cultivo dos isolados em ágar vermelho congo e a produção de hemolisinas alfa e beta pelo cultivo dos mesmos em agar sangue contendo 5% de sangue de carneiro. Os testes de resistência a antimicrobianos e antissépticos foram realizados por meio da técnica de CIM (concentração inibitória mínima). Oito espécies de SCN foram identificadas neste estudo pela técnica de MALDI-TOF. A espécie mais frequente foi *Staphylococcus chromogenes* (71,55%), seguida de *S. hyicus* (7,32%), *S. aureus* (4,88%), *S. epidermidis* (4,88%), *haemolyticus* (4,06%), *S. warneri* (3,25%), *S. simulans* (3,25%) e *S. saprophyticus* (0,81%). Os resultados dos testes moleculares demonstraram que todos isolados foram negativos para os genes codificadores das enterotoxinas A-E e que 7,31% dos mesmos apresentaram o gene *IcaAD*. Quanto aos genes relacionados à expressão de hemolisinas (*hla* e *hly*), seis isolados (4,88%) possuíam os dois genes enquanto 78,86% dos isolados foram negativos para ambos os genes; 16,26% apresentaram o gene *hla* isoladamente e nenhum apresentou somente o gene *hly*. Em relação à produção de biofilme *in vitro*, 84,55% dos isolados foram positivos para o teste. Quanto à expressão de hemolisinas *in vitro*, 78,86% dos isolados foram negativos. Os resultados dos testes de suscetibilidade demonstraram que a maior parte dos antissépticos apresentou ação inibitória contra os isolados de SCN, exceção para o glutaraldeído, com 80,49% dos isolados resistentes na concentração de 2%. Em relação à suscetibilidade a antimicrobianos antibióticos, os testes de CIM demonstraram a existência de 44 perfis de suscetibilidade entre os isolados de SCN e a ocorrência do fenômeno da multi-resistência em parcela expressiva da população estudada. O presente trabalho traz contribuições importantes para conhecimentos sobre o perfil epidemiológico, características de virulência e de resistência de SCN envolvido na etiologia da mastite bovina em rebanhos brasileiros.

Palavras-chave: SCN. Virulência. Infecção intramamária. Doença de bovinos, Genes de virulência. Caracterização.

ABSTRACT

Coagulase-negative *Staphylococci*(CNS) is a heterogeneous bacterial group that has high importance in bovine mastitis etiology, especially in herds in which the *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* infections were controlled. The accurate identification and the characterization of these pathogens are extremely relevant because of its high importance in Brazilian herds.. At that, the present study aimed: 1) to identify the CNS isolates using the Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF); 2) to verify the presence of enterotoxins genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), alfa and beta hemolysin genes (*hla* e *hlb*) and biofilm gene (*icaAD*); 3) to evaluate phenotypically the alfa and beta hemolysins and biofilm productions, and 4) to evaluate the antimicrobial and antiseptic susceptibility profiles of strains. For these purposes, were used 123 CNS strains isolated from milk of cows with mastitis, from Minas Gerais south region. The DNA extraction was performed by guanidine method. Multiplex PCR was used to verify the presence of genes related to hemolysin and enterotoxins expression, and single plex PCR to *IcaAD* gene. *In vitro* biofilm production was evaluate by culture of strains in Red Congo agar and the hemolysin production by culture in 5% sheep blood agar. The antimicrobial and antiseptic tests were performed using the minimum inhibitory concentration (MIC) technique according to CLSI (2018). Eight species of CNS were identified by MALDI-TOF. The most frequent specie was *Staphylococcus chromogenes* (71.55%), following by *S. hyicus* (7.32%), *S. aureus* (4.88%), *S. epidermidis* (4.88%), *S. haemolyticus* (4.06%), *S. warneri* (3.25%), *S. simulans* (3.25%) e *S. saprophyticus* (0.81%). The molecular tests showed that all isolates were negative to enterotoxins genes and that 7.31% were positive to *icaAD* gene. PCR tests showed that 78.86% of the isolates were negative to hemolysin genes *hla* and *hlb* and 4.88% was positive to both genes; 16.26% were positive only to *hla* and none isolate was positive only to *hlb*. *In vitro* phenotypic tests to *biofilm* and hemolysin productions showed that 84.55% of the isolates were positive to biofilm and that 78.86% of strains did not showed hemolytic activity. The antiseptic susceptibility tests demonstrated 100% of susceptibility to all antiseptics, except glutaraldehyde, in which 80.49% of the isolates were resistant in concentration of 2%. Antimicrobial susceptibility tests results showed 44 resistance profiles and the multidrug resistance phenomenon was observed in expressive proportion of the population studied. This study presents important contributions about epidemiology, virulence, and resistance profiles of CNS associated with bovine mastitis in Brazilian herds.

Keywords: CNS. Virulence. Intramammary infection. Bovine disease. Virulence genes. Characterization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Dendograma dos 123 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais. 33
- Figura 2. Perfis de virulência dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) isolados de casos de mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais 34
- Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR para prospecção de enterotoxinas A-E 35
- Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR multiplex para prospecção dos genes *hla* e *hnb* codificadores de hemolisinas alfa e beta. 35
- Figura 5. Determinação da capacidade de formação de biofilme em ágar vermelho Congo das de isolados de SCN provenientes de mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais 37
- Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR para prospecção de do gene *icaAD* em isolados de SCN de mastite bovina em rebanhos do Sul de Minas Gerais. 37
- Figura 7. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em SCN isolados de mastite bovina em rebanhos de Minas Gerais, nos períodos de 2004-2007 e 2018..... 41
- Figura 8. Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos em *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) isolados de mastite em rebanhos bovinos do Sul de Minas Gerais, no período de 2004-2007 e 2018..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores, tamanhos esperados dos fragmentos de amplificação e cepas controle utilizados para detecção de genes de virulência em <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN)	28
Tabela 2. Antimicrobianos utilizados nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e faixas de concentração testadas em SCN isolados de mastite bovina.....	30
Tabela 3. Antissépticos e faixas de concentração testadas (%) nos testes de concentração Inibitória Mínima (CIM) em SCN isolados de mastite bovina.....	31
Tabela 4. Frequência de espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativos (SCN) isolados de mastite bovina em rebanhos do sul de Minas Gerais identificados por MALDI-TOF	32
Tabela 5. Resultados dos testes fenotípicos para expressão de biofilme e frequência de genes codificadores de biofilme <i>IcaAD</i> e hemolisinas <i>hla</i> e <i>hly</i> em isolados (N=123) de SCN de mastite bovina.....	36
Tabela 7. Resultados dos testes de avaliação da ação bactericida e bacteriostática dos antissépticos nas diluições correspondentes à CIM para os SCN isolados de mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Importância Econômica da Mastite Bovina.....	15
2.2	Etiologia e Apresentação da Mastite Bovina	16
2.3	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN) Como Agentes da Mastite Bovina ..	17
2.4	Fatores de virulência em <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN)	18
2.5	Métodos de diagnóstico para <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN)	19
2.6	Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	20
2.7	Susceptibilidade aos Antissépticos	21
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo Geral	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	Bactérias utilizadas.....	25
4.2	Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN).....	25
4.3	Identificação dos isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN) por MALDI-TOF.....	25
4.4	Testes moleculares	26
4.4.1	Extração de DNA	26
4.4.2	Prospecção de genes codificadores de enterotoxinas.....	26
4.4.3	Prospecção de genes codificadores de hemolisinas.....	27
4.4.4	Prospecção dos genes de biofilmes <i>icaAD</i>	27
4.5	Identificação fenotípica da produção de biofilme	27
4.6	Pesquisa de hemolisinas <i>in vitro</i>	27
4.7	Eletroforese	29
4.8	Testes de susceptibilidade a antimicrobianos	29
4.9	Teste de Susceptibilidade a Antissépticos	30
5.0	Análise Estatística.....	31
6	RESULTADOS	31
6.1	Identificação dos isolados de SCN	31
6.2	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo.....	34
6.3	Susceptibilidade a antissépticos em <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo.....	38

6.4	Testes de susceptibilidade a antimicrobianos em SCN	40
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite e derivados há tempos se destaca como importante atividade econômica e social no Brasil, com crescimento anual superior à média mundial, garantindo ao país a quinta posição em termos de produção de leite, ficando atrás apenas da União Européia, Índia, Estados Unidos e China, com uma produção total estimada em 33,49 bilhões de litros de leite por ano e média de 1.963,11 litros/vaca/ano (IBGE, 2017).

Apesar da posição de destaque no cenário internacional, o segmento da pecuária leiteira nacional ainda enfrenta dificuldades com relação as enfermidades que acometem os animais, afetando negativamente a qualidade da matéria prima produzida e a produtividade dos rebanhos afetados. Uma das principais doenças que acomete os rebanhos leiteiros nacionais é a mastite.

A mastite, inflamação da glândula mamária, é considerada a afecção mais onerosa para o agronegócio do leite, apresentando grande influência tanto na lucratividade dos produtores, como na cadeia agroindustrial leiteira. Além das implicações econômicas desta doença, deve-se ressaltar o potencial zoonótico de alguns dos patógenos envolvidos em sua etiologia e o impacto dos mesmos na saúde pública, o que gera riscos em relação ao consumo de leite e derivados (SAMPIMON et al., 2011).

Embora a mastite bovina seja de cunho multifatorial, com o envolvimento de diferentes agentes bacterianos, micóticos, virais e algas (SANTOS e FONSECA, 2007), um grupo bastante heterogêneo de bactérias que pode ter origem de mastite contagiosa ou ambiental representado pelos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) vem crescendo em importância na etiologia dos casos de mastite bovina, especialmente em rebanhos nos quais as infecções por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* foram controladas (SAMPIMON et al., 2011). Em seres humanos, estes agentes tem sido associados com intoxicações alimentares, bem como outras afecções (ALMEIDA, 2018).

Os métodos convencionais utilizados na identificação de SCN se baseiam em testes fenotípicos que são geralmente demorados e pouco confiáveis (TOMAZI et al., 2014). Tais fatos geram grande dificuldade na caracterização dos isolados de SCN, o que tem limitado o diagnóstico das infecções ocasionadas por estes agentes (VANDERHAEGHEN et al., 2015) Grandes avanços têm sido proporcionados pela utilização de estudos proteômicos, como a técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF) que gera espectro característico do micro-organismo. Esta técnica proporciona alta capacidade de análise de misturas complexas de biomoléculas e, apresenta ainda alta sensibilidade, proporcionando diagnóstico rápido e preciso (PROD'HOM et al., 2010).

Além da importância da discriminação precisa das espécies de SCN envolvidas nas afecções humanas e animais, deve ser salientada também a necessidade de conhecimento maior sobre os fatores de virulência envolvidos na patogênese das infecções ocasionadas por estes agentes e sobre os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos e antissépticos. Estes aspectos são fundamentais para se traçar o perfil epidemiológico das espécies mais relevantes de SCN envolvidas na mastite bovina e para a adoção de medidas mais efetivas de tratamento e de controle das infecções ocasionadas pelos mesmos. Deste modo, os objetivos deste estudo foram identificar SCN isolados de mastite bovina utilizando a técnica (MALDI-TOF), determinar por meio de testes fenotípicos e genotípicos a presença de fatores de virulência e avaliar os perfis de suscetibilidade a antimicrobianos e antissépticos, a fim de proporcionar novas alternativas para o controle e o tratamento das infecções intramamárias ocasionadas por estes agentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância Econômica da Mastite Bovina

A mastite bovina representa elevado risco para o sistema de produção leiteira, sendo responsável por até 38% do total dos custos diretos das doenças comuns de produção, apesar das diversas pesquisas e medidas preventivas estabelecidas (KEEFE, 2012). Estudos apontam prevalências variáveis entre 15,4 e 28,6% (FONTANA et al., 2010; LANGONI e TRONCARELLI, 2011).

No Brasil, Lopes et al., (2012)) estimaram que o impacto econômico anual da mastite para cada vaca em lactação é da ordem de R\$ 727,13 e R\$ 2.774,11 para frequências anuais de mastite clínica de 1 e 15%, respectivamente. O impacto econômico da mastite está relacionado com a queda temporária ou permanente na produção, descarte do leite de animais em tratamento, custos com tratamento e mão de obra, redução na vida produtiva de vacas afetadas em função de descartes involuntários, baixa qualidade do leite produzido devido a alterações nas contagem de células somáticas (CSS) e composição o que gera redução no preço pago ao produtor, e grandes prejuízo no processamento industrial de leite devido à baixa qualidade da matéria prima(VIGUIER et al., 2009; BLUM et al., 2015).

Além das implicações econômicas mencionadas há também a grande preocupação com a saúde pública, uma vez que há o amplo uso de antibióticos no tratamento e controle da mastite,

o que resulta em aumento do risco de cepas resistentes aos antimicrobianos que podem entrar na cadeia alimentar humana (OLIVEIRA et al., 2009).

2.2 Etiologia e Apresentação da Mastite Bovina

O termo mastite pode ser utilizado para descrever qualquer lesão que resulte em uma inflamação da glândula mamária. A inflamação é resultado, principalmente da invasão microbiana da glândula mamária, podendo também ser ocasionada por vírus, fungos, algas e parasitos (BRADLEY, 2002). Os microrganismos patogênicos que causam a mastite podem estar presentes na própria glândula mamária (agentes contagiosos) ou podem ser provenientes do ambiente de criação (agentes ambientais) (KULKARNI e KALIWAL, 2013; BLUM et al., 2015). Após a invasão, o patógeno estimula o sistema imune humoral e celular do bovino. Caso o hospedeiro não consiga eliminá-lo, ocorrerá a multiplicação na glândula mamária com liberação de toxinas e novo estímulo às células imunes efectoras. Em consequência da reação inflamatória, o tecido secretor pode ser lesionado, ocasionando uma queda na produção do leite (RAINARD e RIOLLET, 2006; VIGUIER et al., 2009).

Os microrganismos contagiosos estão presentes geralmente no interior do úbere ou na superfície do teto de um animal infectado, podendo infectar os demais quartos do úbere do próprio animal e infectar, também, outros animais, principalmente, no momento da ordenha. Geralmente, são microrganismos adaptados a glândula mamária, levando a uma infecção subclínica e de difícil diagnóstico.

Dentre os microrganismos contagiosos, destacam-se pela maior prevalência *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*. Os microrganismos ambientais são aqueles presentes em fezes, solo, água e estalagem dos bovinos, sendo os mais comuns *Streptococcus uberis*, *Klebsiella* spp, *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* (KULKARNI e KALIWAL, 2013). As infecções pelos patógenos ambientais ocorrem, principalmente no intervalo entre ordenhas, embora seja possível a infecção durante a ordenha ou durante o período seco. Estas estão geralmente associadas a situações de imunidade comprometida ou condições de higiene inadequadas no manejo, caracterizando-se por infecção de curta duração em relação à contagiosa, na maioria das vezes de caráter clínico severo, podendo levar à morte do animal (COSTA et al., 2012).

Os sinais da mastite clínica incluem úbere avermelhado, inchado, dor, calor e alteração na secreção do leite dos quartos afetados. O leite pode apresentar coágulos visíveis, podendo ocorrer febre, depressão e anorexia. Ao contrário da mastite clínica, a subclínica é de difícil

detecção, sem sinais visíveis no úbere ou no leite, porém há redução na produção de leite e aumento da contagem de células somáticas (CCS).(KULKARNI e KALIWAL, 2013).Por envolver predominantemente agentes contagiosos e necessitar de recursos indiretos de diagnóstico, a forma subclínica é geralmente a mais prevalente nos rebanhos leiteiros (COSTA et al., 2012). A forma crônica resulta de infecção persistente da glândula mamária, ocasionando lesões permanentes no parênquima mamário (VIGUIER et al., 2009).

2.3 *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN) Como Agentes da Mastite Bovina

Staphylococcus aureus por décadas tem sido considerado o principal agente causador da mastite (ZADOKS et al., 2011). No entanto, em países onde os agentes contagiosos principais da mastite, tais como como *Staphylococcus aureus* e sido controlados, *Staphylococcus coagulase negativos*(SCN) têm se tornado microrganismos emergentes (TAPONEN e PYÖRÄLÄ, 2009). Até o momento, já foram identificadas quarenta espécies de *Staphylococcus*, sendo que dez apresentam subespécies, totalizando 52 espécies e subespécies no gênero(TAPONEN et al., 2016). Os SCN representam a maior parte das espécies do gênero, sendo responsáveis por infecções oportunistas em seres humanos e animais (TOMAZI, 2013).

SCN pertencem à família *Staphylococcaceae*. São caracterizados como cocos gram positivos, com 0,5 a 1,5 de diâmetro, podendo ocorrer de forma isolada, em pares, tétrades, ou de forma irregular como cacho de uvas. São imóveis, catalase positivos, não esporulados e anaeróbicos facultativos (BARNEMAN et al., 2003).

Alguns estudos relatam SCN como importantes agentes causadores da mastite com perda considerável na produção de leite (TOMAZI et al., 2014), sobretudo em vacas primíparas, ocasionando aumento moderados na CCS, com infecções que geralmente desaparecem espontaneamente logo após o parto (TAPONEN e PYÖRÄLÄ, 2009; TOMAZI, 2013).Outros estudos sugeriram que esses microrganismos apresentam efeito protetor na glândula mamária, frente a agentes primários causadores da mastite, com aumento na produção de leite de quartos afetados em relação aos quartos sadios (TOMAZI, 2013).Apesar de serem considerados agentes secundários da mastite bovina, com envolvimento principalmente na forma subclínica e com moderadas alterações na CCS e composição do leite, SCN podem apresentar altos índices de prevalência no rebanho, gerando a necessidade de se adotar medidas de controle e tratamento(SAMPIMON et al., 2011; SUPRÉ et al., 2011).

As espécies de SCN *S. chromogenes* e *S. epidermidis*, apresentam maior afinidade pela glândula mamária, com características de patógenos verdadeiros do úbere, enquanto outras

espécies parecem apresentar características de patógenos ambientais (TOMAZI, 2013). Segundo Supré et al. (2011), *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* induzem aumentos de CCS similares àqueles observados em infecções intramamárias (IIM) causadas por *S. aureus*. Por outro lado, Martins et al. (2017) demonstraram que algumas espécies SCN, como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* isolados de IIM podem produzir substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de alguns agentes causadores de mastites, como *S. aureus*.

Staphylococcus epidermidis é responsável por causar lesões dermatológicas em seres humanos, podendo ser também isolado de canais de tetas de bovinos (VANDERHAEGHEN et al., 2015). Segundo Bexiga et al. (2014), *S. simulans* é frequente em fazendas leiteiras, porém não se sabe ao certo se há uma fonte comum de infecção desse agente. Outra espécie que pode ocupar diferentes habitats é *S. haemolyticus* que pode ser isolados de IIM e também em ambientes de ordenha (TAPONEN et al., 2016).

Segundo Taponen e Pyotala (2009), *S. chromogenes* também pode ser de origem contagiosa, uma vez que algumas cepas foram encontradas em vários animais da mesma fazenda. Em estudos realizados por Tomazi (2013) foi verificada participação frequente de *S. chromogenes* na etiologia dos casos de mastite, tendo aos autores relacionado essa bactéria como um agente adaptado ao úbere.

2.4 Fatores de virulência em *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN)

O conhecimento dos fatores de virulência de SNC envolvidos na etiologia da mastite bovina é importante para elaboração de medidas mais efetivas de controle e prevenção para esta enfermidade, no entanto, existem poucos estudos que avaliaram os fatores de virulência em SCN isolados de mastite.

Entre os fatores de virulência destes agentes podem ser citadas as hemolisinas, que convertem o tecido hospedeiro em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano. Em um estudo realizado com caprinos, a maioria dos isolados de SCN produziu ao menos um tipo de hemolisina, além de elastase e DNase (SILVA et al., 2014). Além disto, de acordo com (KULKARNI e KALIWAL, 2013), tanto *S. aureus* como SCN podem expressar enterotoxinas estafilocócicas e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1).

Em estudo com cultura de células em que se avaliou a capacidade de adesão celular e a internalização das células mamárias epiteliais, observou-se que a capacidade de adesão dos

SCN foi semelhante à verificada para *S. aureus*, mas que a capacidade de invasão do *S. aureus* foi superior à observada para os isolados de SCN(OLIVEIRA, 2017).

A toxínose alimentar estafilocócica é uma das causas mais prevalentes de toxi-infecções alimentares em todo mundo, principalmente associado a cepas de *S. aureus* capazes de produzir enterotoxinas termoestáveis (DINGS et al., 2000; JØRGENSEN et al., 2005). As enterotoxinas estafilocócicas (SEs), bem como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) pertencem à família dos superantígenos (DINGS et al., 2000). SEA, SEB, SEC, SED e SEE representam as enterotoxinas estafilocócicas clássicas bem caracterizadas. Além destas, 16 novos tipos de SE (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) e SEL (SELJ, SELK, SELL, SELM, SELN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU e SEIV) foram relatadas (ARGUDÍN et al., 2010). A expressão de enterotoxinas pode estar relacionada com a virulência em SCN. Embora a produção de SE por *S. aureus* tenha sido bem documentada nos últimos décadas (DINGS et al., 2000; SCHMID et al., 2009) paralelamente, pesquisas acerca da capacidade de (SNC) em produzir enterotoxinas está aumentando nos últimos anos (ZELL et al., 2008; RUARO et al., 2013; AYE et al., 2014; OLIVEIRA, 2017).

Outra característica relevante do SNC é sua capacidade de formar biofilmes, que permitem que a bactéria sobreviva no ambiente, mesmo em presença de antimicrobianos evitando a defesa do hospedeiro (OTTO, 2013; VANDERHAEGHEN et al., 2014). A capacidade dos estafilococos em produzir biofilmes pode ser avaliada fenotipicamente ou pela triagem de genes associados.

Em espécies estafilocócicas, o *locus* de adesão intercelular (*ica*), abrigando o operon *icaADBC*, codifica proteínas envolvidas na síntese de adesina intercelular polissacarídica e do polissacarídeo capsular / adesina (PS / A). De acordo com esses autores o gene *ica* parece ter uma ampla distribuição entre as espécies do SNC de diferentes origens (TREMBLAY et al., 2013; VANDERHAEGHEN et al., 2014).

2.5 Métodos de diagnóstico para *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN)

A identificação do SNC é baseada em reações bioquímicas e fenotípicas, no entanto a identificação incorreta pode ocorrer devido à expressão variável de algumas características fenotípicas (ZADOKS et al., 2011). Diferentes métodos baseados na biologia molecular estão disponíveis e tem sido utilizados para identificar espécies do gênero *Staphylococcus*, dentre estes os sistemas de identificação baseados em sequenciamento dos genes 16S rRNA, *hsp60*, *tuf*, *sodA* e *rpoB* (KARIMI e AMANATI, 2016).

Uma alternativa que vem sendo bastante utilizada para a identificação de espécies e subespécies de SCN é o MALDI-TOF tempo de espectroscopia de dessorção / ionização a laser assistida por matriz. Este método é baseado na diferenciação do perfil de proteínas das células bacterianas, a partir do qual é gerado uma impressão digital espectral de massa única para os isolados (TOMAZI et al., 2014).

A capacidade da técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz seguida de espectrometria de massas por *tempo de voo* (MALDI-TOF) demonstrou fornecer resultados precisos e altamente reprodutíveis para identificar corretamente SCN de origem humana e animal (PROD'HOM et al., 2010)). Além disso, a análise MALDI-TOF é rápida, fácil de processar, além de ser econômica em comparação com muitas das técnicas de identificação molecular (RODRIGUES et al., 2017).

2.6 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

Uma das principais preocupações em relação ao controle da mastite é a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos. A antibioticoterapia é parte importante do programa de controle de mastite bovina, porém o tratamento inadequado contribui o aumento da resistência e causa grandes prejuízos aos proprietários, como gastos com medicamentos e custos veterinários na propriedade (ERSKINE et al., 2003).

Estudos apontam que os SNC são geralmente mais resistentes aos antimicrobianos em relação a *S.aureus* e que podem apresentar resistência a múltiplos fármacos (TAPONEN e PYÖRÄLÄ, 2009). De acordo com (TRINDADE et al., 2005), a resistência a antimicrobianos é um fator importante no estabelecimento e disseminação de clones bacterianos em um rebanho, tendo estreita associação com mudanças no manejo, tais como a implementação de tratamento antibiótico sistemático e ordenhadeira mecânica. Diante disso, é fundamental a realização de pesquisas para aumentar os conhecimentos sobre o perfil de susceptibilidade aos agentes patogênicos responsáveis pelas mastites em bovinos leiteiros (ERSKINE et al., 2003).

Os genes de resistência podem ser adquiridos por meio de transferência horizontal de genes, como exemplo a transferência de plasmídeos que possuem a capacidade de replicação autônoma e podem transportar genes de resistência de cromossomos para plasmídeos e vice-versa (MARTINS et al., 2017).

A resistência cruzada entre antimicrobianos pode ocorrer nas diferentes classes de antimicrobianos que, apesar de estruturalmente diferentes, ligam-se a regiões específicas nas bactérias (FREY et al., 2013). Um exemplo são os macrólidos, lincosamidas e estreptogaminas

que se ligam à subunidade 50S do ribossoma e em locais estreitamente relacionados, possibilitando a ocorrência de resistência cruzada em bactérias Gram-positivas (GRECO et al., 2008). O outro mecanismo de resistência são as bombas de efluxo que são responsáveis pela expulsão do antimicrobiano da célula bacteriana. Os genes que codificam para o mecanismo de efluxo de antibióticos da classe dos macrolídeos podem estar associados a elementos genéticos localizados no cromossoma e podem ser transferidos entre bactérias durante a conjugação (FERNANDES et al., 2014).

Os antimicrobianos macrolídeos, lincosamida e estreptogramina (MLS) são amplamente utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas. A resistência a macrolídeos (como eritromicina) e lincosamidas (como lincomicina e clindamicina) é prevalente entre estafilococos (SANCHEZ et al., 1993; CHANG et al., 1995). Não obstante, a resistência a estreptograminas, que consiste em dois componentes, estreptogramina tipos A e B (por exemplo, pristinamicina IIA e IA, dalfopristina e quinupristina) com atividade sinérgica, é pouco frequente (LONCLE et al., 1993).

2.7 Susceptibilidade aos Antissépticos

Programas de controle eficazes e econômicos de mastite se fundamentam mais na prevenção do que no tratamento, e rebanhos que adotam as medidas de prevenção produzem leite de melhor qualidade a um menor custo. As boas práticas de manejo de ordenha são essenciais para um bom controle da mastite, sendo assim se faz necessário a implementação de práticas de higienização *pré e pós dipping*. O *pré dipping* tem como objetivo prevenir novos casos de mastite principalmente as de origem ambiental, em relação ao *pós dipping*, a finalidade é evitar a mastite contagiosa (PEDRINI e MARGATHO, 2003).

Vários estudos vêm sendo realizados envolvendo as práticas de manejo, higiene e terapia. Com base em tais estudos, foi elaborado um programa avançado de controle de mastite chamado de Programados Dez Pontos (National Mastitis Council – NMC), que estabelece algumas diretrizes para o controle da doença, tais como metas para saúde do úbere, manutenção de ambiente limpo e confortável, manejo de ordenha, manutenção do uso e equipamentos de ordenha, tratamento adequado dos casos clínicos, manejo adequado da secagem dos animais, manutenção da biossegurança contra agentes patogênicos e descarte de animais com infecções crônicas e revisão periódica do programa de controle de mastite.

Em todo o campo de assistência à saúde, as preocupações quanto à transmissão de micro-organismos infecciosos levaram a um aumento no uso de antissépticos. Um antisséptico

ideal deve ser capaz de destruir a forma vegetativa de todos os micro-organismos patogênicos, tempo limitado de exposição e ser eficaz em temperatura ambiente, além de não ser corrosivo, apresentar baixa toxicidade para seres humanos, animais e ser de baixo custo (TORTORA et al., 2016).

Atualmente, os desinfetantes utilizados para desinfecção e antissepsia em geral são álcoois, formaldeído, glutaraldeído, compostos liberadores de cloro ativo (como hipoclorito de sódio), compostos de amônio quaternário (como cloreto de benzalcônio), iodóforos e biguaninas (como clorexidina). Diante dessa variedade de opções, não existe um produto que apresente todas as características desejadas, cada um possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (RAMALHO et al., 2012).

Os vários antissépticos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação em agentes que desnaturam as proteínas; agentes que causam a ruptura osmótica da célula; e agentes que interferem em processos metabólicos específicos (TEIXEIRA e VALLE, 2010).

A clorexidina possui ampla atividade antimicrobiana, porém elimina os micro-organismos numa taxa mais lenta do que a do álcool etílico. De acordo com (TORTORA et al., 2016), sua atividade persiste, embora sua eficácia seja reduzida por materiais orgânicos e altos valores de pH.

Os halogênios constituem alguns dos mais eficazes agentes microbianos utilizados para a desinfecção e antissepsia. O cloro e o iodo são os compostos liberadores de halogênio mais utilizados e estudados para as mais diferentes aplicações (DINIZ e MATTÉ, 2013). As soluções antissépticas comercializadas geralmente contém 1% (p/v) de iodo disponível em base alcoólica ou aquosa. As soluções diluídas possuem atividade mais rápida do que a das concentradas. A razão para tal ainda não está totalmente esclarecida, mas foi sugerido que a diluição do PVP-I resulta no enfraquecimento da ligação do iodo com o polímero carreador, aumentando a concentração de iodo na solução. Assim, o iodóforo deve ser adequadamente diluído para alcançar a atividade antimicrobiana (TEIXEIRA e VALLE, 2010).

O hipoclorito de sódio ou de cálcio liberam facilmente o cloro ativo e, desta forma, possui ação muito rápida e eficaz. No entanto, a mesma rapidez na reação, que lhe confere excelente eficácia antimicrobiana, também é responsável pela sua degradação e liberação no ar. Desta forma, o efeito residual do cloro gerado pelo hipoclorito é muito baixo, sendo estimado que em 2 a 4 horas já não se tenha um nível bactericida significativo (JONES et al., 2004).

Um dos compostos fenólicos mais utilizados é o triclosano, um fenoxifenol. O triclosano é ativo contra as bactérias, mas não contra outros micro-organismos. Trata-se de um agente antisséptico comum encontrado em sabonetes (ANDRADE et al., 2011).

Os agentes de superfície mais amplamente usados são os detergentes iônicos, especificamente os compostos de quaternário amônio (quats). Sua capacidade de limpeza está relacionada à parte positiva carregada de cátion da molécula. Os compostos de amônio quaternário são fortemente bactericidas contra as bactérias Gram-positivas e um pouco menos ativos contra as bactérias Gram-negativas (NÓBREGA, 2013).

Em relação ao aspecto de susceptibilidade aos antissépticos, apesar de ainda não ter sido evidenciada a ligação entre o uso de antissépticos com a emergência de resistência a antissépticos e antibióticos, deve-se monitorar o uso de antissépticos, uma vez que os microorganismos tendem a se adaptar para sobreviver (JONES et al., 2004).

O sucesso dos procedimentos de desinfecção e antisepsia depende de alguns fatores importantes, como a escolha apropriada do produto, de acordo com o objetivo do procedimento; preparo e aplicação do produto; observação do tempo de contato; manipulação adequada após a desinfecção; e utilização de produtos eficazes, com a qualidade comprovada (TEIXEIRA e VALLE, 2010).

De acordo com (Santos e Fonseca, 2007) a resistência de cada bactéria está diretamente ligada ao tempo de exposição frente a determinada concentração do desinfetante. Nos experimentos realizados *in vitro*, com o álcool 70° GL, este se apresentou ineficaz contra *S. epidemidis* após 30 segundos de exposição, tendo sido observado considerável variação no tempo necessário para inibir outros microrganismos. Segundo estes autores, muitos aspectos de cada antisséptico devem ser cuidadosamente considerados. A escolha inadequada do produto pode levar à seleção natural de isolados bacterianos resistentes na população microbiana com importantes implicações para os programas de controle de mastite.

Kassaify et al., (2007) relataram menor atividade bactericida *in vitro* de antissépticos à base de iodóforo que antissépticos contendo glutaraldeído e amônia quaternária em painel de bactérias associadas ao leite comum, incluindo *S. aureus*.

A clorexidina é bastante utilizada para o tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas devido ao seu efeito cumulativo e contínuo, permanecendo na pele no mínimo por seis horas (SPINOSA et al., 1999), além disso, atua na presença de matéria orgânica, é de fácil aplicação e econômico. De acordo com (PHILLIPS et al., 1991), quando comparado ao iodo, a clorexidina causa menor reação tecidual nas diluições recomendadas.

Medeiros et al., (2009) demonstraram que o iodo e a clorexidina tiveram a maior atividade desinfetante *in vitro* contra *S. aureus* isolados de IIM em bovinos de rebanhos leiteiros localizados na Região Metropolitana de Recife, no Agreste e na Zona da Mata de Pernambuco

(Brasil), seguidos de amônia quaternária, ácido láctico e cloro. No entanto, existem poucos estudos focando o perfil de suscetibilidade de SCN aos antissépticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotípica e genotipicamente amostras de SCN isoladas de mastite em rebanhos bovinos de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar por meio da técnica de MALDI–TOF amostras de SCN isoladas de mastite bovina;
- Pesquisar por meio da técnica de PCR a presença de genes codificadores das enterotoxinas A-E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), e sua relevância para SCN isolados de infecções mamárias de bovinos;
- Pesquisar fenotipicamente a produção de hemolisinas alfa e beta e a capacidade de formação de biofilmes nos isolados de SCN de bovinos.
- Pesquisar por meio da PCR a presença de genes *icaAD* relacionados com formação de biofilme e os genes *hla* e *hlb* relacionados com a expressão das hemolisinas alfa e beta em SCN isolados de mastite bovina.
- Determinar o perfil de suscetibilidade a antissépticos e antimicrobianos em SCN isolados de mastite bovina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias utilizadas

Para a execução do presente estudo, foram utilizadas 123 cepas de SCN isoladas de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina em rebanhos leiteiros do Sul de Minas Gerais, sendo que 82 cepas foram isoladas no período de 2004 a 2007 e 41 no ano de 2018.

4.2 Caracterização fenotípica dos isolados de *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN)

Todos os isolados foram identificados fenotipicamente por avaliação da morfologia das colônias em ágar sangue, morfologia microscópica (Gram) e testes de oxidase, catalase e coagulase de acordo com (QUINN et al., 1994).

4.3 Identificação dos isolados de *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN) por MALDI-TOF

A caracterização dos isolados de SCN foi realizada por meio da técnica de espectrometria de Massa (MALDI-TOF), em espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, EUA).

Para tal, os isolados foram cultivados em agar BHI por 24 horas a 37°C. Após o crescimento, 3 a 4 colônias foram transferidas para um tubo contendo 300 µL de água deionizada ultra-pura e agitadas em vórtex, para a obtenção de uma suspensão homogênea. Em seguida, adicionou-se 900 µL de etanol 75%, seguindo-se a centrifugação a 21000 g por 2 min. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o pellet recuperado. Para lisar as células bacterianas, foram adicionados 50 µL de uma solução de ácido fórmico a 70% e, em seguida, 50 µL de acetonitrila a 100%, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos.

Alíquotas de 1µL do sobrenadante de cada isolado foram depositadas separadamente em uma placa metálica de MALDI (Waters Manchester, UK) e recoberta com 1µL de solução matriz, composta de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluída em acetonitrila 50% e de ácido trifluoroacético a 2,5%. A identificação e classificação dos microrganismos foram realizadas por meio da leitura de fingerprints medidos por meio de espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, EUA). O perfil protéico dos microrganismos foi caracterizado pelo software MALDI BioTyper™ (Bruker Daltonics, EUA) que possibilita a identificação dos

microrganismos por meio da comparação com dos perfis protéicos contidos no banco de dados do software.

4.4 Testes moleculares

Todos os isolados foram submetidos a PCR multiplex para prospecção de genes codificadores da expressão de biofilmes, hemolisinas *alfa* e *beta* e enterotoxinas A-E. Os iniciadores utilizados em todas as reações, o tamanho dos fragmentos de amplificação e os controles positivos utilizados estão relacionados na Tabela 1.

Os ensaios foram realizados em termociclador (Peltier Thermal CyclerMulti-Purpose) (Biocycle®, China).

4.4.1 Extração de DNA

Os isolados de SCN foram cultivados em ágar BHI (Himedia®, Índia) a 37°C durante 24 horas. Após esse período, alíquotas das culturas foram ressuspensas em tampão PBS 1X e em seguida realizou-se a extração do DNA genômico pelo método da guanidina, de acordo com (PITCHER et al., 1989). O pellet (DNA) foi ressuspendido e diluído em 50 µL de água ultra-pura. A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% que foi corado com brometo de etídeo. A quantificação e qualidade do DNA extraído foram avaliadas em espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare – Life Sciences).

4.4.2 Prospecção de genes codificadores de enterotoxinas

Foi pesquisada a presença dos genes que codificam as enterotoxinas A-E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) de acordo com o método descrito por (M. ELKENANY et al., 2010). , realizando a otimização das reações quando necessário.

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial 94 °C por 5 min, 94 °C, 1 min., total de 30 ciclos, anelamento dos primers 57°C por 1 min., extensão final a 72 °C, 1 min., seguido de extensão final a 72 °C durante 10 min.

4.4.3 Prospecção de genes codificadores de hemolisinas

A presença dos genes que codificam as hemolisinas alfa (*hla*) e beta (*hlb*) foi realizada por meio de PCR multiplex, segundo a metodologia descrita por (JARRAUD *et al.*, 2002), realizando-se a otimização das reações quando necessário.

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial 94 °C por 5 min, 94 °C, 1 min., total de 35 ciclos, anelamento dos primers a 57°C por 1 min. e extensão a 72 °C, 1 min., seguido de extensão final a 72 °C durante 7 min.

4.4.4 Prospecção dos genes de biofilmes *icaAD*

A pesquisa dos genes de expressão de biofilme *icaAD* foi realizada por PCR multiplex de acordo com as condições indicadas por (VASUDEVAN *et al.*, 2003), realizando-se otimizações quando necessário. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial 95°C por 7 min., 94°C por 1 min., total de 30 ciclos, anelamento dos primers a 57°C por 1 min., extensão a 72°C por 90seg., seguido de extensão final a 72°C por 15 minutos.

4.5 Identificação fenotípica da produção de biofilme

Para verificar a capacidade de produção de biofilme *in vitro*, realizou-se o repique dos isolados em ágar Vermelho Congo seguindo-se a incubação das placas por 24 a 48h a 37°C de acordo com (GRECO *et al.*, 2008). Colônias negras foram consideradas produtoras de biofilme e aquelas que apresentarem coloração rosa foram consideradas negativas. Para validar o teste utilizou-se como controle positivo a amostra *S. ATCC 51651* e como controle negativo um isolado SCN de origem bovina pertencente ao Laboratório de Microbiologia - DMV - UFLA.

4.6 Pesquisa de hemolisinas *in vitro*

Para verificar a presença de hemólise alfa e beta *in vitro* os isolados foram cultivados em sangue de ovino a 5%, a 37°C por 24 horas. A leitura dos testes foi realizada e interpretada de acordo com (QUINN *et al.*, 1994).

Tabela 1. Iniciadores, tamanhos esperados dos fragmentos de amplificação e cepas controle utilizados para detecção de genes de virulência em *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN)

Fator de virulência		Genes	Sequência dos primers	Fragmento esperado (pb)	Controles Positivos (ATTC)	Fonte
<i>Entero toxina estafilocócica A</i>		<i>sea</i>	GSEAR-1 GGTTATCAATGTGCGGGTGG GSEAR-2 CGGCACTTTTTCTCTTCGG	102	13565	Mehrotra et al., 2000
<i>Entero toxina estafilocócica B</i>		<i>seb</i>	GSEBR-1 GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC GSEBR-2 CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	14458	Mehrotra et al., 2000
<i>Entero toxina estafilocócica C</i>		<i>sec</i>	GSECR-1 AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG GSECR-2 CACACTTTTAGAATCAACCG	451	19095	Mehrotra et al., 2000
<i>Entero toxina estafilocócica D</i>		<i>sed</i>	GSEDR-1 CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG GSEDR-2 ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC	278	23235	Mehrotra et al., 2000
<i>Entero toxina estafilocócica E</i>		<i>see</i>	GSEER-1 AGGTTTTTTCACAGGTCATCC GSEER-2 CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209	27644	Mehrotra et al., 2000
Alfa-hemolisina	<i>Hla</i>	<i>Hla</i>	HLA-1 CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG HLA-2 CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	209	8096	Jarraudet al., 2002
Beta-hemolisina	<i>Hlb</i>	<i>Hlb</i>	HLB-1 GTGCACTTACTGACAATAGTGC HLB-2-2 GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	13566	Jarraudet al., 2002
Biofilme	<i>icaA</i>	<i>icaA</i>	icaA-1 CCTAACTAACGAAAGGTAG icaA-2 AAGATATAGCGATAAGTGC	1315	51651	Vasudevanet al.,2003
Biofilme	<i>icaD</i>	<i>icaD</i>	icaD-1 AAACGTAAGAGAGGTGG icaD-2 GGCAATATGATCAAGATAC	381	51651	Vasudevanet al.,2003

4.7 Eletroforese

Todos os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (Invitrogen Brasil, São Paulo) corados com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando-se tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) (89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8.0). Utilizou o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (KASVI, Brasil). As imagens foram reveladas e registradas em aparelho transluminador (L-Pix Chemi Photo Digitizer - Loccus Biotecnologia, Brasil) para análises posteriores.

4.8 Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade dos isolados de SCN frente aos antimicrobianos foi obtida por meio da técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo as normas do CLSI (2018). Os ensaios para 8 antimicrobianos foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços, tendo sido testados oito antimicrobianos em diferentes faixas de concentração, descritos na Tabela 3. O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton (Himedia®, Índia) suplementado com os cátions divalentes Ca +2 e Mg +2 (CAMHB) . As amostras foram previamente cultivadas em ágar soja tripticaseína soja (TSA) (Himedia® Índia) a 37°C por 24 – 48 horas. Os isolados foram ressuspensos em solução salina (0,9%), ajustadas à turbidez de 0,5 da escala de Mac Farland que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em cada poço contendo as devidas concentrações do antimicrobiano em caldo Muller Hinton, foram adicionados 10 µl da suspensão bacteriana padronizada, seguindo de agitação e incubação por 24 horas a 37 °C. Todos os testes foram realizados em duplicata, e para a validação foram utilizados como controles *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, ATCC *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. A CIM foi determinada como a menor concentração de cada antibiótico em que não foi possível a detecção visual do crescimento bacteriano. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os padrões do CLSI (2018).

Para verificar se os antimicrobianos testados tinham ação bactericida ou bacteriostática na diluição correspondente á CIM, uma alíquota da diluição correspondente à CIM de cada isolado foi cultivada em TSA, para verificar se houve crescimento (ação bacteriostática) ou não (ação bactericida).

Tabela 2. Antimicrobianos utilizados nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e faixas de concentração testadas em SCN isolados de mastite bovina

Antibióticos	Faixas de Concentração testadas (µg/mL)
Eritromicina	32 - 0,025
Tetraciclina	128- 0,25
Gentamicina	64 - 0,25
Ceftiofur	32 - 0,025
Cefalotina	32 - 0,025
Ciprofloxacina	64 – 0,25
Sulfa – Trimetropim	16/304 - 0,062/1,18
Novobiocina	256 – 1

Fonte: Do Autor (2019).

4.9 Teste de Susceptibilidade a Antissépticos

A suscetibilidade dos isolados de SCN frente aos antissépticos foi realizada em microplacas estéreis de 96 poços empregando-se a técnica de microdiluição para obtenção da CIM. O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton (Himedia® India). Foram utilizados sete antissépticos em diferentes faixas de concentração, descritos na Tabela 3. Todos os antissépticos foram diluídos de acordo com as normas da ANVISA (2008) e todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para a execução dos testes, os isolados foram previamente cultivados em TSA (Himedia® India) a 37°C por 24 – 48 horas. Os isolados foram ressuspensos em solução salina (0,9%), ajustadas à turbidez de 0,5 da escala de Mac Farland que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em cada poço contendo as devidas concentrações do antisséptico em caldo Muller Hinton, foram adicionados 10 µl da suspensão bacteriana padronizada, seguido-se de agitação e incubação por 24 horas a 37 °C. Todos os testes foram realizados em duplicata, utilizando-se controles negativos e positivos do crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração de cada antisséptico na qual não foi possível a detecção visual do crescimento bacteriano.

Para verificar se os antissépticos testados tinham ação bactericida ou bacteriostática na diluição correspondente à CIM, uma alíquota da diluição correspondente à CIM de cada isolado foi cultivada em TSA.

Tabela 3. Antissépticos e faixas de concentração testadas (%) nos testes de concentração Inibitória Mínima (CIM) em SCN isolados de mastite bovina

Antisséptico	Pureza	Fabricante	Faixas de concentração testada (%)
Ácido Láctico	85%	Sigma	2 - 0,0078
Ácido Peracético	80%	Sigma	2 - 0,0078
Amônia Quaternária	100%	Sigma	2 - 0,0078
Clorexidina	20%	Sigma	0,1 - 0,00039
Glutaraldeído	100%	Sigma	2 - 0,0078
Hipoclorito de Sódio	30%	Sigma	2 - 0,0078
Iodo	2%	Sigma	0,5 - 0,00195
Peróxido de Hidrogênio	30%	Sigma	1 - 0,0039
Triclosano	10%	Sigma	0,5 - 0,00195

Fonte: Do Autor (2019).

5.0 Análise Estatística

A análise estatística para comparação das características avaliadas foi realizada utilizando o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher e análise descritiva, de acordo com os resultados, com o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Identificação dos isolados de SCN

Por meio da técnica de MALDI TOF, oito espécies diferentes de SCN foram identificadas (Tabela 4). E por meio do Programa Maldi Biotyper 3 R, que utiliza os espectros gerados pelo MALDI TOF, o qual ilustra a similaridade do proteômico dos isolados, foram gerados cinco clusters (em cores diferentes).

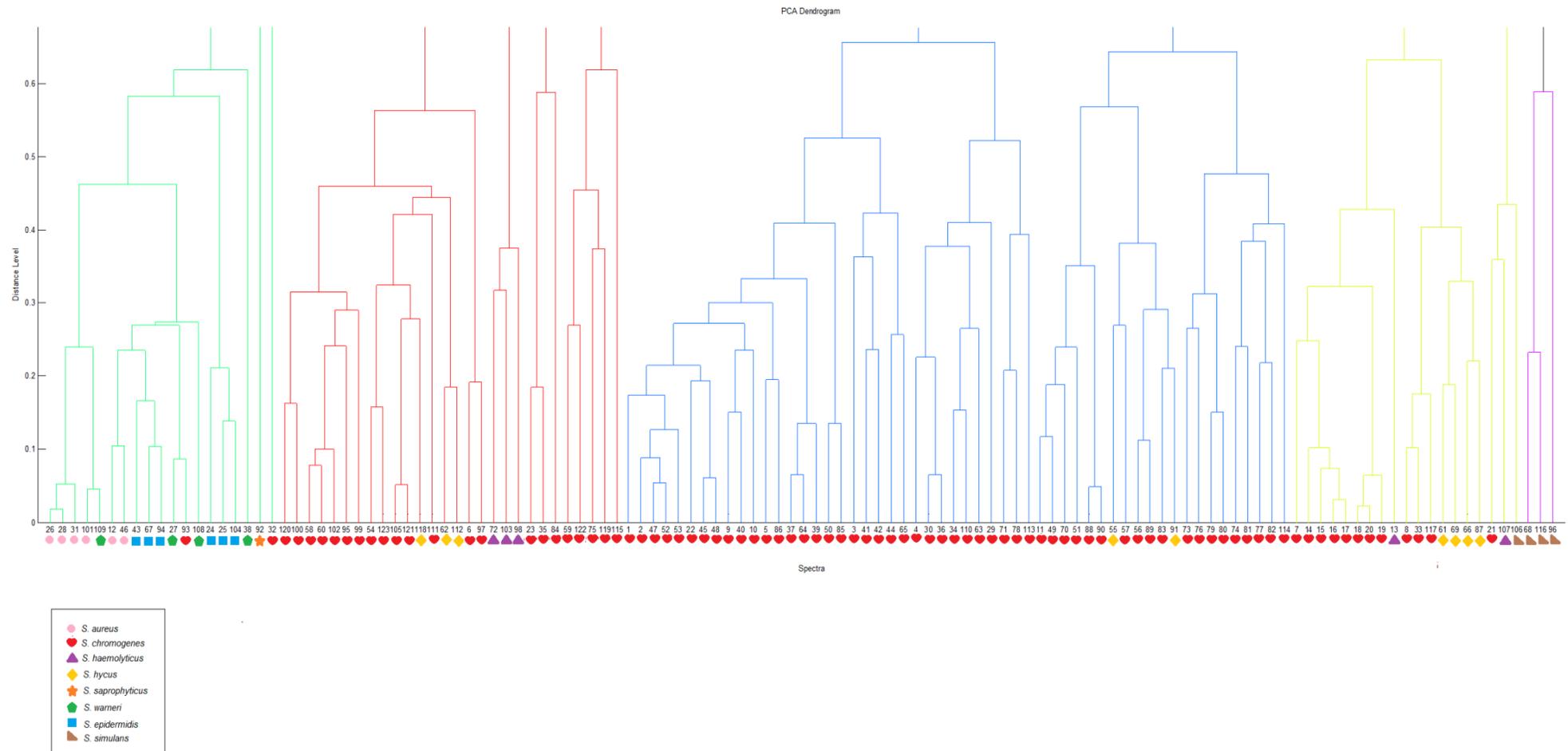
Tabela 4. Frequência de espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN) isolados de mastite bovina em rebanhos do sul de Minas Gerais identificados por MALDI-TOF

Espécies	Frequência absoluta	Frequência percentual %
<i>S. chromogenes</i>	88	71,55
<i>S. hyicus</i>	9	7,32
<i>S. aureus</i>	6	4,88
<i>S. epidermidis</i>	6	4,88
<i>S. warneri</i>	4	3,25
<i>S. haemolyticus</i>	5	4,06
<i>S. simulans</i>	4	3,25
<i>S. saprophyticus</i>	1	0,81
TOTAL	123	100

Fonte: Do Autor (2019).

Por meio do Programa Maldi Biotyper 3 R, que utiliza os espectros gerados pelo MALDI TOF, o qual ilustra a similaridade do perfil de proteínas de cada isolado. Figura 1.

Figura 1. Dendrograma dos 123 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais.



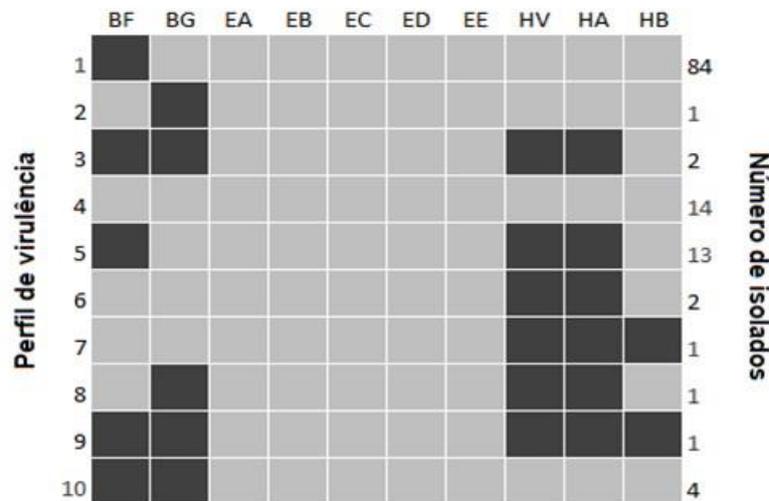
Legenda: Os diferentes clusters estão representados por cores diferentes . As espécies são representadas por símbolos.

Fonte: Do Autor (2019).

6.2 Fatores de virulência de *Staphylococcus coagulase negativo*

Os resultados obtidos apontaram a existência de 10 perfis de virulência diferentes entre os 123 isolados de SCN testados (Figura 2), sendo que 14 isolados (14,38 %) foram negativos para todos os testes fenotípicos e genotípicos de virulência pesquisados (Perfil 4). A maior parte dos isolados (68,3%) se enquadrou no perfil 1 que corresponde aos isolados negativos para os testes genotípicos de virulência e a capacidade de expressar as hemolisinas alfa e beta *in vitro*, mas com a capacidade de expressar biofilmes *in vitro*.

Figura 2. Perfis de virulência dos isolados de *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) isolados de casos de mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais

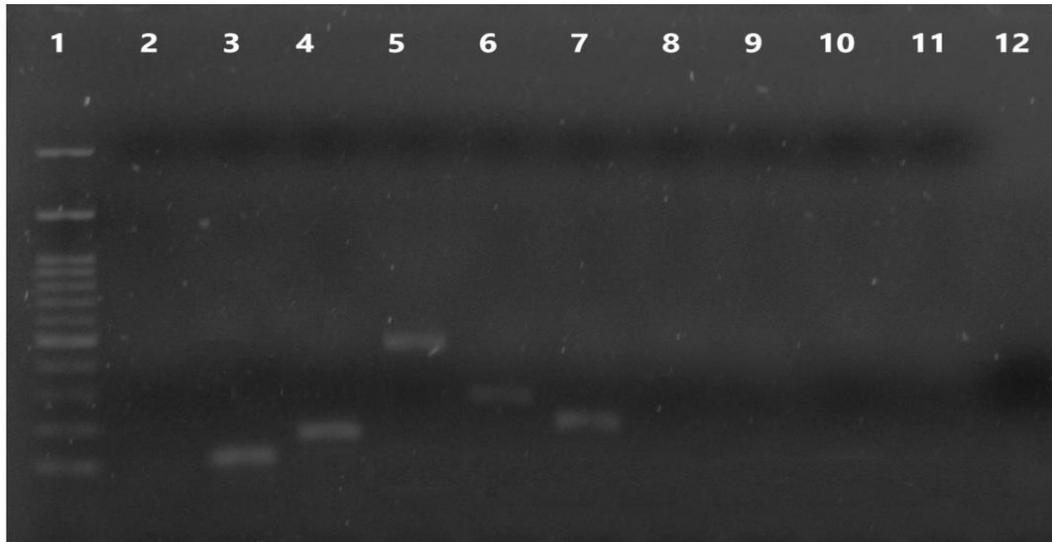


Legenda: (BF) biofilme *in vitro*, (BG) gene *IcaAD*, (EA,EB,EC,ED e EE) enterotoxinas *sea,seb,sec,sed* e *see*, (HV) hemólise *in vitro*, (HA) gene da hemolisina alfa e (HB) gene da hemolisina beta. Cores: Preto (resistente), Cinza (sensível).

Fonte: Do Autor (2019).

No presente estudo, todos os isolados testados foram negativos para os genes que codificam as enterotoxinas *sea, seb, sec, sed* e *see* (Figura 3).

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR para prospecção de enterotoxinas A-E

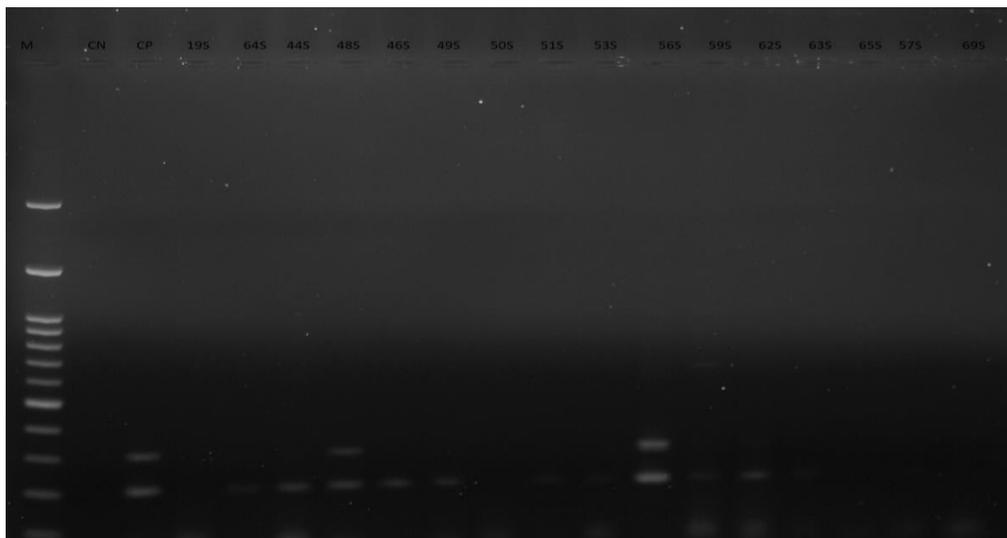


Linha 1: 100 pb padrão de peso molecular, linha 2: controle negativo, linha 3: ATCC 13565 gene *sea* (102 pb), linha 4: ATCC 14458 *seb* (164 pb), linha 5: ATCC 19095 *sec* (451 pb), linha 6: ATCC 23235 *sed* (278 pb), linha 7: ATCC 27644 *see* (209 pb) linha 8 a 12: isolados SCN negativos para os genes pesquisados.

Fonte: Do Autor (2019).

Em relação às hemolisinas (Tabela 5), 20 dos isolados (16,26%) apresentaram o gene *hla* isoladamente e nenhum deles apresentou somente o gene *hlb*. Seis isolados (4,88%) possuíam os dois genes (*hla* e *hlb*) e o restante dos isolados (78,86%) não apresentou nenhum dos genes relacionados à expressão das hemolisinas (Figura 4).

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR multiplex para prospecção dos genes *hla* e *hlb* codificadores de hemolisinas alfa e beta.



Linha 1: 100 pb padrão de peso molecular, linha 2: controle negativo, linha 3: ATCC 13565 gene *hla*(209pb) e gene *hlb*(309 pb) Coluna 4 a 20 , isolados de SCN negativos para os genes pesquisados.

Fonte: Do Autor (2019).

Nos testes de hemólise *in vitro*, a maioria dos isolados 97 (78,86%) também não foi capaz de produzir hemólise alfa ou beta.

No presente estudo, verificou-se que 20 isolados apresentaram o gene *hla*, e 6 isolados se constatou a presença conjunta de *hla* e *hlb* (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados dos testes fenotípicos para expressão de biofilme e frequência de genes codificadores de biofilme *IcaAD* e hemolisinas *hla* e *hlb* em isolados (N=123) de SCN de mastite bovina

Variáveis		
Formação biofilme (fenotípico)	Nº isolados	%
Positivo	104/123	84,55
Negativo	19/123	15,45
Genes <i>icaAD</i>	Nº isolados	%
Presença	9/123	7,31
Ausência	114/123	92,68
Genes <i>hla</i> e <i>hlb</i>	Nº isolados	%
(+) <i>hla</i>	20/123	16,26
(+) <i>hlb</i>	0/123	0
(+) <i>hla</i> e <i>hlb</i>	6/123	4,88
(-) <i>hla</i> e <i>hlb</i>	97/123	78,86

Fonte: Do Autor (2019).

Nos testes fenotípicos 78,85% dos isolados foram capazes de produzir biofilme *in vitro* (Figura 5), entretanto, o gene foi encontrado em somente 6 (7,31%) deles. (Figura 6.)

Figura 5. Determinação da capacidade de formação de biofilme em ágar vermelho Congo das de isolados de SCN provenientes de mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais



Controle positivo *S. aureus* ATCC 51651, controle negativo *Staphylococcus* sp. coagulase negativo.
(A) Coloração das colônias de cepa formadora de biofilme – *S.aureus* ATCC (B) Coloração das colônias de cepa não formadora de biofilme – (SCN)

Fonte: Do Autor (2019).

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR para prospecção de do gene *icaAD* em isolados de SCN de mastite bovina em rebanhos do Sul de Minas Gerais.



Linha 1: 100 pb padrão de peso molecular, linha 2: controle negativo, linha 3: ATCC 13565 gene *IcaAD* (1266pb) Coluna 4 a 20, isolados de SCN.

Fonte: Do Autor (2019).

6.3 Suscetibilidade a antissépticos em *Staphylococcus coagulase negativo*

A distribuição das CIM está descrita na Tabela 6. Verificou-se que 96,74% dos isolados foram sensíveis à clorexidina na menor concentração (0,00039%), 86,99% ao triclosano na concentração de (0,0195%), 35,77% ao peróxido de hidrogênio na concentração de (0,0078%), 95,12% à amônia quaternária na concentração (<0,0078), 50,41% ao hipoclorito de sódio na concentração (0,25%) e 69,91% ao iodo na concentração (0,0031%). Destaca-se neste estudo a menor eficiência antimicrobiana do ácido peracético em relação aos demais antissépticos, tendo sido verificado que mais que 50% dos isolados foram resistentes na concentração de 0,5%.

Quadro 1. Distribuição das concentrações inibitórias mínima (CIM) dos antissépticos frente aos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) isolados de mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais

Antissépticos	Concentração Inicial %	>2	2	1%	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312	0,0156	0,0078	< 0,0078	0,0039	<0,0039	0,0195
Ácido Lático					37(30,8) S	60(48,79) S	14(11,38) S	1(0,81) S				2(1,62)			
Ácido Peracético				31(25,20) S	58(47,15) S	22(17,89) S	11(8,94) S					1(0,81) S			
Amônia Quaternária							1(0,81) S	2(1,62) S	2(1,62) S	1(0,81) S		117(95,12) S			
Glutaraldeído		99(80,49) R		1(0,81) S		3(2,44) S	10(8,13) S	3(2,44) S	7(5,7) S						
Hipoclorito de Sódio				5(4,06) S	55(4,06) S	62(50,40) S	45(36,58) S	1(0,81) S	55(4,06) S						
Peroxido de Hidrogênio						9(7,32) S	6(4,88) S	1(0,81) S	41(33,33) S	6(4,88) S	44(35,77) S	11(8,94) S	5(4,06) S		
Triclosano										4(3,35) S	5(4,06) S		7(5,7) S	107(86,99) S	
Iodo								27(21,95) S	86(69,91) S	10(8,13) S					
Concentração Inicial		0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0062	0,0031	0,00156	0,0078	<0,00039		< 0,0078			
Clorexidina		NT	NT	NT	NT	NT	NT	NTNT		119(96,74) S		4(3,25) S			

As células em destaque representam os isolados resistentes, ou seja, aqueles que possuem MIC \geq ao ponto de corte referente as concentrações mais utilizadas em cada antisséptico. (NT) concentração não testada. (S) sensível (R) resistente.

A maioria dos antissépticos avaliados apresentaram ação bactericida na concentração correspondente à CIM, com exceção do glutaraldeído que apresentou ação bacteriostática em 100% dos isolados susceptíveis (Tabela 7).

Tabela 6. Resultados dos testes de avaliação da ação bactericida e bacteriostática dos antissépticos nas diluições correspondentes à CIM para os SCN isolados de mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais

Antissépticos	Ação bactericida	Ação bacteriostática
	Frequência absoluta (%)	Frequência absoluta (%)
Acido Láctico	104 (84,52)	19 (15,48)
Amônia Quaternária	122 (99,19)	1 (0,81)
Clorexidina	120 (97,56)	3 (2,44)
Glutaraldeído	0 (0%)	24 (19,51)
Hipoclorito de Sódio	90 (73,18)	33 (26,83)
Peróxido de Hidrogênio	90 (73,17)	33 (26,83)
Triclosano	103 (83,74)	20 (16,26)
Iodo	53 (43,09)	70 (56,91)
Ácido Peracético	81 (65,85)	42 (34,15)

Fonte: Do Autor (2019).

6.4 Testes de susceptibilidade a antimicrobianos em SCN

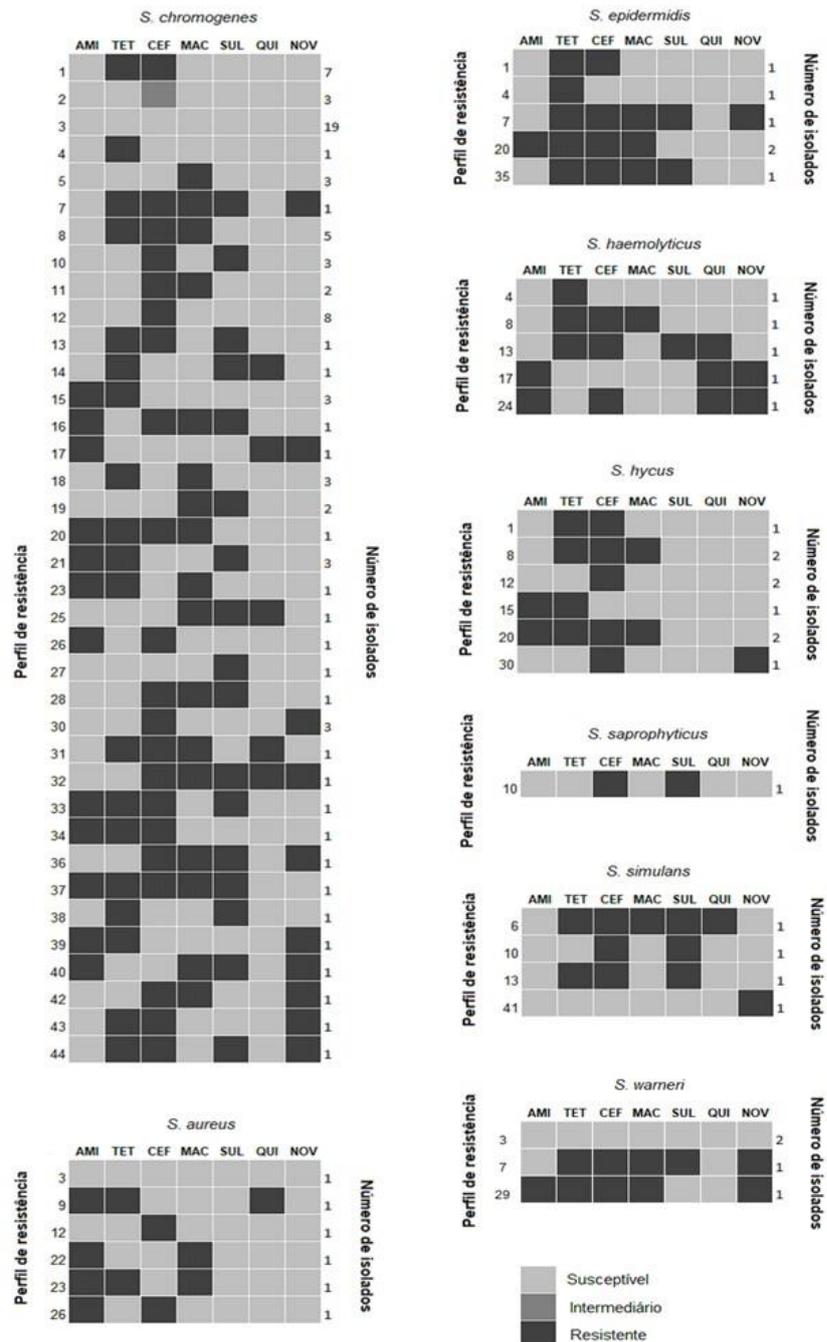
Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos apontaram índices de resistência: 33,33% para a eritromicina; 22,76% para gentamicina, 24,39%; para sulfa-trimetropim; 28,45% para tetraciclina e de 52,03% para o ceftiofur. Por outro lado; a maioria dos isolados apresentou alto índice de susceptibilidade para a gentamicina, ciprofloxacino e para a novobiocina.

Ao se avaliar se as concentrações referentes à CIM eram bactericidas ou bacteriostáticas, verificou-se ação bactericida para a ciprofloxacina em 93,49% dos isolados, novobiocina 86,17%, gentamicina 50,4%, ceftiofur 44,71%, eritromicina 47,96% e 38,21% tiveram ação bactericida e para a maioria dos isolados 101 (82,11%) a tetraciclina apresentou apenas ação bacteriostática.

Foram encontrados 44 perfis diferentes entre os isolados, o perfil de resistência 3, que congrega os isolados susceptíveis a todos as classes antimicrobianas testadas, foi o mais

frequente (15,45%), sendo. O fenômeno da multirresistência foi observado em 45 (36,58%) dos isolados, 7 dos isolados (5,69%) foram resistentes a 5 classes diferentes de antimicrobianos. Os perfis de resistência dentro das espécies e os perfis de resistência entre os anos 2004 a 2007 e 2018 estão descritos nas Figuras 7 e 8.

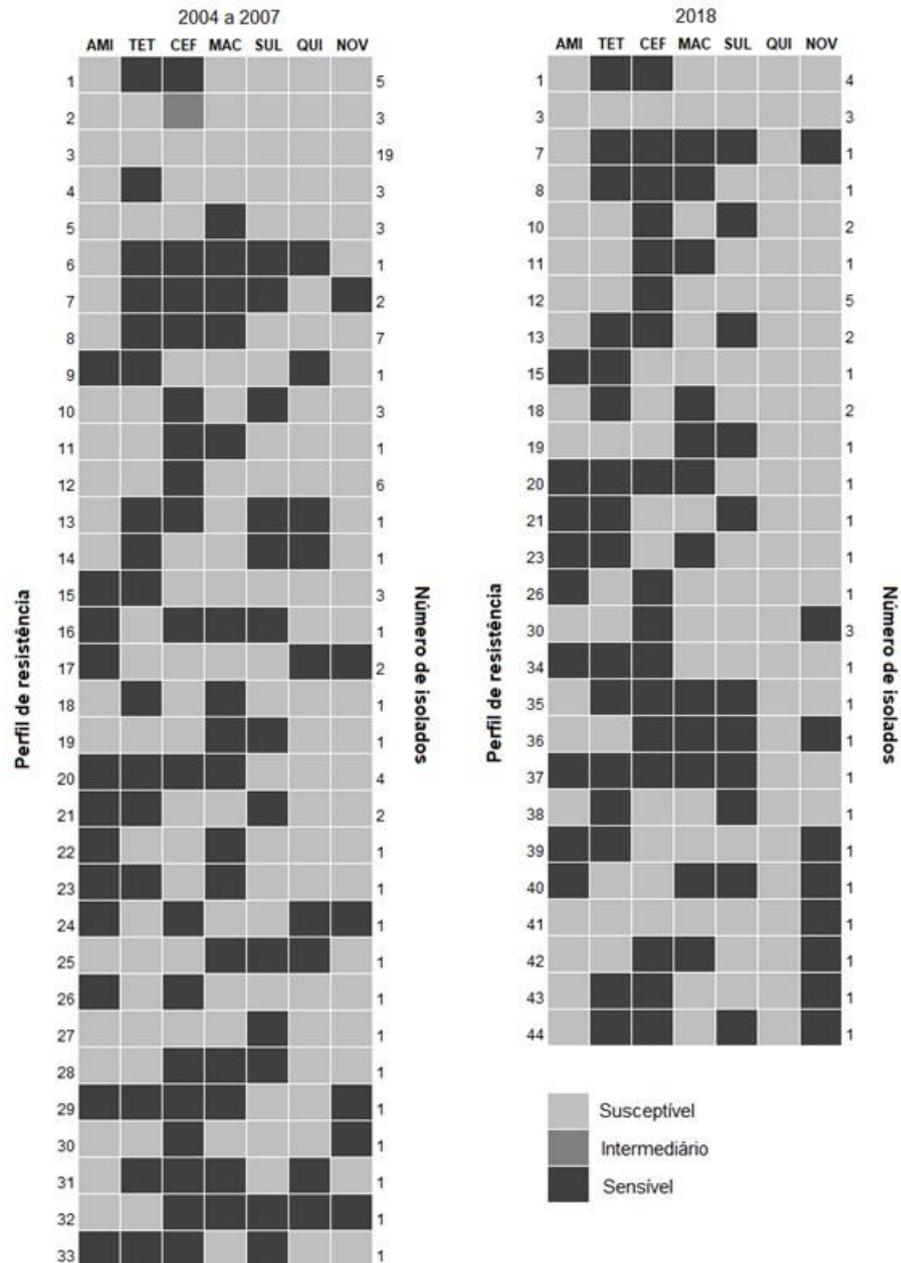
Figura 7. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em SCN isolados de mastite bovina em rebanhos de Minas Gerais, nos períodos de 2004-2007 e 2018.



Legenda: (AM) aminoglicosídeos, (TET) tetraciclina, (CEF) ceftiofur, (MAC) macrolídeos, (SUL) Sulfa-Trimetopim, (QUI) quinolonas, (NOV) novobiocina

Fonte: Do Autor (2019).

Figura 8. Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos em *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) isolados de mastite em rebanhos bovinos do Sul de Minas Gerais, no período de 2004-2007 e 2018.



Legenda: (AM) aminoglicosídeos, (TET) tetraciclina, (CEF) ceftiofur, (MAC) macrolídeos, (SUT) Sulfa-Trimetopim, (QUI) quinolonas, (NOV) novobiocina.

Fonte: Do Autor (2019).

7 DISCUSSÃO

Os SNC constituem um grupo bastante heterogêneo de micro-organismos que podem apresentar comportamento de agentes ambientais e/ou contagiosos dependendo da espécie em questão. Apesar de serem considerados agentes secundários da mastite bovina, com envolvimento principalmente na forma subclínica e com moderadas alterações na CCS e composição do leite, estes agentes podem apresentar altos índices de prevalência no rebanho, gerando a necessidade de se adotarem medidas específicas de controle e tratamento (SAMPIMON et al., 2011; SUPRÉ et al., 2011).

Segundo Pyorala e Taponen, (2009), SCN teriam importância maior na etiologia da mastite, sobretudo em vacas primíparas, ocasionando aumento moderados na CCS, com infecções que geralmente desaparecem espontaneamente logo após o parto. Outros estudos sugeriram que esses microrganismos apresentam efeito protetor na glândula mamária frente a agentes primários causadores da mastite, com aumento na produção de leite de quartos afetados em relação aos quartos sadios (TOMAZI et al., 2013). Martins.,(2017) demonstraram que algumas espécies SCN, como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* isolados de IIM podem produzir substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de alguns agentes causadores de mastites, como *S. aureus*.

Neste estudo, por meio da técnica de MALDI-TOF, foram identificadas oito espécies diferentes entre os 123 isolados de SCN, verificando que *S. chromogenes* foi a espécie mais prevalente, representando 71,55% dos isolados. As demais espécies de SCN identificadas em nosso estudo, *S. hyicus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. saprophyticus*, representaram 28,45% de todos os isolados identificados. Em concordância com nossos resultados, (TOMAZI et al., 2014) também relataram baixas frequências destas espécies de SCN em IIM de bovinos. Estudos prévios apontaram grande variabilidade com relação às espécies de SCN envolvidas na etiologia da mastite bovina, o que pode estar relacionado com variações nas práticas de manejo e nas condições ambientais entre os rebanhos avaliados nestes diferentes estudos (TAPONEN et al., 2016).

Em concordância com nossos resultados, Capurro et al., (2009) também verificaram que *S. chromogenes* foi a espécie mais frequente (74,07%) entre SCN isolados de casos de mastite bovina, no entanto estes autores verificaram uma maior diversidade de espécies entre os isolados de SCN estudados, com a identificação de 16 espécies. Outros estudos também têm relatado a participação de *S. chromogenes* em IIM causadas por SCN (SUPRÉ et al., 2011;

RALL et al., 2014). De acordo com Taponem e Pyorala., (2009), *S. chromogenes* também pode ser de origem contagiosa, uma vez que vários animais de uma mesma propriedade podem ser infectados concomitantemente. Corroborando esta tese, Tomazi.,(2013) relataram que *S. chromogenes* e *S. epidermidis* apresentam maior afinidade pela glândula mamária, com características de patógenos contagiosos, enquanto as demais espécies de SCN parecem apresentar características de patógenos ambientais. Ainda, segundo Supré et al., (2011), *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* induzem aumentos de CCS similares àqueles observados em IIM causadas por *S. aureus*.

Seis isolados bacterianos (4,87%) foram identificados como *S. aureus*, espécie que geralmente apresenta reação positiva na prova da coagulase, sendo classificados como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) (QUINN et al., 1994). Corroborando com o presente estudo, Tomazi., (2014) também identificaram isolados de *S. aureus* coagulase negativos entre SCN oriundos de casos de mastite bovina. Tal fato pode estar relacionado com a ocorrência de mutações no gene que codifica para esta enzima, determinando a expressão de uma proteína desprovida de ação biológica ou até a não expressão da mesma. Além disto, segundo Costa et al., (2011) a habilidade de *S. aureus* em coagular o plasma é variável em função da espécie animal doadora, o que em tese também poderia justificar o falso-fenótipo de coagulase negativo.

A capacidade dos *Staphylococcus* sp. em coagular o plasma está relacionada com sua virulência, conforme apontam diferentes autores (TOMAZI et al., 2014). Desta forma, uma questão importante é avaliar se estes isolados de *S. aureus* coagulase negativos ainda se conservam virulentos para a glândula mamária bovina como os isolados clássicos de *S. aureus* coagulase positivos. Em relação aos fatores de virulência pesquisados no presente estudo, estes isolados exibiram um espectro de virulência diferente daquele observado para a maioria das demais espécies identificadas ($p < 0,05$). Estes apresentaram resultados negativos para os genes codificadores de enterotoxinas A-E, no entanto, 50% deles apresentaram positividade para os genes *icaAD* e 67% foram positivos para os genes codificadores de hemolisinas, além de expressarem-nas *in vitro*. Estudos mais detalhados sobre outros fatores de virulência que possam estar presentes nestes isolados e a sua relação com hospedeiro bovino, tais como reflexos na CCS, envolvimento em infecções persistentes, dentre outros aspectos, devem ser realizados para se avaliar a real importância destes isolados atípicos de *S. aureus*.

Por meio do software MALDI BioTyper™ (Bruker Daltonics, EUA) foram gerados dendogramas com base na similaridade dos perfis protéicos dos microrganismos (Figura 1).

Nota-se que entre os isolados identificados como *S. chromogenes*, a maioria foi agrupada em um mesmo cluster 3 (azul), congregando 52 dos 88 isolados (59,09%). Entre os isolados de *S. simulans* (4), três foram inseridos no cluster 5 (roxo). Estes resultados sugerem alta similaridade perotéica entre os isolados de uma mesma espécie. De forma semelhante, todos os isolados identificados como *S. aureus* (6) e como *S. epidermidis* (5) foram agrupados no cluster 1 (verde), sugerindo também maior similaridade protéica entre as duas espécies. Por outro lado, entre os nove isolados identificados como *S. hyicus*, três foram agrupados no cluster 2 (vermelho), quatro no cluster 4 (amarelo) e dois no cluster 3 (azul), sugerindo maior variabilidade no espectro protéico dentro desta espécie.

A intoxicação alimentar associada a cepas de *Staphylococcus* capazes de produzir enterotoxinas termoestáveis é uma das causas mais prevalentes de gastroenterite humana em todo o mundo (DINGS et al., 2000; JØRGENSEN et al., 2005). Alimentos de origem animal, especialmente leite e produtos lácteos, representam a principal fonte de cepas toxigênicas de *Staphylococcus* (BENDAHOU et al., 2008; SCHMID et al., 2009; RALL et al., 2014).

De acordo com Bertelloni et al., (2015), o risco de intoxicação alimentar por SCN relacionado ao consumo de produtos lácteos é considerado de baixo risco quando comparado com o determinado por *S. aureus*, por outro lado, esses agentes atualmente representam uma preocupação, especialmente para alguns países, como a Itália, onde o leite cru é disponível para os consumidores (PODKOWIK et al., 2013). Além do envolvimento em intoxicações alimentares em seres humanos, as enterotoxinas estafilocócicas promovem a modulação da resposta imune do hospedeiro. As enterotoxinas, bem como a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST1) tem ação de superantígenos, estimulando inespecificamente grandes populações clonais de células, desvirtuando a resposta imune e criando um ambiente mais propício para o patógeno (OMOE et al., 2003).

No presente estudo, todos os isolados testados foram negativos para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* que codificam as enterotoxinas A-E, sugerindo que estes fatores de virulência sejam pouco relevantes na patogênese das IIM de bovinos e que tenham pouca relevância também nos quadros de intoxicações alimentares em seres humanos. Contudo, nossos resultados diferem daqueles obtidos por XU et al. (2015) que relataram a presença dos genes codificadores de enterotoxinas C (*sec*) em 14,3%, D (*sed*) em 10,7% e A (*sea*) em 7,1% dos isolados de SCN, em um painel de 12 genes codificadores de enterotoxinas testados.

As hemolisinas são consideradas fatores de virulência relevantes em *Staphylococcus*. Estas, além de ocasionarem a lise de hemácias, lisam também outros tipos celulares, causando

lesões teciduais no hospedeiro, fornecendo os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (MORAVEJI et al., 2014). Segundo Dinges., (2000) a hemolisina alfa, a mais frequente entre os isolados de SCN do presente estudo, é a considerada um dos principais fatores de patogenicidade em *S. aureus*, em função dos seus efeitos hemolíticos, dermonecróticos e neurotóxicos.

A produção de hemólise é bastante variável entre os SCN, sendo uma característica mais marcante entre os SCP (QUINN et al., 1994). No presente estudo, observou-se que a maioria dos isolados (78,86%) foram destituídos de atividade hemolítica em ágar sangue e que apenas 4,87% dos isolados apresentaram conjuntamente os genes *hla* e *hly* e que 16,26% dos isolados apresentaram o gene *hla*. Em estudos realizados por Martins et al., (2017), verificou-se que a maioria dos isolados de *S. aureus* possuía o gene *hla* (96,4%) e / ou *hly* (92,9%), o que sugere maior importância destes fatores de virulência nas IIM ocasionadas por SCP em relação aos SCN, de acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho.

Os resultados dos testes moleculares para prospecção dos genes codificadores de hemolisinas α e β e dos testes fenotípicos realizados para avaliar *in vitro* a produção das mesmas, no presente estudo, sugerem que estes fatores de virulência sejam de pouca relevância na patogênese das IIM ocasionadas por SCN em bovinos.

A capacidade de *Staphylococcus* sp. em produzir biofilme tem sido associada à persistência das IIM, protegendo as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e da ação dos antimicrobianos (GRECO et al., 2008). Segundo Melchior et al., (2006), a formação do biofilme desencadeia mudanças genéticas e conseqüentemente fisiológicas nos patógenos que propiciam, além do escape ao sistema imune, a perda de suscetibilidade a virtualmente todas as classes de antimicrobianos.

Nos testes fenotípicos 78,85% dos isolados testados foram capazes de produzir biofilme *in vitro*, entretanto, o gene *icaAD* foi encontrado em somente 7,31% dos isolados. Corroborando os nossos resultados, em estudo realizado por (MARTINS et al., 2017) o operon *icaADBC* foi encontrado em somente 8,9% dos isolados de SNC.

A elevada proporção de isolados fenotipicamente positivos para a expressão de biofilmes e resultados negativos nos testes genotípicos para os genes *icaAD* sugerem que outros genes possam estar envolvidos na expressão de biofilmes. De fato, Martins et al., (2017) relataram a presença do gene *bap*, que codifica uma proteína associada à formação de biofilmes em *Staphylococcus*, em 14,3% dos isolados de SCN. Noutro estudo sobre virulência em SCN, XU et al. (2015) relataram a presença deste mesmo gene em 10,5% dos isolados testados.

Existem poucos estudos referentes à suscetibilidade de SCN aos antissépticos. A maior parte dos trabalhos se refere a avaliações em *S. aureus* e outros patógenos mais relevantes na etiologia da mastite bovina. Em relação aos testes de suscetibilidade aos antissépticos testados, os resultados demonstraram que a maior parte dos mesmos apresentou ação inibitória contra os isolados de SCN em baixas concentrações, exceto o glutaraldeído, frente ao qual 80,49% dos isolados foram resistentes na concentração de 2%, e o ácido peracético que exibiu também baixa eficiência antimicrobiana em relação aos demais antissépticos, tendo sido verificado que mais que 50% dos isolados foram resistentes na concentração de 0,5%.

A maioria dos antissépticos avaliados exibiu ação bactericida na concentração correspondente à CIM, com exceção do glutaraldeído que apresentou ação bacteriostática frente a 100% dos isolados susceptíveis às concentrações $\leq 2\%$ (Tabela 7).

Estudos realizados por Fonseca., (2000) relataram que os melhores resultados no *pós-dipping* foram obtidos para o iodo (0,7-1,0%), clorexidina (0,5-1,0%) e cloro ativo (0,3-0,5%). Em estudo realizado por Ramalho et al., (2012), em rebanhos bovinos do Estado de Alagoas (Brasil), foram verificados altos índices de suscetibilidade *in vitro* de *S. aureus* frente à clorexidina, hipoclorito de sódio, iodo e amônia quaternária.

Não obstante nossos resultados *in vitro* terem apontado boa eficiência dos antissépticos avaliados, contra os patógenos causadores da mastite, exceção ao glutaraldeído e ao ácido peracético, estudos *in vivo* devem ser realizados para avaliar toxicidade dos mesmos para a glândula mamária e riscos decorrentes de resíduos eventuais dos mesmos no leite.

Segundo Pedrini e Margatho (2003), na maioria das propriedades estudadas, os desinfetantes são escolhidos por hábito de uso, facilidade de aplicação ou preço. No entanto, diferentes estudos apontam que o fenômeno da resistência não se restringe aos antibacterianos e que o uso continuado e indiscriminado de antissépticos, inclusive em baixas concentrações, pode estimular a resistência cruzada aos antibacterianos. Jutkina et al., (2018) demonstraram que o triclosano e a clorexidina mesmo em baixas concentrações poderiam estimular a transferência horizontal de genes de resistência, contribuindo para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Noutro estudo, Kampf, (2018) relatou o efeito de 13 biocidas em concentrações subinibitórias sobre bactérias Gram-negativas. O cloreto de benzalcônio foi associado a uma maior frequência de resistência frente à ampicilina, cefotaxima e sulfametoxazol. A exposição a concentrações subinibitórias de clorexidina incrementou a resistência à ceftazidima, sulfametoxazol, imipenem, cefotaxima e tetraciclina. A resistência

cruzada aos antibióticos também foi relatada em subconcentrações de triclosano, octenidina, hipoclorito de sódio e cloreto de didecildimetilamônio.

No que se refere à suscetibilidade a antimicrobianos, foram encontrados 44 perfis diferentes entre os isolados. O perfil 3, que congrega os isolados susceptíveis a todas as classes antimicrobianas testadas, foi o mais frequente (15,45%). Para a tetraciclina, 88 isolados de *S. chromogenes* 53 (60,28%) foram resistentes, seguido de *S. epidermidis* e *S. hyicus*, com 100% e 66,6% de resistência. Entre os seis isolados de *S. aureus* 33,3% foram resistentes à tetraciclina.

Um alto índice de resistência a eritromicina foi observado na população de SCN estudada: entre os isolados de *S. chromogenes* 40 (32,52%) foram resistentes, seguido por *S. hyicus* (44,4%), *S. epidermidis* (50%), e *S. aureus* (33,3%).

Foram observados altos índices de múltipla resistência para *S. haemolyticus*, com 80% dos isolados multiresistentes, seguido de *S. epidermidis* (66%), e *S. warneri* (50%). De acordo com estudos realizados (SAMPIMON et al., 2011; FREY et al., 2013; MELO et al., 2018) *S. epidermidis* é frequentemente associado à resistência a múltiplos fármacos.

Entre os isolados de SCN dos anos de 2004 a 2007, observou-se a multiresistência em 36,58% dos isolados, enquanto naqueles obtidos ano de 2018 este índice foi de 39,02%, sinalizando o incremento, embora não significativo ($p > 0,05$), dos índices de resistência ao longo do tempo na população estudada. Verificou-se ainda que 5,69% destes foram resistentes a cinco classes diferentes de antimicrobianos. Estes resultados sugerem aumento da pressão seletiva na população, provavelmente em função do uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária leiteira.

Em estudo realizado por Costa (2013) com *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) de mesma origem temporal e espacial dos isolados de SCN aqui avaliados, os autores verificaram que o índice de múltipla resistência (18,15%) foi inferior ao observado para SCN no presente estudo (36,58%). Corroborando nossos resultados, Dorneles, (2018) verificaram que a multiresistência em SCN (50%) foi maior que a observada para *S. aureus*. Noutro estudo realizado por Mesquita et al., (2018) envolvendo SCP isolados de leite de tanques de expansão de rebanhos do sul de Minas Gerais/Brasil, foram observados níveis elevados de isolados multiresistentes (30%), mas inferiores aos observados para os isolados de SCN avaliados no presente estudo. Nossos resultados, corroborados pelos estudos supracitados, demonstram que a resistência em SCN nos últimos anos tem sido maior que em SCP.

A resistência mais comum entre os SCN de origem bovina é a produção de β -lactamase que confere resistência a benzilpenicilina e aminopenicilinas, mas também tem sido relatada

resistência a aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrolídeos (TAPONEN et al., 2016). Diversos estudos têm apontado alta resistência para alguns dos antimicrobianos utilizados na pecuária leiteira, tal como as penicilinas e tetraciclinas, o que gera preocupações na saúde humana e animal. Tal fato pode estar relacionado a vários fatores, tais como a posologia inadequada dos medicamentos e ao uso intensivo que aumenta a pressão de seleção sobre os micro-organismos resistentes na população (DORNELES et al., 2018). De acordo com Jutkina et al., (2018) o uso de antimicrobianos comuns em concentrações subinibitórias poderia facilitar a propagação horizontal de genes de resistência aos antibacterianos entre bactérias. Estes pesquisadores verificaram que a tetraciclina na concentração de 10 µg/L, equivalente a 1/150 da concentração inibitória mínima (CIM), foi capaz de induzir a transferência horizontal de genes de resistência.

A diversidade de perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, os altos índices de resistência e o fenômeno da multirresistência verificados no presente estudo salientam a importância de monitoramento permanente dos índices de resistência entre os patógenos envolvidos na etiologia da mastite bovina, visando o uso mais racional dos antimicrobianos e a mitigação do fenômeno crescente da resistência.

8 CONCLUSÕES

A técnica de MALDI-TOF apontou a presença de oito espécies diferentes na população de SCN estudada, tendo sido *Staphylococcus chromogenes* a espécie mais frequente.

Os testes genotípicos apontaram uma baixa frequência dos genes de virulência na população estudada, sugerindo que sejam pouco relevantes na patogenia das IIM ocasionadas por SCN.

Os testes fenotípicos *in vitro* apontaram uma baixa proporção de isolados produtores de hemolisinas e uma elevada frequência de isolados que expressaram o biofilme.

Os antissépticos testados apresentaram boa ação inibitória contra os isolados de SCN, exceto glutaraldeído e ácido peracético.

Os testes de CIM para antimicrobianos demonstraram a existência de 44 perfis de suscetibilidade entre os isolados de SCN e a ocorrência do fenômeno da multirresistência em parcela expressiva da população estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. C. D. Staphylococcus coagulase negativo produtores de coagulase isolados de leite bubalino e ambiente de ordenha podem ser confundidos com Staphylococcus aureus por métodos fenotípicos e por biologia molecular. **Tese** (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP. Jaboticabal - SP. 2018.
- ANDRADE, I. P. et al. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microorganismos da cavidade oral. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, 2011. ISSN 2446-5410.
- ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- AYE, R. et al. Evaluation of selected toxigenic genes and antimicrobial agent susceptibility in Staphylococcus spp isolated from foods purchased from North Dakota grocery stores. **J Food Nutr Disor** 3, v. 3, p. 2, 2014.
- BENDAHOU, A. et al. Characterization of Staphylococcus species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 03, p. 218-225, 2008. ISSN 1972-2680.
- BERTELLONI, F. et al. Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine bulk tank milk. **Dairy science & technology**, v. 95, n. 3, p. 341-352, 2015. ISSN 1958-5586.
- BLUM, S. E. et al. Genomic and phenomic study of mammary pathogenic Escherichia coli. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0136387, 2015. ISSN 1932-6203.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002. ISSN 1090-0233.
- CAPURRO, A. et al. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and tuf gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 3-4, p. 327-333, 2009. ISSN 0378-1135.
- COSTA, G. et al. Population diversity of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 2, p. 733-735, 2012. ISSN 0034-5288.
- COSTA, G. M. D. et al. Characterization of coagulase-positive Staphylococcus by using plasmas from different animal species. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 70, n. 4, p. 584-588, 2011. ISSN 0073-9855.
- DINGS, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. Exotoxins of Staphylococcus aureus. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 13, p. 16-34, 2000.

DINIZ, A. F.; MATTE, G. R. Procedimentos de biossegurança adotados por profissionais de serviços de embelezamento. **Saúde e Sociedade**, v. 22, p. 751-759, 2013. ISSN 0104-1290.

DORNELES, E. M. S. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Microbiology Open** p. e736, Oct 8 2018. ISSN 2045-8827. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mbo3.736> >.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 19, n. 1, p. 109-38, vi, 2003. ISSN 0749-0720.

FERNANDES, F. L.; CARVALHO, F. G.; PIRES JR, D. R. Perfil de susceptibilidade de isolados clínicos dentológicos do gênero *Staphylococcus* a antissépticos bucais e antimicobianos. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences–JAPHAC**, v. 1, p. 9-18, 2014.

FONSECA, D. L. **Qualidade do leite e controle de mastite**. Lemos Editorial, 2000 il.. 2000.

FONTANA, V. L. D. D. S. et al. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene [beta]-lactamase in *Staphylococcus aureus*/Etiologia da mastite bovina subclinica, sensibilidade dos agentes as drogas antimicrobianas e detecção do gene da blactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 17, n. 4, p. 552-560, 2010. ISSN 0102-5716.

FREY, Y. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **J Dairy Sci**, v. 96, n. 4, p. 2247-2257, Apr 2013. ISSN 0022-0302.

GRECO, C. et al. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. **Transfusion**, v. 48, n. 5, p. 969-977, 2008. ISSN 0041-1132.

IBGE. **Pesquisa da Pecuaria Municipal - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** 2017.

JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 631-641, 2002. ISSN 0019-9567.

JONES, R. N.; HUYNH, H. K.; BIEDENBACH, D. J. Activities of doripenem (S-4661) against drug-resistant clinical pathogens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3136-3140, 2004. ISSN 0066-4804.

JØRGENSEN, H. et al. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8352-8361, 2005. ISSN 0099-2240.

JUTKINA, J. et al. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. **Science of the total Environment**, v. 616, p. 172-178, 2018. ISSN 0048-9697.

KAMPF, G. Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in Gram-Negative species. **Antibiotics**, v. 7, n. 4, p. 110, 2018.

KARIMI, A.; AMANATI, A. Matrix-assisted laser desorption/Ionization time of flight mass spectrometry: a new guide to infectious disease. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, 2016. ISSN 2322-1836.

KASSAIFY, Z. G. et al. Preliminary study on the efficacy and safety of eight individual and blended disinfectants against poultry and dairy indicator organisms. **Veterinaria italiana**, v. 43, n. 4, p. 821-830, 2007.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203-216, 2012. ISSN 0749-0720.

KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. Bovine mastitis: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 4, n. 5, p. 543-548, 2013.

LANGONI, H.; TRONCARELLI, M. The complex etiology on bovine mastitis and the importance of the microbiological diagnostic. Animal hygiene and sustainable livestock production. **Anais... Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene**, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, Volume 3, 2011, Tribun EU. p.1357-1358.

LOPES, M. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 477-483, 2012.

M. ELKENANY, R. et al. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1751-1773, 2010. ISSN 1996-3351.

MARTINS, K. B. et al. Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 3, p. 2184-2195, Mar 2017. ISSN 0022-0302.

MEDEIROS, E. S. D. et al. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus spp.* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009. ISSN 0100-736X.

MELCHIOR, M.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 398-407, 2006. ISSN 1090-0233.

MELO, D. et al. Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci and pheno-genotypic beta lactam resistance evaluation in samples from bovine Intramammary infection. **Arquivo**

Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, n. 2, p. 368-374, 2018. ISSN 0102-0935.

MORAVEJI, Z. et al. Characterization of hemolysins of Staphylococcus strains isolated from human and bovine, southern Iran. **Iranian journal of veterinary research**, v. 15, n. 4, p. 326, 2014.

NÓBREGA, H. D. N. **Atividade antimicrobiana in vitro de produtos antissépticos-através da técnica time kill**. 2013.

OLIVEIRA, A. A. D.; DE MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009. ISSN 1809-6891.

OLIVEIRA, H. L. D. C. D. Avaliação da ação de biocidas e papaína na formação de biofilmes em amostras hospitalares de Staphylococcus epidermidis e Staphylococcus haemolyticus resistentes a meticilina. **Dissertação** (Mestrado) Universidade Federal Fluminense. Niterói - RJ. 2017.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 175-188, 2013. ISSN 0066-4219.

PEDRINI, S.; MARGATHO, L. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Biológico, São Paulo**, v. 70, n. 4, p. 391-395, 2003.

PHILLIPS, M.; VASSEUR, P.; GREGORY, C. Chlorhexidine diacetate versus povidone-iodine for preoperative preparation of the skin: A prospective randomized comparison in dogs and cats. **The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)**, 1991. ISSN 0587-2871.

PITCHER, D.; SAUNDERS, N.; OWEN, R. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in applied microbiology**, v. 8, n. 4, p. 151-156, 1989. ISSN 0266-8254.

PODKOWIK, M. et al. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International journal of food microbiology**, v. 163, n. 1, p. 34-40, 2013. ISSN 0168-1605.

PROD'HOM, G. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1481-1483, 2010. ISSN 0095-1137.

PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Vet Microbiol**, v. 134, n. 1-2, p. 3-8, Feb 16 2009. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135.

QUINN, P. et al. The tuberculin test. **Veterinary microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 111-124, 1994. ISSN 0378-1135.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006. ISSN 0928-4249.

RALL, V. et al. Diversity of Staphylococcus species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 2, p. 829-837, 2014. ISSN 0022-0302.

RAMALHO, A. C. et al. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a Staphylococcus spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras**, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, 2012.

RODRIGUES, N. M. B. et al. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 132-138, 2017. ISSN 1517-8382.

RUARO, A. et al. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. **Food microbiology**, v. 34, n. 1, p. 106-111, 2013. ISSN 0740-0020.

SAMPIMON, O. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary microbiology**, v. 150, n. 1-2, p. 173-179, 2011. ISSN 0378-1135.

SANTOS, M. D.; FONSECA, L. D. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007.

SCHMID, D. et al. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 121, n. 3-4, p. 125-131, 2009. ISSN 0043-5325.

SILVA, N. et al. Methicillin-resistant S taphylococcus aureus of lineage ST 398 as cause of mastitis in cows. **Letters in applied microbiology**, v. 59, n. 6, p. 665-669, 2014. ISSN 0266-8254.

SPINOSA, H. D. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. **Rio de Janeiro**, 1999.

SUPRÉ, K. et al. Some coagulase-negative Staphylococcus species affect udder health more than others. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2329-2340, 2011. ISSN 0022-0302.

TAPONEN, S. et al. Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. **Acta Vet Scand**, v. 58, p. 12, Feb 6 2016. ISSN 0044-605x.

TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from Staphylococcus aureus. **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 29-36, 2009. ISSN 0378-1135.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2010. ISBN 8575413066.

TOMAZI, T. **Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por Staphylococcus coagulase negativa**. 2013. Universidade de São Paulo

TOMAZI, T. et al. Identification of Coagulase-Negative Staphylococci from Bovine Intramammary Infection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of clinical microbiology**, p. JCM. 03032-13, 2014. ISSN 0095-1137.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016. ISBN 8582713541.

TREMBLAY, Y. D. et al. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 1, p. 234-246, 2013. ISSN 0022-0302.

TRINDADE, P. D. A. et al. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3435-3437, 2005. ISSN 0095-1137.

VANDERHAEGHEN, W. et al. Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative Staphylococcus species associated with ruminant udder health. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 9, p. 5275-93, Sep 2014. ISSN 0022-0302.

_____. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **Vet J**, v. 203, n. 1, p. 44-51, Jan 2015. ISSN 1090-0233.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation. **Veterinary microbiology**, v. 92, n. 1-2, p. 179-185, 2003. ISSN 0378-1135.

VIGUIER, C. et al. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-493, 2009. ISSN 0167-7799.

XU, J. et al. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. **Microb Pathog**, v. 88, p. 29-38, Nov 2015. ISSN 0882-4010.

ZADOKS, R. N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 357-372, 2011. ISSN 1083-3021.

ZELL, C. et al. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International journal of food microbiology**, v. 127, n. 3, p. 246-251, 2008. ISSN 0168-1605.