

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE *Staphylococcus*
COAGULASE-NEGATIVOS E TAXAS DE CURA DA
MASTITE OVINA**

Lucas Eduardo Pilon
Médico Veterinário

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE *Staphylococcus*
COAGULASE-NEGATIVOS E TAXAS DE CURA DA
MASTITE OVINA**

Lucas Eduardo Pilon

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária (Medicina Veterinária
Preventiva)**

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Pilon, Lucas Eduardo

M499a Características genotípica de *Staphylococcus* coagulase-negativos e taxas de cura da mastite ovina. / Lucas Eduardo Pilon. -- Jaboticabal, 2016.

xix, 97 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016.

Orientador: Luiz Francisco Zafalon

Banca examinadora: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Luiz Augusto do Amaral, Karina Paes Burger.

Bibliografia

1. Biofilme. 2. Enterotoxina. 3. Mastite subclínica. 4. Ovehas. 5. Perfil clonal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE *Staphylococcus* COAGULASE-NEGATIVOS E TAXAS DE CURA DA MASTITE OVINA.

AUTOR: LUCAS EDUARDO PILON

ORIENTADOR: LUIZ FRANCISCO ZAFALON

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

Pesquisador LUIZ FRANCISCO ZAFALON
EMBRAPA / São Carlos/SP

Profa. Dra. ALICE MARIA MELVILLE PAIVA DELLA LIBERA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / FMVZ - USP - São Paulo/SP

Profa. Dra. MARIA DE LOURDES RIBEIRO SOUZA DA CUNHA
Departamento de Microbiologia e Imunologia / UNESP - Instituto de Biociências de Botucatu/SP

Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de fevereiro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS EDUARDO PILON – Colina – SP, 26/11/1983. Terceiro filho de Adair Pilon (*in memorian*) e Maria Alice Malpeli Pilon. Iniciou sua trajetória acadêmica cursando Medicina Veterinária na Faculdades Adamantinenses Integradas (FAI), localizada em Adamantina – SP no ano de 2003, graduando-se em 2007. Cursou Mestrado no Instituto de Zootecnia (2010 - 2012), Nova Odessa – SP, obteve o grau de Mestre em Produção Animal Sustentável ao estudar o perfil microbiológico e de resistência dos *Staphylococcus* coagulase-negativa isolados de ovelhas tratadas no pré-parto, sob orientação da Prof^a Dr^a Juliana Rodrigues Pozzi Arcaro durante o mestrado foi bolsista da Capes e da FAPESP. Iniciou o seu Doutorado no ano de 2012, na FCAV/UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, estudando as características genotípicas de *Staphylococcus* coagulase-negativos e taxas de cura da mastite ovina, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon.

EPÍGRAFE

A nossa maior glória, não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmos
sempre depois de uma queda.

Confúcio

Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz até onde os outros foram.

Alexandre Graham Bell

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais:
Adair Pilon (*in memorian*) e Maria Alice Malpeli Pilon,
que nunca mediram esforços para que seus filhos
aprendessem o que há de mais belo, o estudo; aos
meus irmãos(ã): José Angelo Pilon, Carlos Eduardo Pilon
e Natalia Ferreira Pilon, a minha esposa Sabrina Souza da Costa
e aos meus queridos sobrinhos(a) Eduardo, João Miguel e Alice.

AGRADECIMENTO

Agradeço a toda a minha família, Maria Alice Malpeli Pilon, minha querida mamãe, que sofreu e sorriu junto comigo durante todo esse período em que passei fora de casa, aos meus queridos irmãos(ã) José Angelo Pilon, Carlos Eduardo Pilon e Natália Ferreira Pilon, pelo apoio e incentivo durante esta caminhada em busca de mais um sonho, e aos meus queridos sobrinhos(a) Eduardo, João Miguel e Alice.

Não posso deixar de citar o Sr. Adair Pilon (*in memorian*), o meu querido papai, sou seu fã e me espelho em você, gostaria de poder sorrir junto com o senhor esse momento tão especial, que está se concretizando em minha vida. Um dia vamos nos encontrar.

Agradeço a minha esposa Sabrina Souza da Costa, pelo incentivo, paciência e pelo carinho, pois não foi fácil, te amo.

Ao Professor Dr. Luiz Francisco Zafalon, pela oportunidade, pelos ensinamentos e incentivos durante esta caminhada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UNESP Campus de Jaboticabal pelos ensinamentos que transmitiram a todos os alunos.

A Professora do Instituto de Biociências da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, pelos ensinamentos e pelo apoio para realizar as análises genotípicas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo Fapesp n°2012/23044-0).

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Mastite ovina	2
2.2. Mastite ovina causada por <i>Staphylococcus</i> coagulas-negativos	3
2.3. Tratamento da mastite em ovelhas durante a secagem	4
2.4. Resistência à oxacilina – gene <i>mecA</i>	7
2.5. Biofilmes	10
2.5.1. Gene <i>ica</i>	11
2.5.2. Gene <i>bap</i> e <i>bhp</i>	12
2.6. Enterotoxinas e toxina estafilocócica	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. Geral	15
3.2. Específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Características do rebanho	16
4.2. Determinação da mastite subclínica infecciosa e avaliação da metade mamária	16
4.2.1. Realização do <i>Califórnia Mastitis Test</i> – CMT e contagem da célula somática (CCS)	17
4.3. Coleta das amostras de leite	17
4.4. Formação dos grupos experimentais	18
4.5. Determinação da sensibilidade antimicrobiana	18
5. ELABORAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS	19
5.1. Antimicrobiano nanoencapsulado	19
5.2. Antimicrobiano convencional (forma livre)	20
6. ADMINISTRAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS (INTRAMAMÁRIA)	20
7. DETERMINAÇÃO DA CURA MICROBIOLÓGICA	21
8. ANÁLISES LABORATORIAIS	21
8.1. Diagnóstico microbiológico	21
8.2. Identificação fenotípica dos <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	22
8.3. Análises genotípicas	22
8.3.1. <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS-PCR)	22

8.3.2. Detecção da presença de genes relacionados com a resistência à oxacilina, produção de biofilme, enterotoxinas e toxina	23
8.3.2.1. Extração do DNA	23
8.3.2.2. Amplificação do DNA para detecção de genes codificadores de resistência à oxacilina em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	23
8.3.2.3. Amplificação do DNA para detecção de genes codificadores de biofilme em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	24
8.3.2.4. Amplificação do DNA para detecção de genes codificadores de enterotoxinas e toxina em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	25
8.3.2.5. Eletroforese em gel de agarose	26
8.3.2.6. Eletroforese em gel de campo pulsátil (PFGE)	27
9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
10.1. Ocorrências dos SCN e presença/ausência de cura	29
10.2. Resultados fenotípicos para identificar as espécies de SCN	31
10.3. <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS - PCR) para identificar as espécies de SCN	33
10.4. Detecção dos genes de virulência	37
10.4.1. Gene <i>mecA</i> – resistência à oxacilina	37
10.4.2. Genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>tsst-1</i> responsável pela produção de enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico.....	38
10.4.3. Genes <i>icaA</i> , <i>icaC</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> e <i>bhp</i> responsável pela produção de biofilme	40
10.5. Relação de cura e não cura com os fatores de virulência	44
10.6. Caracterização molecular por meio do PFGE	47
10.6.1. <i>Staphylococcus warneri</i>	48
10.6.2. <i>Staphylococcus simulans</i>	52
10.6.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	55
10.6.4. <i>Staphylococcus xylosus</i>	57
11. MAPA DE ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA MÚLTIPLA	59
12. CONCLUSÕES	61
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
14. ANEXO	77

CERTIFICADO DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Pecuária Sudeste**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado: "Tratamento da mastite subclínica de ovelhas no período seco com antimicrobianos convencional e nanoparticulado", utilizando 76 animais da espécie ovina (*Ovis aries*), sob responsabilidade do pesquisador científico Dr. Luiz Francisco Zafalon, está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição.

(We hereby declare that the research: "Treatment of subclinical mastitis in sheep during the dry period with conventional and nanoparticle antimicrobials", utilizing 76 animals of the ovine (*Ovis aries*) species, under the responsibility of the scientific researcher Dr. Luiz Francisco Zafalon, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Livestock and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 15 de Junho de 2012.

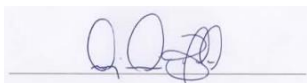
Dr. Rui Machado

*Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste*

COMUNICADO

O Certificado da comissão de ética para o uso de animais emitido pela Embrapa Pecuária Sudeste para o desenvolvimento do projeto “TRATAMENTO DA MASTITE SUBCLÍNICA DE OVELHAS NO PERÍODO SECO COM ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAL E NANOPARTICULADO” foi utilizado para o desenvolvimento do projeto “CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE *Staphylococcus* COAGULASE-NEGATIVOS E TAXAS DE CURA DA MASTITE OVINA”, uma vez que as amostras utilizadas foram oriundas dos mesmos animais e períodos.

São Carlos, 02 de dezembro de 2015.



Luiz Francisco Zafalon
Orientador



Lucas Eduardo Pilon
Pós-graduando

CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE *Staphylococcus* COAGULASE-NEGATIVOS E TAXAS DE CURA DA MASTITE OVINA

RESUMO - A mastite em ovelhas de dupla aptidão é reconhecida por afetar a qualidade do leite. *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) são os principais micro-organismos responsáveis pela doença, e o tratamento ao final da lactação, pode contribuir para a cura e prevenção de casos subclínicos na lactação consecutiva. Entretanto, fatores de virulência e mecanismos de resistência apresentados por SCN podem reduzir as taxas de cura. Os objetivos deste trabalho foram identificar no leite de ovelhas tratadas e não tratadas à secagem com antimicrobianos, as espécies de SCN antes e após o tratamento e identificar nesses micro-organismos a presença dos genes *mecA*, *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *bhp*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tsst-1*, determinar o perfil clonal das principais espécies identificadas e relacionar os casos de cura após o tratamento com a presença/ausência dos respectivos genes. Sessenta ovelhas foram divididas em três grupos experimentais: G1, controle, metades mamárias que não receberam antimicrobiano; G2, metades mamárias em que foram administrados 10 mL de cloxacilina-benzatina 100 mg via intramamária / estrutura convencional; G3, metades mamárias em que foram administrados 86 mL de cloxacilina-benzatina 50 mg via intramamária / estrutura nanoencapsulada. As amostras de leite foram coletadas à secagem e aos 15 e 30 dias pós-parto da lactação seguinte. As análises para identificação das espécies de SCN foram realizadas por meio de testes bioquímicos e *Internal Transcribe Spacer* (ITS-PCR), e a pesquisa dos genes responsáveis pelos fatores de virulência e pela resistência à oxacilina foram realizados por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Dentre as espécies identificadas *S. warneri* prevaleceram nos três grupos experimentais. Nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*. O único gene relacionado com a produção de enterotoxinas encontrado foi o *sec*. Dentre os genes relacionados com a produção de biofilme, *icaD* foi o único identificado nos três grupos experimentais. *Staphylococcus warneri*, *S. simulans* e *S. epidermidis* apresentaram clones na mesma metade mamária no pré e pós-parto das ovelhas. A cloxacilina benzatina nanoparticulada 50mg / 86 mL foi eficiente para reduzir a mastite subclínica no pós-parto de ovelhas (P= 0,0192). *Staphylococcus warneri*, *S. simulans*, *S. epidermidis* e *S. xylosus* foram as espécies de maior ocorrência. Os genes *icaA*, *icaC*, *icaD* e *bap* foram encontrados no momento da desmama e no pós-parto, os genes *sec* e *icaD* estão associados à ausência de cura da mastite subclínica no pós-parto. Ovelhas em que foram isolados SCN portadores de genes responsáveis pela formação de biofilme não apresentaram resultados satisfatórios quando submetidas a esquemas de controle e ao tratamento da mastite subclínica. Os genes *sec* e *icaD*, estão associadas à ausência de cura microbiológica da mastite subclínica no pós-parto. *Staphylococcus epidermidis* e *S. xylosus* portador do gene *bap* estão associados à reinfeção.

Palavras-chave: biofilme, enterotoxina, mastite subclínica, ovelhas, perfil clonal.

GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* AND CURE RATES FOR OVINE MASTITIS

ABSTRACT – Mastitis in dual-purpose sheep is recognized to affect their milk quality. Coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) is the main microorganism responsible for this disease and treatment at the end of lactation may contribute towards curing it and preventing subclinical cases during the consecutive lactation. However, virulence factors and resistance mechanisms presented by CNS may reduce the cure rates. The aims of this study were to identify CNS species in sheep's milk with and without treatment with antimicrobials at the time of drying off and, in these microorganisms, to identify presence of the genes *mecA*, *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *bhp*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tsst-1*, determine clonal profile of the main species identified and correlate the cases of cure after treatment with the presence or absence of the respective genes. Sixty sheep were divided into three experimental groups: G1 (control), mammary glands that did not receive antimicrobials; G2, mammary glands to which 10 mL of cloxacillin-benzathine (100 mg) was administered via the intramammary route in a conventional structure; and G3, mammary glands to which 86 mL of cloxacillin-benzathine (50 mg) was administered via the intramammary route in a nanoencapsulated structure. Milk samples were collected at the time of drying off and 15 and 30 days after lambing in the next lactation. The analyses to identify the CNS species were performed by means of biochemical tests and internal transcribe spacer polymerase chain reaction (ITS-PCR), and the genes responsible for the virulence factors and resistance to oxacillin were investigated by means of the PCR technique. Among the species identified, *Staphylococcus warneri* was most prevalent in the three experimental groups. None of the samples were positive for the gene *mecA*. The only gene relating to production of enterotoxins that was found was *sec*. Among the genes relating to biofilm production, *icaD* was the only one identified in the three experimental groups. *Staphylococcus warneri*, *S. simulans* and *S. epidermidis* presented clones in the same mammary gland before and after lambing. The dose of 86 mL of nanoparticulate cloxacillin-benzathine (50 mg) was efficient for reducing subclinical mastitis after lambing ($P = 0.0192$). *Staphylococcus warneri*, *S. simulans*, *S. epidermidis* and *S. xylosus* were the species that occurred most frequently. The genes *icaA*, *icaC*, *icaD* and *bap* were found at the time of weaning and in the postpartum period. The genes *sec* and *icaD* were correlated with absence of cure for subclinical mastitis after lambing. Sheep in which CNS carrying genes responsible for biofilm formation was isolated did not present satisfactory results when they were subjected to regimens for controlling and treating subclinical mastitis. The genes *sec* and *icaD* were correlated with absence of microbiological control over subclinical mastitis after lambing. *Staphylococcus epidermidis* and *S. xylosus* carrying the gene *bap* were correlated with reinfection.

Keywords: biofilm, enterotoxin, subclinical mastitis, sheep, clonal profile.

LISTA DE ABREVIATURA

ATCC	American Type Culture Collection
<i>bap</i>	Proteína associada ao biofilme
<i>bhp</i>	Proteína homóloga ao <i>bap</i>
CCS	Contagem de célula somática
CFO	Cefoxitina
CMT	Califórnia mastites test
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FRZ	Furazolidona
ICA	Proteína de adesão intercelular
<i>icaA</i>	Gene codificador de proteína A de adesão intercelular
<i>icaC</i>	Gene codificador de proteína C de adesão intercelular
<i>icaD</i>	Gene codificador de proteína D de adesão intercelular
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kb	Quilobyte
<i>mecA</i>	Gene responsável pela resistência à oxacilina
Mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
OXA	Oxacilina
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsátil
pH	Potencial hidrogênionico
PIA	Proteína de adesão intercelular
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos
<i>sea</i>	Gene que codifica a proteína responsável pela produção da enterotoxina A
<i>seb</i>	Gene que codifica a proteína responsável pela

	produção da enterotoxina B
<i>sec</i>	Gene que codifica a proteína responsável pela produção da enterotoxina C
<i>sed</i>	Gene que codifica a proteína responsável pela produção da enterotoxina D
SP	São Paulo
<i>tsst-1</i>	Gene que codifica a proteína responsável pela produção da Toxina 1 da síndrome do choque tóxico
UNESP	Universidade Estadual Paulista
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
Tabela 1. Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de proteínas responsáveis pela produção biofilmes em linhagens de <i>Staphylococcus</i> isoladas de leite ovino.....	25
Tabela 2. Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de proteínas responsáveis pela produção de enterotoxinas e toxina em linhagens de <i>Staphylococcus</i> isoladas de leite ovino utilizando PCR.....	26
Tabela 3. Distribuição das ovelhas com mastite subclínica por SCN em diferentes grupos de acordo com a efetivação ou não do tratamento, antes da desmama, aos 15 e 30 dias pós-parto	29
Tabela 4. Espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos isoladas das ovelhas com mastite subclínica durante o pré-tratamento, identificadas por meio dos testes bioquímicos	32
Tabela 5. Espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos isoladas de ovelhas com mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto, identificadas por testes bioquímicos	33
Tabela 6. Espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos identificadas antes da desmama em ovelhas com mastite subclínica distribuídas em três grupos experimentais	34
Tabela 7. Espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos identificadas de ovelhas tratadas e não tratadas aos 15 e 30 dias pós-parto após o tratamento contra a mastite antes da desmama	36
Tabela 8. Distribuição do gene <i>sec</i> em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos identificados na desmama, ou seja, pré-tratamento, e aos 15 e 30 dias pós-parto da lactação seguinte	40
Tabela 9. Distribuição dos genes <i>icaC</i> , <i>icaD</i> e <i>bap</i> nas espécies de SCN identificadas na desmama de ovelhas com mastite subclínica imediatamente antes do período seco	42
Tabela 10. Distribuição dos genes <i>icaA</i> , <i>icaC</i> e <i>icaD</i> em espécies de SCN identificados aos 15 e 30 dias pós-parto em ovelhas pertencentes aos três grupos experimentais	43

Tabela 11. Espécies de SCN identificadas no desmame e seus genes de fatores de virulência identificados em metades mamárias curadas e não curadas	45
Tabela 12. Características dos clones de <i>S. warneri</i> identificados no pré-tratamento, 15 e/ou 30 dias pós-parto de ovelhas não curadas da mastite subclínica, e seus fatores de virulência.....	49
Tabela 13. Características dos clones de <i>S. simulans</i> identificados no pré-tratamento, 15 e/ou 30 dias pós-parto de ovelhas não curadas da mastite subclínica, e seus fatores de virulência.....	54
Tabela 14. Características dos clones de <i>S. epidermidis</i> identificados no pré-tratamento, 15 e/ou 30 dias pós-parto de ovelhas não curadas da mastite subclínica, e seus fatores de virulência.....	57
Tabela 15. Resultados do CMT obtidos das metades mamárias durante o pré- tratamento.....	77
Tabela 16. Média da CCS das amostras de leite coletadas durante o pré-tratamento das ovelhas portadoras de mastite subclínica.....	77
Tabela 17. Tabela das probabilidades, das respectivas tabelas de contingência, geradas pelo teste de qui-quadrado.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1. Placas de ágar sangue ovino desfibrinado a 5% com crescimento bacteriano, sugestivo de <i>Staphylococcus</i> spp	22
Figura 2. Produto de <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS - PCR) em gel de agarose metaphor 2% para identificar as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	35
Figura 3. Produto de PCR em gel de agarose metaphor 2% para identificar as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos portadoras do gene <i>mecA</i>	38
Figura 4. Produto de PCR em gel de agarose metaphor 2% para identificar as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos portadoras do gene <i>sec</i>	39
Figura 5. Produto de PCR em gel de agarose metaphor 2% para identificar as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos portadoras do gene <i>icaC</i>	41
Figura 6. Gel resultante da análise de PFGE corados com GelRed [®] e fotografado sob transluminação UV	48
Figura 7. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 33 isolados de <i>Staphylococcus warneri</i>	50
Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 22 isolados de <i>Staphylococcus simulans</i>	53
Figura 9. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 14 isolados de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	56
Figura 10. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 14 isolados de <i>Staphylococcus xylosus</i>	58
Figura 11. Mapa da análise de correspondência múltipla mostrando a associação entre os grupos, as estirpes de SCN, os fatores de virulência e as presença/ausência de cura da mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto	59

1 – INTRODUÇÃO

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, considerada a principal enfermidade que acomete os animais produtores de leite. Em ovinos de dupla aptidão, essa doença pode comprometer o desenvolvimento dos cordeiros e gerar diversos prejuízos aos produtores. A doença pode apresentar-se sob a forma clínica ou subclínica. A mastite clínica é diagnosticada por meio das alterações visíveis no leite e no úbere. Na mastite subclínica não são observadas alterações visíveis na glândula mamária e no leite, podendo ocorrer diminuição da produção, alterações dos componentes do leite.

Staphylococcus coagulase-negativos (SCN) estão entre os principais micro-organismos responsáveis pela doença em ovinos. Uma das formas de controle da mastite causada por estes agentes é o tratamento com antimicrobianos ao final da lactação. Entretanto, a presença de estirpes de SCN portadores de genes codificadores de proteínas responsáveis pela resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, formação de biofilme, produção de enterotoxinas e toxina podem acarretar a permanência dos micro-organismos na glândula mamária, resultando em infecções persistentes.

Devido à grande diversidade de espécies de SCN responsáveis pelos casos de mastite em ovinos, o uso da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) pode ser útil por permitir evidenciar a presença de um ou mais clones bacterianos predominantes, além de avaliar se SCN portadores de fatores de virulência são transmitidos de animal para animal ou se esses fatores são adquiridos por meio do uso inadequado de antimicrobianos.

O objetivo do trabalho foi determinar o perfil clonal das espécies de SCN isolados de ovelhas antes e após o tratamento da mastite subclínica, e relacionar os fatores de virulência e de resistência antimicrobiana com a taxa de cura.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Mastite ovina

Mastite (do grego *mastos*) ou mamite (do latim *mammae*) é considerada a enfermidade que causa mais prejuízos aos produtores, reduzindo em quantidade e qualidade o leite e os derivados lácteos, podendo ocorrer destruição parcial ou total da metade mamária (MANIERI et al., 2014).

O primeiro relato de mastite em ovelhas de âmbito nacional foi descrito por Fernandes e Cardoso (1985), quando descreveram um surto de mastite por *Staphylococcus aureus* no Rio Grande do Sul. Tempos depois Vaz (1996), através de levantamento realizado em algumas regiões do Rio Grande do Sul e Santa Catarina detectou mastite em ovelhas causada por *Staphylococcus aureus* e demais patógenos.

A mastite pode ser classificada em subclínica e clínica. A forma clínica se divide em aguda e crônica, de acordo com a gravidade da inflamação e o comprometimento sistêmico. Diferente da mastite clínica, na mastite subclínica o animal não apresenta sinais clínicos e o leite não contém alterações visíveis. A mastite subclínica é a que mais se relaciona com os prejuízos dos produtores, pois não pode ser diagnosticada por meio da observação visual do úbere ou do leite. O diagnóstico é realizado apenas com o uso de técnicas relacionadas com alterações na constituição do leite e confirmação da etiologia infecciosa da doença por meio da identificação microbiológica do micro-organismo (MCDOUGALL et al., 2001).

As ovelhas destinadas à produção de carne produzem quantidade de leite suficiente para desencadear a mastite. Ovelhas com mastite subclínica apresentam o leite com as características alteradas, como aumento de pH, aumento no teor de cloreto, teores de soro-proteínas e células somáticas, baixas concentrações de imunoglobulinas, o que pode atrasar o ganho de peso dos cordeiros, além de ocasionar o descarte dos animais nos primeiros dois a três meses de lactação (SANTOS et al., 2007; LEITNER et al., 2008; MARTINS et al., 2009; VERÍSSIMO et al., 2010).

De acordo com Contreras et al. (2007), a prevalência da mastite subclínica em ovelhas está em torno de 17,5%. Segundo Veríssimo et al. (2007), 48,7% das ovelhas em início de lactação podem apresentar mastite subclínica ou crônica em pelo menos uma das metades mamárias. Guaraná et al. (2009) verificaram que a ocorrência de mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases de lactação oscilou entre 23,5% a 35,3%, enquanto que Oliveira et al. (2012) encontraram 40,45% de mastite subclínica em ovelhas. De acordo com Santana et al. (2014), as ocorrências de mastite subclínica em ovelhas Santa Inês e Morada Nova foram de 33,1% e 35,1%, respectivamente. Morais et al. (2011) realizaram estudo para determinar a ocorrência de mastite em ovelhas no norte do Estado de Minas Gerais e encontraram 54,5% de mastite subclínica.

Os gastos dos produtores com a mastite incluem custos com medicamentos, descarte dos animais, depreciação zootécnica da matriz afetada pela doença, honorários com assistência técnica especializada e aumento da mão de obra devido ao aleitamento artificial dos cordeiros (VERÍSSIMO et al., 2010). Dentre as diversas raças de ovelhas criadas nos sistemas brasileiros, a raça Santa Inês, caracterizada por possuir dupla aptidão, com elevadas características para a produção leiteira apresenta maior susceptibilidade à mastite (DOMINGUES et al., 2006; MELO et al., 2008).

2.2 - Mastite ovina causada por *Staphylococcus* coagulase-negativos

A etiologia da mastite é bastante ampla e, o patógeno de maior ocorrência é *Staphylococcus* spp. (CONTRERAS et al., 2007). Dentre *Staphylococcus* spp. que causam mastite, os que apresentam maior frequência de isolamento são SCN (ZAFALON et al., 2010). O termo “coagulase negativa” se refere à incapacidade destas bactérias em coagular o plasma sanguíneo, diferenciando este grupo dos *Staphylococcus* coagulase-positivo.

Staphylococcus coagulase-negativos são considerados os principais microorganismos isolados de leite de ovelhas com mastite (ALVES et al., 2010; SILVA et al., 2010; VERÍSSIMO et al., 2010; LUCHEIS et al., 2010; MORAIS et al., 2011;

TEJADA et al., 2012, SILVA et al., 2013; TANAKA et al., 2013; ZAFALON et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; SANTANA et al., 2014).

De acordo com Silva (2012) os animais portadores de mastite causada por SCN podem apresentar fibrose interalveolar do tecido mamário e perda da função secretória de leite. Diversas espécies de SCN podem ser isoladas de ovelhas com de mastite subclínica, predominando *Staphylococcus epidermidis*, *S. simulans* e *S. xylosus* (AGNOL et al., 2013; PILON et al., 2014).

Moroni et al. (2007) encontraram 44,9% de SCN em amostras de leite coletadas de ovelhas Bergamácia. Dentre as espécies identificadas, predominaram: *S. epidermidis* 73,6%, seguidos por *S. xylosus* 15,5% e *S. simulans* 10,9%. Tejada et al. (2012) coletaram amostras de leite de ovelhas de corte e identificaram *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*.

Silva (2012) realizou análise laboratorial para identificar as espécies de SCN isoladas de leite de ovelhas, e encontrou como espécie de maior ocorrência *S. chromogenes* (20,27%) seguidos pelos *S. sciuri* subesp. *sciuri* (6,76%), *S. pasteurii* e *S. xylosus* (5,41%), *S. equorum* (4,05%), *S. haemolyticus* (2,70%), *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. schleiferi* subesp. *schleiferi* e *S. carnosus* (1,35%).

Martins et al. (2013) realizaram a identificação das espécies de SCN isoladas de ovelhas das raças Santa Inês e Bergamácia portadoras e não portadoras de mastite subclínica e encontraram, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. epidermidis*, dentre outras. Com base nos resultados os autores concluíram que SCN foram os micro-organismos mais isolados em amostras de leite ovino. František et al. (2014) coletaram amostras de leite de ovelhas, e encontraram maior ocorrência de mastite subclínica causada pelos SCN, e as espécies identificadas foram: *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. schleiferi*, *S. chromogenes*, dentre outras.

2.3 - Tratamento da mastite em ovelhas durante a secagem

Ovelhas com mastite subclínica, não têm sido tratadas durante a lactação, em virtude da baixa efetividade dos antimicrobianos contra os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* spp, custos com antimastíticos, resíduos de antimicrobianos no leite, descarte do leite (BERGONIER et al., 2003).

Uma das formas de controlar a mastite em ovelhas é realizar o tratamento no final da lactação, que se tem mostrado eficiente na redução das infecções intramamárias, proporcionando ganhos de produção de leite, diminuição da mortalidade dos cordeiros e maior tempo de permanência das matrizes no rebanho (CHAFFER et al., 2003; GONZALO et al., 2004). De acordo com Melo et al. (2008) é necessária a utilização de antimicrobianos no momento do desmame das ovelhas, devido a evolução de uma provável mastite para uma septicemia, causa comum de morte em ovelhas Santa Inês.

Em rebanhos com alta quantidade de animais portadores de mastite subclínica e leite com alta CCS é indicado o tratamento no período seco, porém envolve uma série de fatores como: a escolha correta o antimicrobiano, a susceptibilidade do micro-organismo, a duração do tratamento, dosagem, *status* do animal e deve ser acompanhado de um médico veterinário (ANDERON et al., 2004; SHWIMMER et al., 2008; MOTA, 2008).

O tratamento da mastite em ovelhas normalmente é realizado a base de antimicrobianos de amplo espectro. Mello et al. (2008) aplicaram 5 mL de enrofloxacin 250 mg, via intramuscular no momento da secagem de ovelhas Santa Inês e verificaram que o tratamento reduziu significativamente os sinais clínicos da doença.

Coutinho et al. (2014) aplicaram antimicrobiano com o princípio ativo cefalônio anidro 250 mg, via intramamária em ovelhas Santa Inês no momento da secagem e verificaram que aos 20-25 e 40-45 dias de lactação, o número de metades mamárias com mastite foi menor em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que o antimicrobiano utilizado mostrou-se eficiente na terapia/profilaxia da mastite em ovelhas Santa Inês.

Em trabalhos realizados no Canadá, Israel e Estados Unidos, os autores não observaram diferença significativa na ocorrência de novas infecções intramamárias entre as ovelhas tratadas com antimicrobiano intramamário no momento da secagem (CROFT et al., 2000; CHAFFER et al., 2003; SPANU et al., 2011), enquanto que Gonzalo et al. (2004); Linage e Gonzales (2008) realizaram pesquisas na Espanha e relataram uma redução significativa de mastite no pós-parto de ovelhas tratadas com antimicrobianos na secagem.

Santos et al. (2007) realizaram concomitantemente três aplicações parenterais e intramamária de antimicrobiano e anti-inflamatório em ovelhas inoculadas via intramamária com *S. aureus*. Os autores observaram que as ovelhas restabeleceram os sinais clínicos, porém ocorreu a perda da produção de leite.

O tipo de exploração do rebanho, a prevalência de mastite, os micro-organismo predominantes, os perfis antimicrobianos e a facilidade de aplicação de medicamentos intramamários são decisivos na escolha da terapia e do antimicrobiano que será utilizado no período de secagem das ovelhas (MENZIES, RAMANOON, 2001).

A utilização excessiva e indiscriminada de antimicrobianos para controlar os casos de mastite nos animais tem determinado a seleção de estirpes multirresistentes, ineficiência terapêutica e ocorrência de reincidivas (TRONCARELLI et al., 2013). O desenvolvimento de antimicrobianos nanoparticulados pode diminuir a seleção de estirpes resistentes e causar menos efeitos colaterais (LIU et al., 2009).

O uso de antimicrobianos com menor concentração do princípio ativo é mais racional, uma vez que há uma menor geração de resíduos em produtos de origem animal. O intuito de utilizar produtos nanoparticulados é direcionar o antimicrobiano para os agentes infecciosos, até mesmo no interior de células fagocitárias, mesmo quando em menor concentração, o que facilita a sua ação (BRANDÃO et al., 2011; UNDERWOOD & EPS, 2012).

As nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica, enquanto que as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (VAUTHLER-HOLTZSCHERER et al., 1991; PUISIEUX et al., 1994).

A utilização de antimicrobianos nanoparticulados é umas das áreas mais promissoras da nanotecnologia, podendo ser administrado por diversas vias de aplicação, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos, e assim um

aumento do índice terapêutico (PUISIEUX et al., 1994; PINTO-ALPHANDARY et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Com a finalidade de controlar a mastite causada pelos *Staphylococcus* spp. Pesquisadores da Embrapa Juiz de Fora – MG e da Universidade Federal de Ouro Preto desenvolveram formulações de antimicrobianos nanoparticulados para administração intramamária, na qual as nanopartículas são capazes de direcionar o antimicrobiano para a superfície do epitélio glandular e para o interior dos leucócitos polimorfonucleares, aumentando, desta maneira, a concentração do princípio ativo em compartimentos intracelulares (TRONCARELLI et al., 2013).

Dentre os diversos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite, a cloxacilina benzatina, antibiótico β -lactâmico, muito utilizado em práticas veterinárias devido a sua atividade contra as bactérias gram-positivas é um fármaco de grande interesse na área da medicina veterinária. Por aumentar a disponibilidade da cloxacilina benzatina dentro das células infectadas e até mesmo dentro das metades mamárias, onde as bactérias se instalam e são de difícil combate, uma das alternativas é a encapsulação em vetores nanoestruturados (ARAÚJO, 2009).

Santana (2014) realizaram estudo pioneiro, sobre a utilização da cloxacilina benzatina em estrutura nanoparticulada no tratamento da mastite subclínica no momento da desmama em ovelhas Santa Inês e Morada Nova, e verificou que as ovelhas tratadas com o respectivo antimicrobiano apresentaram maior taxa de cura quando comparadas com as demais, o autores concluíram que o antimicrobiano é eficiente para reduzir as infecções subclínicas no pós-parto de ovelhas.

Zafalon et al. (2014) administraram via intramamária no momento da secagem de ovelhas com mastite subclínica cloxacilina benzatina em estrutura nanoparticulada, e verificaram no pós-parto que o grupo tratado apresentou 76,2% de cura para a mastite subclínica, com base nos resultados os autores sugerem o desenvolvimento de medicamento intramamário nanoparticulado contra a mastite para a espécie ovina.

2.4 - Resistência à oxacilina – gene *mecA*

A terapia intramamária visando à cura da mastite em ovinos tem sido realizada com diferentes antimicrobianos (NACCARI et al., 2003). Porém, não estão disponíveis no mercado atualmente, produtos comerciais elaborados especificamente para pequenos ruminantes, restando na prática a utilização de antimastísticos específicos para bovinos. Como consequência, o uso indiscriminado e excessivo de antimicrobianos pode aumentar o risco de resistência dos patógenos a estes medicamentos (CONTRERAS et al., 2007), além da falta de critérios antes dos tratamentos não precedidos por exames microbiológicos e antibiogramas (PILON, 2012).

Coutinho et al. (2006) determinaram o perfil antimicrobiano de cepas de SCN isolados de ovelhas Santa Inês com mastite subclínica e encontraram 5,3% de resistência para a penicilina G. Della Libera et al. (2010) isolaram cepas de SCN do leite de ovelhas Santa Inês e determinaram o perfil antimicrobiano, encontrando 14,1% de resistência para a oxacilina e 11,6% de resistência para a penicilina. Pilon (2012) traçou o perfil antimicrobiano dos SCN isolados de leite de três propriedades e relatou vários perfis de resistência à penicilina e à oxacilina, que alcançaram percentuais de até 52,2% para a penicilina e de 17,2% de cepas resistentes para a oxacilina.

O aparecimento de SCN resistentes à meticilina ou oxacilina está se tornando um problema grave. De acordo com Sahm (1994) e Lee (2003) a resistência dos *Staphylococcus* spp. à meticilina ou oxacilina está relacionada a presença do gene *mecA* (determinante genético da resistência), que torna os micro-organismos resistentes. Esta resistência ocorre devido a presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP- "*Protein Binding Penicilin*"), de baixa afinidade para os β -lactâmicos, chamada de "PBP 2" ou "PBP 2^a", resistentes às penicilinas, presente na membrana plasmática e codificada pelo gene cromossômico *mecA* (CHAMBERS, 1998; HACKBARTH & CHAMBERS, 1989).

Staphylococcus spp. resistentes aos β -lactâmicos possuem um elemento cromossômico móvel, denominado SCCmec "*staphylococcal cassette chromosome mec*", onde contém o gene *mecA*, responsável por codificar a proteína de ligação alterada, resultando no quadro de multirresistência (RICARDO, 2004).

Atualmente são conhecidos três mecanismos principais pelos quais pode ocorrer resistência bacteriana aos β -lactâmicos. O primeiro é a hiperprodução da enzima β -lactamase que hidrolisa os antibióticos. O segundo é a alteração do sítio de ação do antibiótico, ou seja, produção da proteína ligadora de penicilina adicional “PBP 2^a”, e o terceiro são as modificações na capacidade de ligação das “PBPs” (TOMASZ et al., 1989; MENDONÇA, 1997; HARBARTH et al., 1998). Segundo Lencastre et al. (1991) os três mecanismos de resistência aos β -lactâmicos podem estar presentes em uma mesma amostra, inclusive interagindo entre si.

Machado (2007) relatou prevalência do gene *mecA* em 71,3% de *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*. Rosa et al. (2009) identificaram SCN, cujas espécies mais prevalentes foram *S. epidermidis* (41%). *S. saprophyticus* (25%) e *S. haemolyticus* (18%), além de *S. cohnii* (8%), *S. lugdunenses* (4%), *S. capitis* (1%) e *S. simulans* (1%), e o gene *mecA* foi encontrado em 75% destas estirpes.

Zafalon et al. (2012) isolaram SCN de ovelhas com mastite e determinaram o perfil antimicrobiano destas amostras, encontrando 21,3% de resistência para à oxacilina, 30,7% de resistência para a penicilina. Dentre as amostras resistentes à oxacilina, 25% foram positivas para o gene *mecA*.

Segundo Maki & Murakami (1997), os fenótipos de resistências à meticilina são determinados, não só pela expressão do gene *mecA*, mas também pelos elementos genéticos próximos ao gene *mecA* no cromossomo como transposons e sequências de inserção. A presença de genes *mecA* homólogos ou outras classes de PBPs pode estar relacionadas aos mecanismos de resistências à oxacilina.

França et al. (2012) isolaram *Staphylococcus* spp. de pequenos ruminantes portadores de mastite e encontraram 12,8% de resistência fenotípica à oxacilina, e nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*. Martins (2013) isolaram SCN de ovelhas e determinaram o perfil antimicrobiano destes isolados, encontrando 17,6% de resistência para à oxacilina, sendo todas estas negativas para a presença do gene *mecA*. Silva (2012) não encontrou nenhuma cepas de SCN isolado do leite de ovelhas positiva para o gene *mecA*, o autor conclui que não houve correlação entre os testes fenotípicos e genotípicos para a caracterização da resistência aos β -lactâmicos mediada pelo gene *mecA*.

2.5 - Biofilmes

Os biofilmes podem ser denominados comunidades microbianas “sésseis” caracterizadas por células ligadas a um substrato ou interface ou umas às outras, que são incorporadas a uma matriz polimérica chamada “slime”. Eles são considerados importantes fatores de virulência, pois aumentam a capacidade das estirpes aderirem e colonizarem as superfícies, são formados por macromoléculas como polissacarídeos, proteínas, DNA, sais minerais, lipídeos e no seu estado hidratado pode conter cerca de 99% de água, protegendo as células da desidratação (AGUILAR et al., 2001). Os biofilmes podem ser constituídos de micro-organismos de uma única espécie ou de espécies e gêneros diferentes, que ficam alojados dentro da matriz polimérica auto-produzida, as quais são aderidas em qualquer superfície, inerte ou viva (COSTERTON et al., 1999).

Os biofilmes não são susceptíveis aos mecanismos de defesa do hospedeiro (CUCARELLAS et al., 2004). Bactérias no interior dos biofilmes podem se tornar resistentes a diversos antimicrobianos, devido à demora na penetração dos antimicrobianos na matriz do biofilme (DONLAN & COSTERTON, 2002). Amorena et al. (1999) realizaram estudos *in vitro* e demonstraram que as bactérias no interior dos biofilmes tornaram-se de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos antimicrobianos quando comparadas com as células livres. Além disso, pode ocorrer transferência horizontal de genes responsáveis pela virulência e resistência dos micro-organismos (WUERTZ et al., 2004).

Bactérias que se multiplicam no interior dos biofilmes diferem *in vivo* em sua capacidade de disseminação nos rebanhos, em aumentar as células somáticas, em desencadear mastite e até mesmo infecções persistentes, além de diminuição na produção de leite (SMITH et al., 1998; MIDDLETON e FOX, 2001; HAVERI et al., 2005).

De acordo com Marques (2005), as formações dos biofilmes ocorrem em cinco etapas: 1) ligação do material orgânico a superfície; 2) transporte de nutrientes e células para o local de aderência; 3) adesão bacteriana reversível; 4) multiplicação bacteriana e 5) adesão bacteriana irreversível. A fase de crescimento ou maturação, em que as bactérias se unem célula-célula é determinada por diversos ácidos

teicóicos, determinadas proteínas e por uma adesina denominada PIA (*polyssacharide intercellular adhesin*), e é composto por resíduos N-acetilglucosamina.

2.5.1 - Gene *ica*

O gene *ica* (*intercellular adhesion*), formado pelo operon *icaABCD* é responsável pela manifestação do PIA (FITZPATRICK et al., 2005). Os genes *icaA*, *icaC* e *icaD* codificadores de proteínas, estão localizados na membrana citoplasmática participam na extensão da cadeia do polissacarídeo. O gene *icaA* codificador da proteína A representa atividade catalítica N-acetilglicosaminatransferase, formando os primeiros oligossacarídeos, e sozinho tem baixa afinidade, que pode ser aumentada quando co-expressado junto com o gene *icaD*, levando a uma síntese de resíduos maiores de β -1,6-N-acetilglicosamina contendo de 10 a 20 oligômeros (GOTZ, 2002). O gene *icaC* é responsável pela formação de longos oligômeros de até 130 resíduos, e atua também no transporte transmembranar do polímero formado (DOBINSKY et al., 2002).

Staphylococcus spp. formadores ou não de biofilmes podem determinar a cronicidade das infecções intramamárias em animais (MELCHIOR et al., 2006). Bernardi et al. (2007) investigaram a produção de biofilme em 27 isolados de SCN e relataram 77% de positividade. Em outro estudo Pereira (2010) trabalhou com 100 amostras *Staphylococcus* spp. e encontrou 15% de positividade para os genes *icaA* e *icaD*.

Ergün et al. (2012) coletaram amostras de leite de ovelhas com mastite subclínica, e verificaram que 60,0% SCN eram portadores do gene *icaD*. De acordo com os autores os biofilmes ajudam *Staphylococcus* spp. a aderirem e colonizarem o epitélio da glândula mamária, aumentando a sobrevivência desses microorganismos neste ambiente. Gonçalves et al. (2014) encontraram diversas cepas de SCN produtoras de biofilme.

Marques et al. (2013) investigaram a produção de *slime* em estirpes de SCN isolados de vacas, e constataram que 74,5% das cepas eram produtoras de *slime*, porém 4,1% era portadora do gene *icaA* e 8,3% do gene *icaD*. Os autores

concluíram que o *slime* facilita a adesão dos *Staphylococcus* spp. ao tecido do hospedeiro e a agregação célula-célula, favorecendo a formação de biofilme.

De acordo com František et al. (2014) as informações sobre a formação de biofilme pelas espécies de SCN associadas a mastite é limitada, porém, estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de vacas com mastite apresentam maior capacidade de formar biofilme, quando comparado com estirpes isolados de vacas sem mastite.

2.5.2 - Gene *bap* e *bhp*

A formação de biofilme não depende exclusivamente do locus *ica*, podendo existir outros genes envolvidos. Um dos primeiros mecanismos estudados independentemente do gene *ica*, foi gene *bap* (*Biofilm associated protein* / proteína associada ao biofilme), gene que codifica uma proteína, pode promover tanto a fixação primária a superfície como a adesão intercelular, sendo relatada sua ocorrência em *S. aureus* isolados de mastite bovina (CUCARELLAS et al., 2004).

O gene *bap* está contido em um transposon junto com o gene transposase e três genes codificadores de proteínas de *ATP-binding cassette (ABC) transporter*, podendo estar envolvido direta ou indiretamente na secreção de *bap* (LASA; PENADÉS, 2006). Em *S. aureus*, o gene *bap* está inserido na ilha de patogenicidade móvel estafilocócica *SaPIbov2* (TORMO et al., 2005).

Estudos relataram que estirpes portadoras do gene *bap* foram produtoras de biofilme, mesmo na ausência do operon *icaABCD*, e concluíram que a expressão do gene *bap* é suficiente para ocorrer a formação de biofilme e adesão dos micro-organismos as superfícies (LATASA et al., 2006). De acordo com Cucarellas et al. (2004) o gene *bap* pode facilitar a permanência dos *S. aureus* no interior da glândula mamária, pois estirpes de *S. aureus* *bap* positivas, mesmo com a inativação ou ausência do operon *ica* continuaram a apresentar síntese de biofilme *in vitro*. O gene *bap* tem sido encontrado em algumas espécies de SCN como: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus* e *S. simulans* (TORMO et al., 2005). De acordo com Olson et al. (2002) as infecções intramamárias em bovinos leiteiros estão diretamente ligada à formação de biofilmes bacterianos. *Staphylococcus epidermidis* portadores

do gene *bap* e do operon *ica* podem ser fortes produtores de biofilmes (LASA; PENADÉS, 2006).

Um gene homólogo ao *bap*, o *bhp* (*Bap* homologue protein), tem sido encontrado em *S. epidermidis* isolados de humanos (TORMO et al., 2005). Martins (2013) relatou que de todas as espécies de SCN identificadas, *Staphylococcus simulans*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. devriesei*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. auriculares*, *S. caprae*, *S. arlettae* e *S. hominis* apenas três *S. epidermidis* foram portadores do gene *bhp*.

2.6 - Enterotoxinas e toxina estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas simples de baixo peso molecular (27,5 a 30,0 KDA) e suas cadeias apresentam quantidades consideráveis de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina, sua produção pode ser influenciada pela temperatura, pH e atividade de água (WONG e BERDGOLL 2002; FRANCO e LANDGRAF 2005).

Diversas enterotoxinas são reconhecidas atualmente: SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEM, SEN e SEO (LE LOIR et al., 2003). Porém as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE são consideradas as enterotoxinas clássicas, e existe uma toxina designada de enterotoxinas F, atualmente conhecida como toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), considerada uma proteína com massa molar de 22.000 a 30.000 daltons, essa toxina ganhou notoriedade quando foi detectada no leite de bovinos, ovinos e caprinos portadores de mastite (BEZEK e HULL, 1995; FORSYTHE, 2002; STILES; KRAKAUER 2005; HALE; SWIETNICKI 2006). Os genes das enterotoxinas estafilocócicas ficam organizados na ilha de patogenicidade (SaPI), classificadas como elementos genéticos acessórios e que possuem tamanho entre 15 e 20 Kb, e ficam nos cromossomos de cepas toxigênicas (NOVICK et al., 2001).

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura relata a ocorrência de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e toxina em *S. aureus*. Zafalon et al. (2009) verificaram a ocorrência dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas em *S. aureus* isolados de vacas em lactação, e encontraram 62,5% de

sea, 18,8% de *sec*, 12,5% de *tsst-1* e 6,2% de *seb*. Dias et al. (2011) determinaram a ocorrência de enterotoxinas em *S. aureus* isolados de amostras provenientes de tanque de refrigeração de leite e encontraram, 60,0% de *sea*, 37,9% de *seb* e 6,9% de *sec*. Ferreira et al. (2014) identificaram *S. aureus* no leite de cabras e encontraram somente o gene *sec*. De acordo com Nader Filho et al. (2007), o leite constitui um excelente substrato para a proliferação de *S. aureus* e a temperatura da glândula mamária é ideal para a produção de enterotoxinas.

Segundo Mariano et al. (2007) *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. warneri* e *S. epidermidis*, são produtores das toxinas SEA, SEB, SEC e SED. Martins (2013) identificaram SCN no leite de ovelhas, e 62,5% das espécies identificadas apresentaram pelo menos um gene codificador de enterotoxinas e toxina. František et al. (2014) identificaram apenas uma estirpe *S. epidermidis* portador do gene *sec*, isolados do leite de ovelhas.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Geral

✓ Determinar o perfil clonal de espécies de SCN isolados de ovelhas antes e após o tratamento da mastite subclínica, e relacionar os fatores de virulência e de resistência antimicrobiana com a taxa de cura.

3.2 - Específicos

✓ Verificar a taxa de cura espontânea para a mastite ovina subclínica e as taxas de cura após o uso de antimicrobiano;

✓ Identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos isoladas no pré-parto e pós-parto de ovelhas;

✓ Investigar o gene *mecA* codificador de proteína associada a resistência à meticilina em *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados no leite de ovelhas com mastite subclínica, antes e depois do tratamento;

✓ Investigar a presença dos genes de virulência *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tsst-1* codificadores de proteínas associadas a produção de enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico em *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados no leite de ovelhas com mastite subclínica, antes e após o tratamento;

✓ Investigar a presença dos genes de virulência *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap* e *bhp* codificadores de proteínas associadas a formação de biofilmes em *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados no leite de ovelhas com mastite subclínica, antes e após o tratamento;

✓ Determinar o perfil clonal dos isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos.

✓ Verificar a associação dos casos de cura e de insucesso no tratamento da mastite no período seco das ovelhas, assim como as taxas de cura espontânea, com as estirpes de SCN, presença/ausência do gene *mecA* e dos genes de fatores de virulência relacionados com a formação de biofilmes, produção de enterotoxinas e de toxina em *Staphylococcus* coagulase-negativos;

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Características do rebanho

O trabalho foi realizado em rebanho experimental de 60 ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova, pertencentes ao rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos - SP, no período de junho de 2012 a maio de 2014. Todos os animais foram submetidos ao mesmo sistema de manejo semi-extensivo, mantidos em piquetes de capim coast-cross e *Brachiaria decumbens* e suplementados diariamente com silagem de milho, sal mineral e água, além de ração concentrada no sistema de *flushing* no último mês de gestação, e *creep feeding* para os cordeiros.

O manejo reprodutivo foi realizado por monta natural com reprodutores submetidos a dois exames andrológicos com intervalo de 60 dias, anterior a estação de acasalamento. Todos os animais foram vacinados contra clostridioses 45 e 15 dias antes do parto e, após esse período semestralmente, vinte e um dias antes do período reprodutivo os animais foram examinados para identificar sinais clínicos de verminose e submetidos ao casqueamento preventivo. Os locais onde os animais eram recolhidos para repouso ou se abrigarem da chuva eram limpos constantemente.

Os cordeiros foram desmamados com aproximadamente 100 dias pós-nascimento e as ovelhas foram examinadas periodicamente para diagnóstico da mastite clínica, na época das coletas de leite.

4.2 - Determinação da mastite subclínica infecciosa e avaliação da glândula mamária

As metades mamárias que não apresentavam anormalidades clínicas detectáveis e foram bacteriologicamente positivas, com resultado positivo ao CMT ou CCS $> 2,5 \times 10^5$ células / mL de leite foram consideradas positivas para a mastite subclínica (PENGOV, 2001). Já as metades mamárias que não apresentaram

anormalidades clínicas e foram bacteriologicamente negativas, com escore negativo ao CMT e CCS $< 2,5 \times 10^5$ células/ mL, foram consideradas saudáveis.

4.2.1 - Realização do *California Mastitis Test* (CMT) e contagem de células somáticas (CCS)

As amostras de leite foram submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT) e analisadas depois da mistura de leite de cada metade mamária com o reagente (detergente tensoativo aniônico neutro). Após a homogeneização, os graus de viscosidade foram classificados em: negativo (-), fracamente positivo (1+), positivo (2+) ou fortemente positivo (3+) (SCHALM; NOORLANDER, 1957).

Para determinar a CCS foram coletadas 60 mL de leite de cada metade mamária em frascos plásticos com capacidade de 40 mL, contendo duas pastilhas do conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) e encaminhadas para o laboratório da Clínica do Leite, localizado em Piracicaba, SP, para realizar os procedimentos de contagem de células em aparelho eletrônico, por citometria de fluxo Somacount 300 (Bentley Instruments[®]), calibrado com leite bovino.

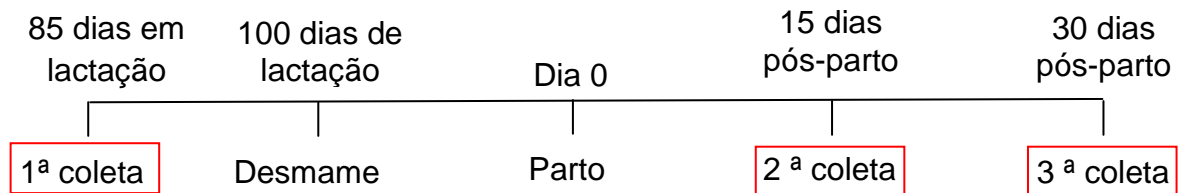
No momento do exame as amostras de leite foram mantidas em banho-maria a 40°C, durante 15 minutos em seguida foram homogeneizadas manualmente, e dispostas no equipamento de forma que a agulha de sucção aspira 3 mL de leite misturando-se com o corante brometo de etídeo para a contagem de células somáticas.

4.3 - Coletas das amostras de leite

As amostras de leite foram coletadas aos 15 dias antes do desmame e no 15° e 30° dia pós-parto (lactação seguinte), posteriormente ao exame físico da metade mamária, à lavagem das mãos do ordenhador com água e sabão, e à antisepsia do orifício dos tetos com algodão umedecido com álcool isopropílico 70%. Coletou-se um volume de aproximadamente 5 mL de leite de cada metade mamária em tubos

de vidro esterilizados que, em seguida, foram acondicionados em caixas isotérmicas e encaminhadas ao laboratório para diagnóstico microbiológico.

A rotina de coleta de leite das ovelhas está descrito no esquema a seguir:



4.4 – Formação dos grupos experimentais

Após a realização dos testes de CMT e CCS os animais foram distribuídos em três grupos experimentais da seguinte maneira:

- a) Grupo 1: grupo controle composto por 21 animais com mastite subclínica sem tratamento antimicrobiano intramamário;
- b) Grupo 2: composto por 19 animais com mastite subclínica em que administrou-se antimicrobiano na concentração de 100 mg de cloxacilina solubilizada em triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico grau farmacêutico, em volume total de 10 mL via intramamária;
- c) Grupo 3: composto por 20 animais com mastite subclínica em que foram administrados 50 mg de cloxacilina em estrutura nanoparticulada, de acordo com a metodologia descrita na patente US2013/0189368A1, em volume de 86 mL via intramamária.

4.5 – Determinação da sensibilidade antimicrobiana

As estirpes isoladas foram submetidas aos testes de sensibilidade “*in vitro*” de acordo com os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2012). Foi utilizado disco impregnado com o seguinte princípio ativo: cefoxitina (CFO 30 µg) para verificar os perfis de resistência dos SCN frente à meticilina, ou seja, todos os animais tratados apresentaram SCN sensíveis ao princípio ativo. As leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a 35°C através da aferição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos.

5 - Elaboração dos antimicrobianos

5.1 - Antimicrobiano nanoencapsulado

O antimicrobiano foi elaborado nos laboratórios da Embrapa Gado Leite, localizada no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, de acordo com a metodologia descrita na patente publicada nº US2013/0189368A1. Os nanocarregadores contendo a cloxacilina benzatina foram confeccionados com os seguintes componentes (% v:v): poli- ϵ -caprolactona (PCL; P42500Da; Sigma, USA) (0,80%); lecitina de soja (0,40%); triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (Labrafac CC) (0,25%); poloxâmero 188 (Pluronic F68) (0,60%); quitosana (Sigma, USA) (0,10%); cloxacilina benzatina estéril (Sigma, USA) (0,25%); e água MilliQ (100%).

Para a preparação das nanocápsulas contendo cloxacilina benzatina, o polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) foi diluído em 23 mL de uma solução de acetona contendo lecitina de soja (Epikuron 170) e labrafac CC. A cloxacilina benzatina foi previamente solubilizada em 7mL de metanol e adicionada a uma solução de acetona. Esta fase permaneceu por ação de calor e de agitação moderada (entre 30 e 45°C) até a dissolução completa dos componentes. Subsequentemente, a solução orgânica foi rediluída em solução aquosa previamente preparada contendo poloxâmero 188 e 10 mg de quitosana de baixo peso molecular solúvel em água, seguido por agitação a uma velocidade moderada a temperatura ambiente por meio de agitador magnético durante 10 minutos. Depois, a suspensão foi levada ao evaporador rotativo, mantendo a temperatura do banho entre 40 e 45°C para a evaporação dos solventes a pressão reduzida. O tamanho e o potencial zeta das nanocápsulas obtidas foram 291nm e +16mV, respectivamente. A eficiência de encapsulação foi de 87%.

As nanopartículas confeccionadas foram compostas por um núcleo oleoso formado por polímero hidrofóbico associado à cloxacilina benzatina e coberto por uma membrana polimérica catiônica dispersa em um meio aquoso externo. A concentração do fármaco foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) durante a validação do método para obtenção da respectiva patente. Após a encapsulação, a solução foi congelada

a -85°C por 24 horas e submetida à secagem por liofilização. O soluto foi resuspendido em água MilliQ para concentração final de 50 mg de cloxacilina benzatina 86 mL de solução, baseando-se no volume de aplicação de menor diluição possível do fármaco, que não favorecesse aglutinações macroscópicas e que fosse suportado pelos limites físicos da metade mamária ovina. A dose a ser aplicada foi acondicionada em duas seringas plásticas estéreis com êmbolo plástico de volume de 60 mL.

5.2 - Antimicrobiano convencional (Forma livre)

O antimicrobiano convencional foi elaborado nos laboratórios da Embrapa Pecuária Sudeste, por meio da solubilização de 100 mg de cloxacilina benzatina estéril em triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico grau farmacêutico, em volume total de 10 mL e acondicionado em seringas plásticas estéreis.

6 - Administração dos antimicrobianos (Intramamária)

A administração dos antimicrobianos intramamários foi realizada após esgota manual completa do úbere e antissepsia com álcool isopropílico 70% dos esfíncteres dos tetos, procedimentos realizados três dias após o desmame dos cordeiros. Tendo em vista que não existem cânulas apropriadas para infusão de medicamentos intramamários na espécie ovina, seguiu-se o método descrito por Mavrogianni et al. (2007), utilizando a estrutura flexível de um cateter intravenoso tamanho n° 20 (1,1 mm calibre x 48 mm comprimento) estéril para cada tratamento intramamário, adentrando meio centímetro no canal do teto.

Após a infusão do antimicrobiano foi realizada massagem nas metades mamárias para obter uma distribuição homogênea do medicamento. Foram realizados exames clínicos das metades mamárias através de palpação e inspeção antes, durante, uma e 24 horas após a administração do medicamento. Todos os animais que participaram do experimento permaneceram juntos e foram submetidos ao mesmo manejo semi-intensivo.

7 - Determinação da cura microbiológica

As metades mamárias das ovelhas dos grupos experimentais foram consideradas “curadas” quando não apresentaram isolamento das espécies que estavam presentes antes do tratamento, enquanto as ovelhas “não curadas” apresentaram isolamento do mesmo patógeno identificado antes do tratamento. Também foram consideradas “não curadas” as ovelhas “reinfectadas”, ou seja, aquelas que apresentaram isolamento de espécies diferentes das isoladas antes da secagem ou quando surgiu metade mamária infectada que anteriormente era não infectada. (EUROPEAN COMMISSION, 2010). Os animais que apresentaram mastite clínica durante o experimento foram retirados do experimento.

A confirmação da cura microbiológica foi feita após as coletas de leite com intervalo médio de 15 dias, ou seja, 15 e 30 dias pós-parto. Em conjunto com os resultados obtidos nos testes microbiológicos, foram consideradas curadas as metades mamárias que apresentaram resultados negativos ao CMT e CCS < 2,5 x 10⁵ células / mL / leite.

8 - Análises laboratoriais

8.1 - Diagnóstico microbiológico

Alíquotas de 10 µL de leite foram semeadas em ágar-sangue ovino desfibrinado a 5%, incubadas a 37°C por até 72 horas, com leituras a cada 24 horas (Figura 1). A identificação estafilocócica foi realizada de acordo com Krieg e Holt (1994). *Staphylococcus* spp. foram submetidos à prova da coagulase lenta em plasma de coelho, com leituras realizadas uma, duas, três, quatro e 24 horas após a incubação das amostras a 37°C (GARCIA et al., 1980). Testes de oxidase e a prova de resistência à furazolidona (FRZ-100 µg) foram usados para diferenciar SCN (sensível - halos ≥ 15 mm) de *Micrococcus* spp. (resistente - halos ≤ 14 mm) (BAKER, 1984).

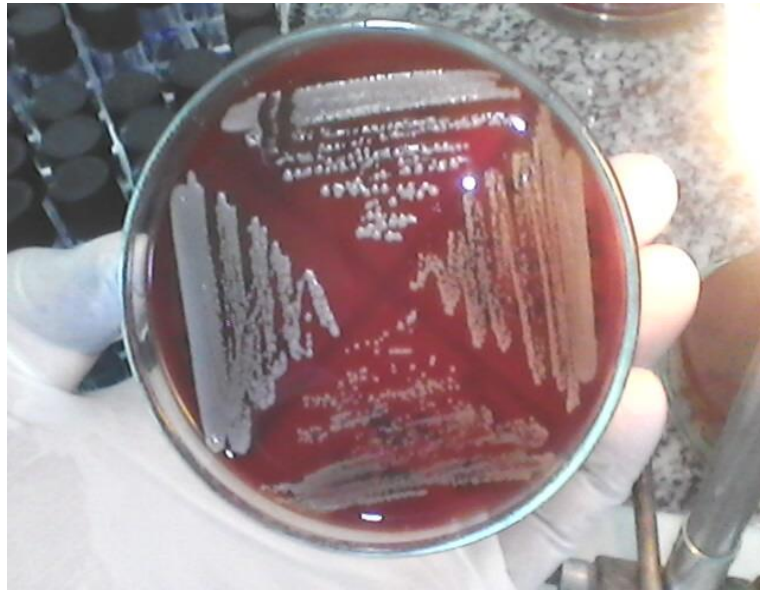


Figura 1. Placa de ágar sangue ovino desfibrinado a 5% com crescimento bacteriano, sugestivo de *Staphylococcus* spp.

8.2 - Identificação fenotípica dos *Staphylococcus* coagulase-negativos

A identificação fenotípica das espécies de SCN seguiu o esquema proposto por Kloss e Schleifer (1975), por meio do uso de provas bioquímicas com os açúcares xilose, arabinose, sacarose, trealose, manitol, maltose, lactose, xilitol, ribose e frutose, além da caracterização de hemolisinas e prova de redução de nitrato.

As análises laboratoriais descritas até aqui foram realizadas no Laboratório da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos – SP.

8.3 - Análises genotípicas

8.3.1 - *Internal Transcribed Spacer* (ITS) - PCR

A caracterização genotípica das espécies de SCN foi realizada usando *primers* de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23S pela técnica *Internal Transcribed Spacer* PCR (ITS-PCR) descrita por Couto et al. (2001), usando os *primers* G1 “GAAGTCGTAACAAGG” 16S e L1 “CAAGGCATCCACCGT” 23S. A

eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em agarose metaphor 3% preparada em tampão 1,0 X TBE e corado com Saber Safe.

8.3.2 - Detecção da presença de genes relacionados com a resistência à oxacilina, produção de biofilme, enterotoxinas e toxina.

8.3.2.1 - Extração do DNA

Com a finalidade de investigar genes relacionados com a resistência antimicrobiana e com fatores de virulência, o ácido nucléico total foi extraído a partir das amostras de *Staphylococcus* spp., cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. A extração foi realizada com o Kit Illustra[®] (GE Heatchare) que consiste na digestão inicial das células de *Staphylococcus* spp. com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir, 500 µL de solução de lise foram adicionados à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por um minuto. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 11.000 x g por um minuto. A parte líquida foi descartada e 500 µL de solução de lise foram novamente adicionados à coluna. Após a centrifugação a 11.000 x g por um minuto e descarte da parte líquida, 500 µL da solução de lavagem foram adicionados à coluna que foi submetida à centrifugação a 11.000 x g por três minutos. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C que foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por um minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

8.3.2.2 - Amplificação do DNA para detecção de genes codificadores de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* coagulase-negativos.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 20 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de MgCl₂, e 3 µL de DNA. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, utilizando os *primers*

mecA (AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG) e *mecA2* (AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG) – 533 (pb), empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991): 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriarem a 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional: controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

8.3.2.3 - Amplificação do DNA para detecção de genes codificadores de biofilmes em *Staphylococcus coagulase-negativos*.

Por meio de reações de PCR foram efetuadas as amplificações dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes de 25 µL contendo 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3µL de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador tipo Mj Research empregando os parâmetros descritos por Arciola et al. (2005), que consistem de: 94°C por cinco minutos para o primeiro ciclo, seguido por 50 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por trinta segundos. Após completar os 50 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por um minuto antes de resfriarem a 4°C. Em todas as reações realizadas, foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* (ATCC 35985) produtora de biofilme e um controle negativo *S. epidermidis* (ATCC 12228).

Para amplificação do gene *bap* foram utilizados 100 pmol de *primers* (Tabela 1), 200 µM dNTPs, Buffer 1X, 1mM MgCl₂, 1U de Taq polimerase, 100 ng de DNA, onde foram empregadas as seguintes condições de amplificação descritas por Cucarellas et al. (2004): desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 42°C durante 20 segundos, e 72°C por 50 segundos, com uma etapa final a 72°C por cinco minutos. Foi utilizada como controle a cepa ATCC

25923. Para amplificação do gene *bhp* foram utilizados 20 pmol de cada *primer* (Tabela 1), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de MgCl₂, e 3 µL de DNA, sendo as condições de amplificação utilizadas descritas por Qin et al. (2007): aquecimento a 94°C por cinco minutos, 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 90 segundos.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de proteínas responsáveis pela produção biofilmes em linhagens de *Staphylococcus* isoladas de leite ovino.

Genes	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Produto amplificado (pb)
<i>icaA</i>	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC	103
<i>icaC</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	400
<i>icaD</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGCAA	198
<i>Bap</i>	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	1919
<i>Bhp</i>	ATGAAAATAAACAAGGATTTTC GCCTAAGCTAGATAATGTTTG	1300

Fonte: Arciola et al., 2005; Cucarellas et al., 2004; Qin et al., 2007.

8.3.2.4 - Amplificação do DNA para detecção de genes codificadores de enterotoxinas e toxina em *Staphylococcus coagulase-negativos*

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrifuga de 0,5 mL, em volumes totais de 25 µL, contendo 20 pmol de cada *primer* (Tabela 2), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de MgCl₂, e 3 µL de DNA. Em todas as reações que foram realizadas foi utilizado um controle negativo, substituindo-se DNA por água. A amplificação foi realizada em

termociclador MJ Research PTC-100 como descrito por Johnson et al. (1991) com modificações propostas por Cunha et al. (2006), que consistem em: um primeiro ciclo a 94°C por quatro minutos, desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento dos *primers* a 55°C e extensão a 72°C por um minuto, anelamento a 53°C e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de anelamento foi reduzida para 51°C, seguido por mais 37 ciclos com estes mesmos parâmetros. Após os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por mais 7 minutos e posteriormente resfriados a 4°C.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de proteínas responsáveis pela produção de enterotoxinas e toxina em linhagens de *Staphylococcus* isoladas de leite ovino utilizando PCR.

Gene	Seqüência de oligonucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado (pb)
<i>sea</i>	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120
	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	
<i>seb</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	478
	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	
<i>sec</i>	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257
	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
<i>sed</i>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317
	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	
<i>tsst-1</i>	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA	350
	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	

Fonte: Johnson et al., 1991.

8.3.2.5 - Eletroforese em gel de agarose

Para a separação do DNA amplificado, os géis de agarose foram preparados em concentração de 2,0% em TBE 1X, corados com SYBER SAFE DNA Gel Stain® (Invitrogen) e visualizados em transluminador de luz UV. As reações de PCR que

apresentaram fragmentos amplificados maiores que 1000 pb foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

8.3.2.6 - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O PFGE foi realizado com as espécies de SCN de maior ocorrência, e que foram encontradas na mesma metade mamária durante o pré-tratamento, 15 e/ou 30 dias pós-parto. As análises foram realizadas segundo o protocolo modificado de McDougal et al. (2003), a fim de identificar as linhagens bacterianas, e o perfil clonal dos microrganismos similaridade $\geq 80\%$. As amostras foram colocadas em caldo BHI onde cresceram por 24 horas. Em um microtubo previamente pesado, 0,5 mL da amostra crescida foi centrifugada a 12.000 rpm por 50 segundos. Depois de desprezado o sobrenadante, o microtubo foi novamente pesado e foram adicionados 300 μ L de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) mais a diferença entre o peso final e inicial em mL. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos a 37°C. Após a homogeneização, foram adicionados 5 μ L de Lisostafina (1mg/mL em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300 μ L de *agarose low melt*. As amostras foram vertidas nos moldes para pluges até que solidificassem e, então colocadas em 2mL de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio), 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas a 37°C por pelo menos 4 horas. A solução foi retirada e os pluges foram lavados com 2mL de TE quatro vezes a temperatura ambiente por meia hora. A restrição do DNA genômico foi feita com metade de um plugue, utilizando-se a enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*[®], Fermentas Life Science, Canadá) em 50 μ L de tampão de restrição. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System[®] (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) feito com TBE 0,5X sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40 segundos por 21 horas; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5X TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker[®] (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed[®] (10.000X em água, Biotium, EUA) por 45 minutos, e fotografado sob transluminação UV.

Todas as análises genotípicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

9 - Análises Estatísticas

Efetou-se a confrontação das distribuições de frequência dos casos de mastite subclínica por meio do Teste do Qui-quadrado. Os valores significativos que estiveram próximos aos de referência de significância foram ajustados, de acordo com a correção de continuidade de Yates ($P=0,05$) (SAMPAIO, 1998), e foram realizados no programa Bioestat versão 5.3.

Para determinar a similaridade das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos calcularam-se os coeficientes de correlação de Dice, com a criação dos dendogramas pelo método UPGMA (Unweighted pair group method arithmetic averages), por meio do software BioNumerics® (versão 6.1; Applied Maths, Bélgica).

O teste do Qui-quadrado também foi realizado no programa Statistical Analysis System (SAS, 2010) para verificar a associação entre todas as variáveis estudadas: espécies de SCN identificadas, presença dos genes *mecA*, *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap*, *bhp*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tsst-1*, em relação aos grupos controle, tratados com cloxacilina benzatina 100 mg e cloxacilina 50 mg em estrutura nanoparticulada. Para determinar as relações conjuntas entre as variáveis estudadas, realizou-se a análise de correspondência múltipla (ACM), no programa STATISTICA versão 7.0 (STATSFT, 2004; GREENACRE, 2008).

10 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 – Ocorrências dos SCN e presença/ausência de cura

Na Tabela 3 é visualizada a distribuição das ovelhas nos grupos experimentais antes da desmama, ou seja, antes do tratamento, como também aos 15 e 30 dias pós-parto da lactação consecutiva.

Tabela 3. Distribuição das ovelhas com mastite subclínica por SCN em diferentes grupos de acordo com a efetivação ou não do tratamento, antes da desmama, aos 15 e 30 dias pós-parto.

Período	Grupo							
	G1		G2		G3		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Antes da desmama	21	35,0	19	31,7	20	33,3	60	100,0
15 dias pós-parto	16 ^a	44,4	13 ^a	36,1	7 ^b	19,5	36	100,0
30 dias pós-parto	15 ^a	44,1	11 ^a	32,3	8 ^a	23,6	34	100,0

G1: Grupo de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina). Valores com letras diferentes na mesma linha: P < 0,05. N: número de animais.

Todos os animais apresentaram mastite subclínica em pelo menos uma das metades mamárias, enquanto as outras podiam estar sadias. Veríssimo et al. (2010) relataram ocorrência de 64,3% de SCN em amostras de leite provenientes de ovelhas Santa Inês, ocorrência semelhante à relatada por Pereira et al. (2014). A elevada ocorrência destes agentes também foi verificada por diversos autores (ZAFALON et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; SANTANA et al., 2014). SCN também podem ser isolados em animais portadores de mastite clínica (LUCHEIS et al., 2010). Estes micro-organismos são considerados colonizadores da pele do teto, ou seja, qualquer falha no manejo dos animais pode facilitar a penetração na glândula mamária, desencadear mastite, alterar os componentes do leite como, aumentar o pH, aumentar os teores de soro-proteínas, baixar as concentrações de imunoglobulinas atrasando o ganho de peso, e aumentar a mortalidade dos

cordeiros (LAFFRANCHI et al., 2001; LEITNER et al., 2008; VERÍSSIMO et al., 2010).

As ovelhas do grupo controle, não apresentaram redução significativa nos casos de mastite subclínica no pós-parto em relação ao pré-tratamento, ou seja, os mecanismos de defesa da glândula mamária não eliminaram os SCN durante o período seco. A administração de antimicrobiano convencional não eliminou a nível significativo os SCN no pós-parto, ou seja, os SCN podem desencadear mastite nas ovelhas durante a lactação, resultados que podem estar relacionados a inexistência de antimastíticos específicos para pequenos ruminantes, restando na prática a utilização de produtos específicos para bovinos.

Mello et al. (2008) aplicaram enrofloxacin, via intramuscular no momento da secagem de ovelhas Santa Inês, e verificaram que o tratamento reduziu significativamente os sinais clínicos da doença. Coutinho et al. (2014) aplicaram antimicrobiano cefalônio anidro, via intramamária em ovelhas Santa Inês no momento da secagem e verificaram que aos 20-25 e 40-45 dias de lactação, o número de metades mamárias com mastite foi menor em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que o antimicrobiano utilizado mostrou-se eficiente na terapia/profilaxia da mastite em ovelhas Santa Inês. A diferença dos resultados encontrados pelos autores com o presente estudo pode estar relacionada ao princípio ativo dos antimicrobianos utilizados.

Uma das maneiras ideais de evitar fibrose intralveolar e até mesmo a perda da função secretória de leite é o tratamento da mastite subclínica no final da lactação, no momento da secagem. As ovelhas com mastite subclínica no momento do desmame dos cordeiros, tratadas com antimicrobiano nanoparticulado apresentaram maior ocorrência de cura quando comparadas com as ovelhas não tratadas (G1) ($P=0,0192$), provavelmente devido ao mecanismo de ação do antimicrobiano nanoparticulado administrado durante a secagem das ovelhas.

As nanopartículas direcionam os antimicrobianos para os agentes infecciosos, até mesmo no interior das células fagocitárias, mesmo quando em menor concentração, facilitando sua ação, além de diminuir o número de estirpes multirresistentes (BRANDÃO et al., 2011; UNDERWOOD & EPS, 2012; TRONCARELLI et al., 2013).

De acordo com Troncareli et al. (2013) existem poucos relatos da utilização de nanoestruturas nas áreas de produção e sanidade animal. Lecároz et al. (2006) estudaram o efeito *in vitro* da gentamicina nanoparticulada e relataram a eficiência do antimicrobiano ao ser melhor direcionado para o sítio de ação da *Brucella melitensis* no interior das células fagocitárias.

A utilização do antimicrobiano cloxacilina benzatina nanoparticulado tem se mostrado eficiente no tratamento da mastite subclínica em ovelhas. Santana et al. (2014) realizou a aplicação de cloxacilina benzatina nanoparticulada durante a secagem de ovelhas com mastite subclínica e verificaram redução significativa no número de animais portadores de mastite subclínica durante o pós-parto.

Três micro-organismos isolados antes da desmama em ovelhas tratadas com antimicrobiano convencional (G2) não foram recuperados após a estocagem sob congelamento, o que impossibilitou análises posteriores para identificação da espécie.

10.2 – Resultados fenotípicos para identificar as espécies de SCN

Dentre as espécies de SCN identificadas *Staphylococcus xylosus* foi a espécie de maior ocorrência nos três grupos experimentais durante o pré-tratamento. Resultado semelhante ao encontrado por Radostits et al. (2002), cujos achados demonstraram que *S. xylosus* é a espécie mais frequentemente isolada a partir de casos de mastite subclínica em ovelhas.

Agnol et al. (2013) coletaram amostras de leite de ovelhas e encontraram *S. epidermidis* e *S. simulans* como micro-organismos de maior ocorrência, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, e que mostram a importância dos SCN na etiologia da mastite subclínica em ovelhas.

A Tabela 4 apresenta as espécies de SCN isoladas no pré-tratamento, distribuídas nos três grupos experimentais, após a identificação por meio dos testes bioquímicos.

Tabela 4. Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos isoladas das ovelhas com mastite subclínica durante o pré-tratamento, identificadas por meio dos testes bioquímicos.

Espécie de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	Grupo Experimental					
	G1		G2		G3	
	Pré-tratamento					
	N	%	N	%	N	%
<i>S. xylosus</i>	6	28,6	6	37,5	3	15,0
<i>S. warneri</i>	4	19,0	2	12,5	1	5,0
<i>S. cohnii</i>	2	9,5	1	6,3	--	--
<i>S. simulans</i>	1	4,8	--	--	3	15,0
<i>S. hominis</i>	1	4,8	--	--	2	10,0
<i>S. epidermidis</i>	1	4,8	--	--	--	--
<i>S. saprophyticus</i>	--	--	1	6,3	--	--
<i>S. capitis</i>	--	--	--	--	--	--
Não identificado*	6	28,6	6	37,5	11	55,0
Total	21	100,0	16	100,0	20	100,0

G1: Grupo controle, G2: Infusão de antimicrobiano convencional e G3: infusão de antimicrobiano nanoencapsulado.

* Espécies não identificadas por meio dos testes bioquímicos.

N: número de animais.

Dentre as espécies de SCN identificadas *Staphylococcus xylosus* foi a espécie de maior ocorrência aos 15 e 30 dias pós-parto em G1 e G2. Em G3, aos 15 dias pós-parto identificou-se somente *S. xylosus*, enquanto aos 30 dias pós-parto *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. hominis* e *S. saprophyticus* apresentaram a mesma frequência de isolamento.

Por meio dos testes bioquímicos não foi possível identificar todas as espécies de SCN antes do tratamento, 15 e 30 dias pós-parto. De acordo com Onni et al. (2010), a padronização de um método genotípico para a identificação de SCN isoladas a partir de metades mamárias de ovelhas é essencial para se evitar discrepâncias entre métodos de identificação, o que pode ser observado entre as espécies de SCN identificadas fenotipicamente e genotipicamente.

As infecções causadas pelos SCN vêm aumentando com o passar do tempo, fato este que levou os profissionais a estudarem as espécies existentes, pois estas são responsáveis por diversas patologias em animais, inclusive a mastite.

Os resultados fenotípicos das espécies de SCN identificadas aos 15 e 30 dias pós-parto estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos isoladas de ovelhas com mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto, identificadas por testes bioquímicos.

Espécie de <i>Staphylococcus</i> coagulase- negativos	Grupo Experimental											
	G1				G2				G3			
	15 dias pós- parto		30 dias pós- parto		15 dias pós- parto		30 dias pós- parto		15 dias pós- parto		30 dias pós- parto	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. xylosus</i>	8	50,0	6	40,0	3	23,1	2	18,2	4	57,1	1	12,5
<i>S. warneri</i>	2	12,5	3	20,0	1	7,7	1	9,1	--	--	--	--
<i>S. simulans</i>	1	6,3	3	20,0	1	7,7	1	9,1	--	--	--	--
<i>S. cohnii</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	12,5
<i>S. hominis</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	12,5
<i>S. saprophyticus</i>	--	--	--	--	--	--	1	9,1	--	--	1	12,5
<i>S. capitis</i>	--	--	--	--	--	--	1	9,1	--	--	--	--
Não identificado*	5	31,3	3	20,0	8	61,5	5	45,5	3	42,9	4	50,0
Total	16	100,0	15	100,0	13	100,0	11	100,0	7	100,0	8	100,0

G1: Grupo controle, G2: Infusão de antimicrobiano convencional e G3: infusão de antimicrobiano nanoencapsulado.

* Espécies não identificadas por meio dos testes bioquímicos.

N: número de animais.

10.3 – *Internal Transcribed Spacer* (ITS - PCR) para identificar as espécies de SCN

A Tabela 6 apresenta as espécies de SCN identificadas antes da desmama em ovelhas com mastite subclínica, distribuídas nos três grupos experimentais, identificadas por meio do teste genotípico Figura 2.

Tabela 6. Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos identificadas antes da desmama em ovelhas com mastite subclínica distribuídas em três grupos experimentais.

Espécie <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	Grupo Experimental					
	G1		G2		G3	
	N	%	N	%	N	%
<i>S. warneri</i>	8	38,1	2	12,5	5	25,0
<i>S. simulans</i>	5	23,8	5	31,3	4	20,0
<i>S. xylosus</i>	4	19,0	2	12,5	2	10,0
<i>S. epidermidis</i>	2	9,5	3	18,8	4	20,0
<i>S. lentus</i>	1	4,8	---	---	---	---
<i>S. caprae</i>	1	4,8	---	---	---	---
<i>S. haemolyticus</i>	---	---	2	12,5	---	---
<i>S. hominis</i>	---	---	---	---	1	5,0
<i>S. cohnii</i>	---	---	---	---	1	5,0
<i>S. capitis</i>	---	---	---	---	1	5,0
<i>S. chromogenes</i>	---	---	2	12,5	1	5,0
<i>S. auriculares</i>	---	---	---	---	1	5,0
Total	21	100,0	16	100,0	20	100,0

G1: Grupo controle, composto de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina). N: número de animais.

Antes da desmama, *S. warneri* prevaleceram em G1 e G3. Em G2, *S. simulans* apresentaram maior ocorrência, seguidos por *S. epidermidis*. As espécies de maior ocorrência no leite de ovelhas com mastite subclínica antes do tratamento, à secagem estão em consonância com as isoladas por outros autores, também em casos subclínicos (MARTINS, 2013; PILON et al., 2014).

Staphylococcus coagulase-negativos foram isolados do leite de pequenos ruminantes em vários países. Ariznabarreta et al. (2002) coletaram amostras de leite de pequenos ruminantes pertencentes a rebanhos da Espanha e identificaram *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, e *S. epidermidis*. Moroni et al. (2007) coletaram amostras de leite de pequenos ruminantes na Itália e identificaram *S. epidermidis*. Pilipčinová et al. (2010) identificaram *S. epidermidis*, *S. hominis*, s.

chromogenes, *S. xylosus*, *S. warneri* e *S. capitis* como as espécies de SCN isoladas do leite de ovelhas da Eslováquia. As espécies identificadas pelos autores condizem com as identificadas no presente estudo, mostrando que os resultados são os principais micro-organismos causadores de mastite em pequenos ruminantes.

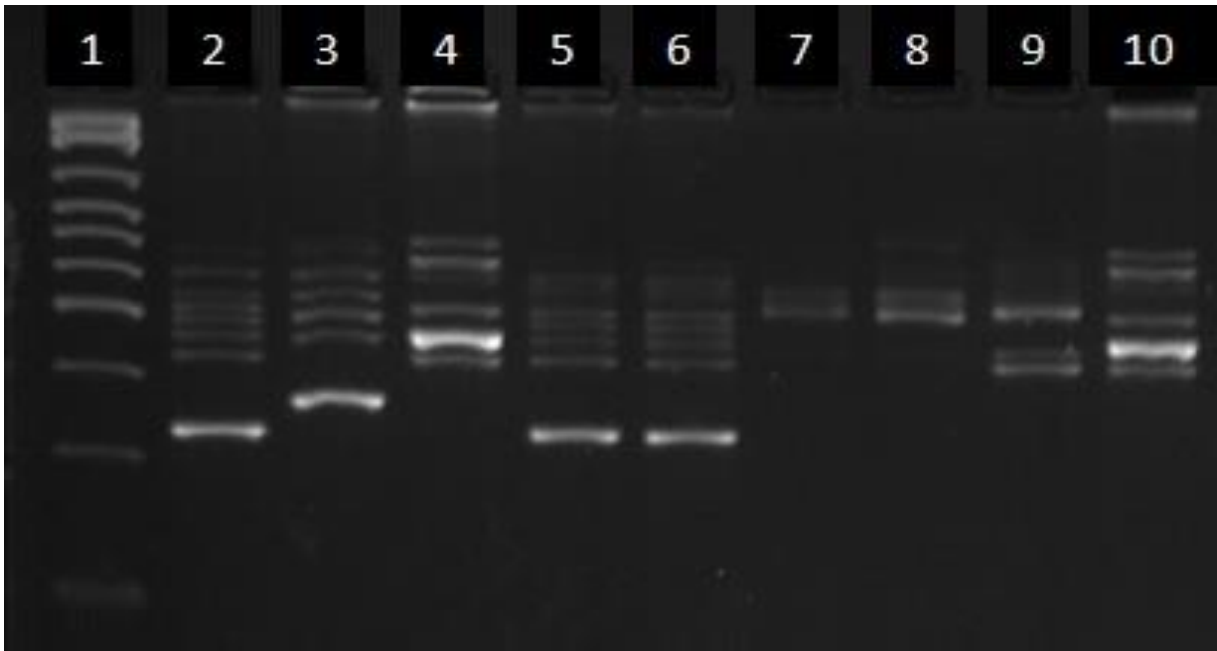


Figura 2. Produto de *Internal Transcribed Spacer* (ITS - PCR) em gel de agarose metaphor 2% para identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos. Legenda: 1 - DNA Ladder; 2 – Controle positivo (ATCC – *Staphylococcus simulans*); 3 / 4 / 7 / 8 / 9 / 10: Outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos; 5 / 6: *Staphylococcus simulans*.

A Tabela 7 apresenta as espécies de SCN identificadas nas ovelhas aos 15 e 30 dias pós-parto, e identificadas por meio do teste genotípico.

Aos 15 e 30 dias pós-parto *S. warneri* permaneceu como a espécie de maior ocorrência em G1 e G3, neste último mesmo após o tratamento no final da lactação anterior. Em G2 aos 15 dias pós-parto, *S. simulans* foi a espécie de maior ocorrência, assim como antes do tratamento.

Staphylococcus coagulase-negativos representam o maior componente da microbiota cutânea e por viverem em equilíbrio com esse ecossistema foram descritos como micro-organismos avirulentos. Durante a última década, houve um progresso na identificação de gênero, espécies e subespécies de patógenos, permitindo aos clínicos identificarem as variedades de SCN presentes em amostras

clínicas e os implicaram como agentes etiológicos de uma séria de processos infecciosos, sendo considerado um dos principais patógenos isolados de metades mamárias de animais portadores de mastite (BONNA et al., 2007; PARADIS et al., 2010).

Tabela 7. Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos identificadas de ovelhas tratadas e não tratadas aos 15 e 30 dias pós-parto após o tratamento contra a mastite antes da desmama.

Espécie	Grupo experimental											
	G1				G2				G3			
	15 dias		30 dias		15 dias		30 dias		15 dias		30 dias	
	pós-parto		pós-parto		pós-parto		pós-parto		pós-parto		pós-parto	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. warneri</i>	4	25,0	6	40,0	1	7,7	2	18,2	2	28,6	4	50,0
<i>S. xylosus</i>	3	18,8	1	6,7	-	-	1	9,1	1	14,3	-	-
<i>S. epidermidis</i>	2	12,5	1	6,7	2	15,4	-	-	1	14,3	-	-
<i>S. cohnii</i>	1	6,3	1	6,7	1	7,7	1	9,1	-	-	1	12,5
<i>S. haemolyticus</i>	2	12,5	1	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. simulans</i>	1	6,3	2	13,0	4	30,8	1	9,1	-	-	1	12,5
<i>S. hominis</i>	1	6,3	2	13,0	-	-	-	-	1	14,3	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	1	6,3	-	-	-	-	-	-	1	14,3	-	-
<i>S. capitis</i>	1	6,3	1	6,7	1	7,7	2	18,2	-	-	-	-
<i>S. lentus</i>	-	-	-	-	1	7,7	1	9,1	-	-	-	-
<i>S. caprae</i>	-	-	-	-	1	7,7	1	9,1	-	-	-	-
<i>S. schleiferi schleiferi</i>	-	-	-	-	1	7,7	-	-	1	14,3	-	-
<i>S. sciuri sciuri</i>	-	-	-	-	1	7,7	-	-	-	-	1	12,5
<i>S. cohnii cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	1	9,1	-	-	-	-
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	-	-	-	1	9,1	-	-	1	12,5
Total	16	100	15	100	13	100	11	100	7	100	8	100

G1: Grupo controle, composto de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: Ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina).

N: número de animais.

O isolamento de SCN não está restrito apenas a bovinos ou ovinos. Laffranchi et al. (2001) coletaram amostras de leite durante o pós-parto de vacas primíparas e verificaram maior ocorrência de SCN. Os autores observaram que as infecções persistiram e, ao mesmo tempo, ocorreram novas infecções ao longo de todo o experimento, e verificaram que existe uma tendência dos SCN persistirem na glândula mamária, independente do período da infecção. Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, pois foram isoladas diversas espécies de SCN aos 15 e 30 dias pós-parto, mostrando que esses micro-organismos estão cada vez mais presentes na glândula mamária dos animais, desencadeando mastite.

10.4 – Detecção dos genes de virulência

10.4.1 – Gene *mecA* responsável pela resistência à oxacilina

Nenhuma das espécies de SCN identificadas apresentou o gene *mecA*, relacionado com a resistência à oxacilina, conforme mostra a Figura 3, o que condiz com relatos de outros autores. França et al. (2012) coletaram amostras de leite de ovelhas com mastite, e não encontraram nenhuma estirpes de SCN portadora do gene *mecA*. Silva et al. (2012) não encontraram o gene *mecA* em nenhuma estirpe de SCN isolada do leite de ovelhas sadias e com mastite subclínica. De acordo com Omni et al. (2010), espécies de SCN isoladas de ovelhas, e resistentes à oxacilina são incomuns na medicina veterinária, relatos que condizem com os resultados encontrados no presente estudo.

Alguns princípios podem justificar o 100% de ausência do gene *mecA* como, por exemplo, mecanismos de resistência à oxacilina distintos, não relacionados com a expressão do *mecA* podem estar presentes (ZAFALON et al., 2012). A presença de genes *mecA* homólogos ou outras classes de *Penicillin-binding proteins* pode estar relacionada aos mecanismos de resistência à oxacilina (MENDONÇA et al., 2012).

As ovelhas utilizadas no presente estudo não são destinadas exclusivamente a produção de leite, o que as tornam menos susceptíveis aos micro-organismos

causadores de mastite, o que leva ao uso menos frequente de antimicrobianos, e conseqüentemente menor resistência.



Figura 3. Produto de PCR em gel de agarose metáfora 2% para identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos portadoras do gene *mecA*. Legenda: 1 - DNA Ladder; 2 – Controle positivo (ATCC – controle positivo); 3 - Controle negativo (ATCC – controle negativo); 4 / 5 / 6 / 7 / 8 / 9 / 10 / 11 / 12 – amostras negativas para o gene *mecA*.

10.4.2 – Genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tsst-1*, responsáveis pela produção de enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico

Na Tabela 8 consta a distribuição do gene *sec* em espécies de SCN antes do tratamento, assim como aos 15 e 30 dias pós-parto. Dentre os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tsst-1*, o *sec* foi o único identificado, conforme mostra a Figura 4.

A não comprovação dos demais genes codificadores de proteínas associados a produção de enterotoxinas pode estar relacionada ao fato das amostras serem provenientes de ovelhas com mastite subclínica. Segundo Bezek & Hull (1995), os micro-organismos isolados de animais portadores de mastite clínica apresentam com maior capacidade de virulência, quando comparados com micro-organismos isolados de quadros de mastite subclínica, quando estudada na espécie caprina.

Salienta-se, entretanto, que não foram encontrados trabalhos que justificassem essa analogia entre ovelhas e cabras.

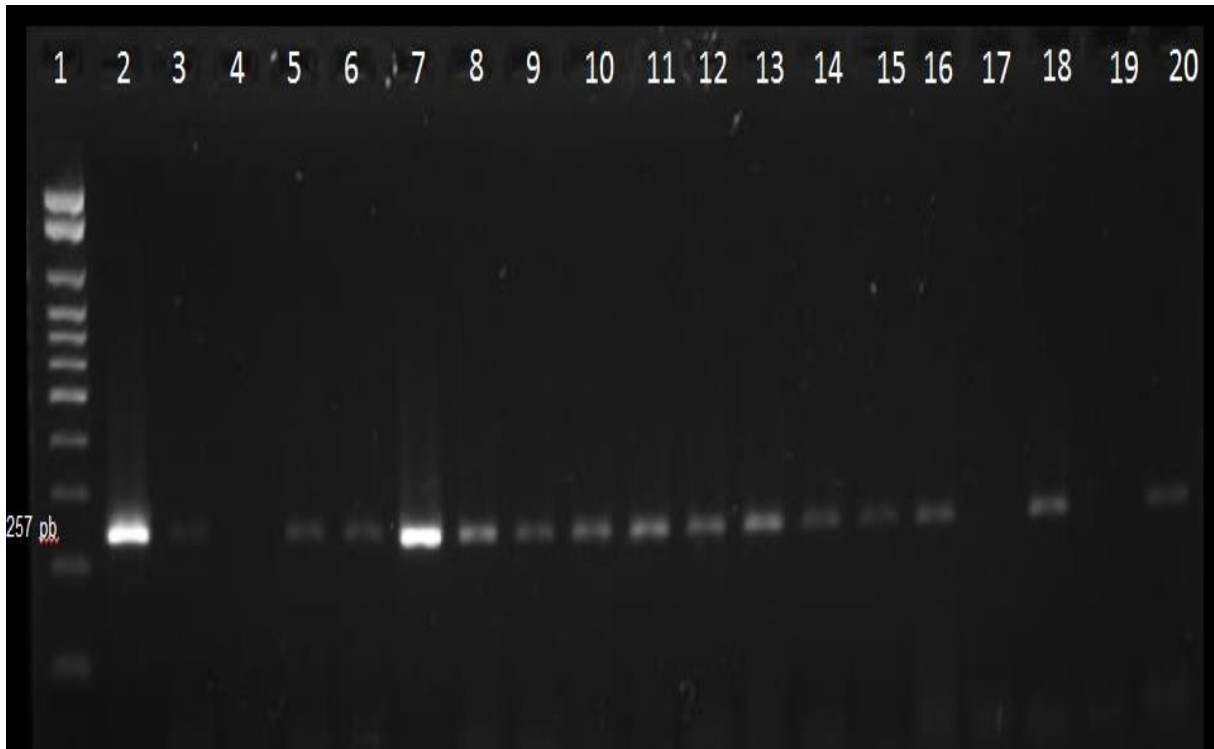


Figura 4. Produto de PCR em gel de agarose metaphor 2% para identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas portadoras do gene *sec*. Legenda: 1 - DNA Ladder; 2 – Controle positivo (ATCC – controle positivo); 4 Controle negativo (ATCC – controle negativo); 3 até 16 / 18 / 20 – amostras positivas para o gene *sec*; 17 e 19 - amostras negativas para o gene *sec*.

Na literatura não há relatos relacionando estirpes de SCN com genes responsáveis pela produção de enterotoxinas ou toxina da síndrome do choque tóxico com taxas de cura da mastite em ovelhas, mas sim com os riscos a saúde pública devido ao consumo de leite contaminado com micro-organismos produtores de enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico (NADER FILHO et al., 2007; MARIANO et al., 2007).

Tabela 8. Distribuição do gene *sec* em *Staphylococcus* coagulase-negativos identificados na desmama, ou seja, pré-tratamento, e aos 15 e 30 dias pós-parto da lactação seguinte.

Espécie	<i>sec</i>					
	G1		G2		G3	
	N	%	N	%	N	%
Pré-tratamento						
<i>S. warneri</i>	6	60,0	-	-	1	33,3
<i>S. simulans</i>	3	30,0	1	50,0	-	-
<i>S. xylosus</i>	1	10,0	-	-	1	33,3
<i>S. epidermidis</i>	-	-	1	50,0	-	-
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	-	1	33,3
15 dias pós-parto						
<i>S. warneri</i>	2	100,0	-	-	1	50,0
<i>S. simulans</i>	-	-	1	100,0	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	1	50,0
30 dias pós-parto						
<i>S. warneri</i>	2	50,0	1	25,0	4	57,1
<i>S. epidermidis</i>	1	25,0	-	-	1	14,3
<i>S. simulans</i>	1	25,0	-	-	1	14,3
<i>S. cohnii cohnii</i>	-	-	1	25,0	-	-
<i>S. lentus</i>	-	-	1	25,0	-	-
<i>S. xylosus</i>	-	-	1	25,0	-	-
<i>S. sciuri sciuri</i>	-	-	-	-	1	14,3

G1: Grupo controle, composto de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina).

N: número de animais.

sec gene codificador de proteína responsável pela produção de enterotoxina C.

10.4.3 – Genes *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap* e *bhp* responsáveis pela produção de biofilme.

Na Tabela 9 são apresentadas as distribuições dos genes codificadores de proteínas associados a formação de biofilme *icaC*, *icaD* e *bap* dentre as espécies de SCN identificadas nas amostras de leite coletadas na desmama, conforme mostra a Figura 5.

A produção de biofilmes pode colaborar com a manutenção de SCN no interior da glândula mamária. Ela pode ser codificada pelos genes *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap* e *bhp*. Todas as espécies de SCN estudadas foram negativas para os genes *icaA* e *bhp*. Entretanto, o gene *icaC* estava presente em SCN isolados em ovelhas de G1 e G3, enquanto o gene *icaD* e *bap* foram encontrados em SCN isolados de ovelhas distribuídas nos três grupos. Segundo Arciola et al. (2005), os genes do operon *ica* são responsáveis por sintetizarem a produção de proteínas associadas a formação de biofilme. Estirpes de SCN portadoras dos genes *ica* podem codificar proteínas associadas a biofilmes, que levam a dificuldade na cura da metete mamária, após o tratamento. De acordo com Cucarellas et al. (2004), estirpes de *S. aureus bap* positivas, mesmo com inativação ou ausência do operon *ica* continuaram a apresentar síntese de biofilme *in vitro*, tornando-se de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos quando comparadas com as células livres (AMORENA et al., 1999).

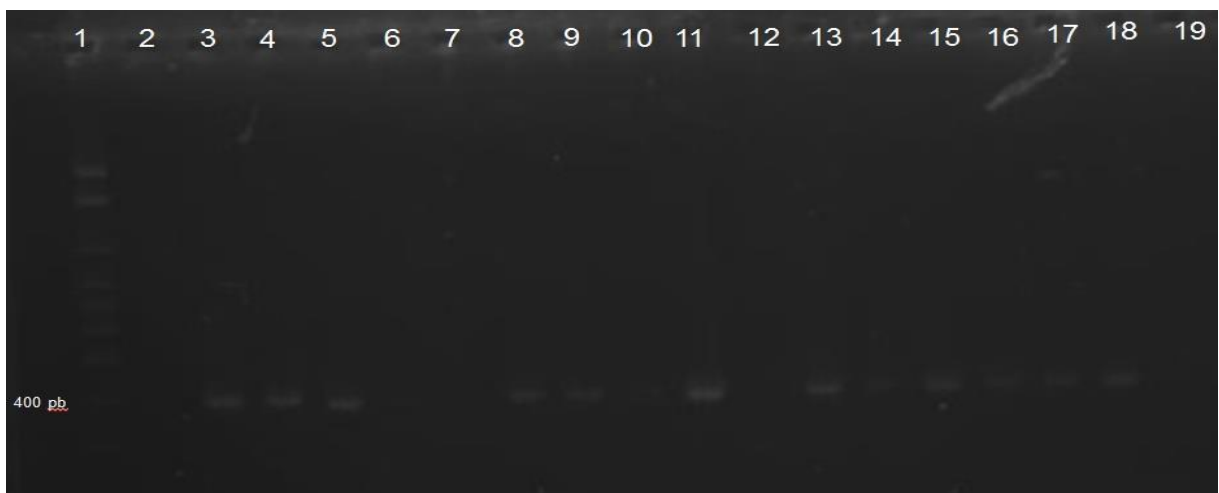


Figura 5. Produto de PCR em gel de agarose metaphor 2% para identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas portadoras do gene *icaC*. Legenda: 1 - DNA Ladder; 2 – Controle negativo (ATCC – controle negativo); 3 - Controle positivo (ATCC – controle positivo); 4 / 5 / 8 / 9 / 11 / 13 / 14 / 15 / 16 / 17 / 18 – amostras positivas para o gene *icaC*; 6 / 7 / 10 / 12 / 19 – amostras negativas para o gene *icaC*.

Tabela 9. Distribuição dos genes *icaC*, *icaD* e *bap* nas espécies de SCN identificadas na desmama de ovelhas com mastite subclínica imediatamente antes do período seco.

Espécie	<i>icaC</i>		<i>icaD</i>		<i>bap</i>	
	N	%	N	%	N	%
G1						
<i>S. epidermidis</i>	1	33,3	2	33,3	-	-
<i>S. xylosus</i>	1	33,3	-	-	1	100,0
<i>S. simulans</i>	1	33,3	1	17,0	-	-
<i>S. warneri</i>	-	-	3	50,0	-	-
G2						
<i>S. xylosus</i>	-	-	-	-	1	100,0
<i>S. simulans</i>	-	-	1	50,0	-	-
<i>S. warneri</i>	-	-	1	50,0	-	-
G3						
<i>S. epidermidis</i>	1	33,3	-	-	1	100,0
<i>S. simulans</i>	2	67,0	3	37,5	-	-
<i>S. warneri</i>	-	-	4	50,0	-	-
<i>S. chromogenes</i>	-	-	1	12,5	-	-

G1: Grupo controle, composto de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina).

icaC, *icaD* e *bap*: genes codificadores de proteínas responsáveis pela formação do biofilme.

As distribuições dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD* aos 15 e 30 dias pós-parto encontram-se na Tabela 10.

Marques et al. (2013) investigaram a produção de *slime* em estirpes de SCN isolados do leite de vacas, e constataram que 74,5% dos isolados eram produtores de *slime*, porém 4,1% eram portadores do gene *icaA* e 8,3% do gene *icaD*. Os autores concluíram que o *slime* facilita a adesão dos *Staphylococcus* spp. ao tecido do hospedeiro e a agregação célula-célula, favorecendo a formação de biofilme, e dificultando a eliminação dos micro-organismos.

Tabela 10. Distribuição dos genes *icaA*, *icaC* e *icaD* em espécies de SCN identificados aos 15 e 30 dias pós-parto em ovelhas pertencentes aos três grupos experimentais.

Espécies	<i>icaA</i>				<i>icaC</i>				<i>icaD</i>			
	15 dias pós-parto		30 dias pós-parto		15 dias pós-parto		30 dias pós-parto		15 dias pós-Parto		30 dias pós-parto	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
G1												
<i>S. haemolyticus</i>	1	50,0	1	50,0	2	28,6	1	11,1	2	25,0	1	7,7
<i>S. xylosus</i>	1	50,0	-	-	3	42,9	1	11,1	3	38,0	1	7,7
<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	1	14,3			1	13,0	1	7,7
<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	1	14,3	4	44,4	1	13,0	6	46,0
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	1	11,1	1	13,0		
<i>S. simulans</i>	-	-	-	-	-	-	1	11,1	-	-	2	15,0
<i>S. capitis</i>	-	-	1	50,0	-	-	-	-	-	-	1	7,7
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	1	11,1	-	-	1	7,7
<i>S. cohnii cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lentus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2												
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	-	-	-	-	-	-	1	20,0	-	-	1	17,0
<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	1	25,0	1	20,0	-	-	1	17,0
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	2	50,0	-	-	2	67,0	-	-
<i>S. simulans</i>	-	-	-	-	1	25,0	1	20,0	1	33,0	1	17,0
<i>S. capitis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	33,3
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	1	20,0	-	-	1	17,0
<i>S. lentus</i>	-	-	-	-	-	-	1	20,0	-	-	-	-
G3												
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	1	50,0	3	75,0	1	50,0	3	60,0
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	1	50,0	-	-	1	50,0	-	-
<i>S. simulans</i>	-	-	-	-	-	-	1	25,0	-	-	-	-
<i>S. capitis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lentus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	20,0
<i>S. sciuri sciuri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	20,0

G1: Grupo controle, composto de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina). *icaA*, *icaC* e *icaD*: genes codificadores de proteínas responsáveis pela formação do biofilme.

Staphylococcus coagulase-negativos identificados aos 15 e 30 dias pós-parto da lactação consecutiva não apresentaram o gene *bap*. O gene *icaA* esteve presente em três espécies estafilocócicas isoladas no leite de ovelhas de G1, enquanto os genes *icaC* e *icaD* foram encontrados em um maior número de espécies em todos os grupos experimentais. O relato da presença do gene *icaA* aqui relatada difere dos resultados de (MARTINS, 2013). Ergun et al. (2012) investigaram amostras de leite de ovelhas com mastite subclínica e relataram 60,0% de SCN portadores do gene *icaD*. Pereira (2010) trabalhou com 100 amostras *Staphylococcus* spp. e encontrou 15% de positividade para os genes *icaA* e *icaD*.

Os resultados obtidos mostraram que várias espécies de SCN são portadoras de pelo menos um gene codificador de proteína responsável pela formação de biofilme, resultado semelhante ao encontrado por Gonçalves et al. (2014). Nos três períodos foram encontradas espécies de SCN portadoras de genes codificadores de proteínas responsáveis pela formação de biofilme, o que pode comprometer os tratamentos realizados, pois os biofilmes são capazes de manter protegidos os SCN.

10.5 – Relação de cura e não cura com os fatores de virulência

Na tabela 11 são apresentados os resultados de detecção de SCN e genes de fatores de virulência em ovelhas curadas e não curadas aos 15 e 30 dias pós-parto.

No grupo de animais não tratados, seis ovelhas em cujas metades mamárias foram isolados *S. warneri* antes da desmama com genes de fatores de virulência, permaneceram com mastite subclínica na lactação seguinte. Destas, três eram portadoras do gene *sec*, enquanto as demais foram portadoras concomitantemente dos genes *icaD* e *sec*. Duas ovelhas sem tratamento com isolamento de *S. epidermidis* antes da desmama não apresentaram recuperação espontânea aos 15 e 30 dias pós-parto, uma das quais cujo micro-organismo apresentou o gene *icaD*, enquanto a outra apresentou concomitantemente os genes *icaC* e *icaD*.

Tabela 11. Espécies de SCN identificadas no desmame e seus genes de fatores de virulência identificados em metades mamárias curadas e não curadas.

Espécie	Antes da desmama	15 dias pós-parto		30 dias pós-parto		
	Genes	Genes	Cura ¹	Genes	Cura	Reinfecção ²
			G1			
<i>S. simulans</i>	<i>sec</i>	-	-	-	-	-
	<i>sec</i>	-	+	-	+	-
	<i>icaCD/sec</i>	-	+	-	+	-
	-	-	-	<i>icaD/sec</i>	-	-
	-	-	+	-	+	-
<i>S. xylosus</i>	<i>bap</i>	-	-	-	-	-
	<i>icaC/sec</i>	-	+	-	+	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	+	-	+	-
<i>S. warneri</i>	<i>sec</i>	-	-	-	-	-
	<i>sec</i>	-	-	-	-	-
	<i>sec</i>	-	-	<i>icaD</i>	-	-
	<i>icaD/sec</i>	-	-	-	-	-
	<i>icaD/sec</i>	-	-	-	-	-
	<i>icaD/sec</i>	-	-	-	-	-
	-	-	-	<i>icaD</i>	-	-
<i>S. epidermidis</i>	<i>icaCD</i>	-	-	-	-	-
	<i>icaD</i>	-	-	<i>icaC/sec</i>	-	-
<i>S. lentus</i>	-	-	+	-	+	-
			G2			
<i>S. simulans</i>	<i>icaD</i>	-	-	-	-	-
	<i>sec</i>	-	+	-	+	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	<i>icaD</i>	-	+	-	-	+
	-	-	+	-	+	-
<i>S. xylosus</i>	<i>bap</i>	-	+	-	-	+
	-	-	+	-	+	-
<i>S. epidermidis</i>	<i>sec</i>	-	-	-	-	-
	-	<i>icaCD</i>	-	-	-	-
	-	-	+	-	+	-
<i>S. chromogenes</i>	-	-	+	-	-	+
	-	-	+	-	+	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	+	-	-	-
	-	-	+	-	+	-

continuação da tabela 11.

		G3				
<i>S. epidermidis</i>	<i>bap</i>	-	+	-	+	-
	<i>icaC</i>	-	-	-	-	-
	-	-	+	-	+	-
<i>S. warneri</i>	<i>icaD</i>	-	+	-	+	-
	<i>icaD/sec</i>	-	+	-	+	-
	<i>icaD</i>	-	-	-	-	-
	<i>icaD</i>	-	+	-	+	-
	-	<i>icaCD/sec</i>	-	-	-	-
<i>S. simulans</i>	<i>icaD</i>	-	-	-	-	-
	<i>icaCD</i>	-	+	-	+	-
	<i>icaCD</i>	-	+	-	+	-
	-	-	+	-	+	-
<i>S. xylosus</i>	<i>sec</i>	-	+	-	+	-
-	-	-	+	-	+	-
<i>S. chromogenes</i>	<i>icaD/sec</i>	-	+	-	+	-
<i>S. cohnii</i>	-	-	+	-	+	-
<i>S. capitis</i>	-	-	+	-	+	-

G1: Grupo de ovelhas sem tratamento com antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas tratadas com antimicrobiano convencional; e G3: ovelhas tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado. ¹Cura: ovelhas curadas (ausência de microorganismos, em conjunto com CCC < 2,5 x 10⁵ células / mL de leite e/ou CMT negativo). ²Reinfecção: animais curados com 15 dias pós-parto, e que apresentaram mastite subclínica 30 dias pós-parto. “+” = Ocorrência, “-” = Não ocorrência.

Em G2, metades mamárias infectadas por *S. simulans* cujo gene *icaD* foi identificado e por *S. epidermidis* portador do gene *sec* não foram curadas após o tratamento da mastite subclínica, conforme análises na reavaliação das metades mamárias aos 15 e 30 dias pós-parto. Três ovelhas apresentaram reinfecção aos 30 dias pós-parto, mesmo com o tratamento anterior com 100 mg de cloxacilina-benzatina (G2). Dessas, uma apresentou *S. warneri* portador do gene *icaD*, outra apresentou *S. xylosus* portador do gene *bap* e a seguinte apresentou *S. chromogenes* sem ocorrência de fatores de virulência no pré-tratamento. De acordo com Rasmussen & Givskov (2006), bactérias no interior dos biofilmes sofrem menor ação dos neutrófilos, facilitando a multiplicação bacteriana por longos períodos. Conseqüentemente pode haver ineficiência do antimicrobiano. Ovelhas que apresentam estirpes de SCN portadoras de genes associados a formação de biofilme, durante o pré-parto, podem permanecer com mastite subclínica durante o

período seco e na próxima lactação caso haja a formação do biofilme, uma vez que a presença de genes não necessariamente está vinculada a esta formação.

Nas ovelhas tratadas com antimicrobiano nanoparticulado, os casos com ausência de cura aos 15 e 30 dias pós-parto foram de metades mamárias infectadas por *S. epidermidis*, *S. warneri* e *S. simulans*. Houve presença no pré-tratamento do gene *icaC* na ovelha infectada por *S. epidermidis* e do gene *icaD* nas ovelhas infectadas por *S. warneri* e *S. simulans*. A maioria das ovelhas tratadas à desmama (G2 e G3) que não apresentaram cura da mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto, foram portadoras dos genes do locus *ica*, que codifica a síntese de biofilme (O'Toole, 2000). A produção de fatores de virulência não foi investigada e a presença dos genes não significa que estes fatores seriam produzidos pelos microorganismos. Porém, estudos sobre a capacidade de SCN em casos de mastite subclínica permanecer na metade mamária ovina, mesmo após o tratamento intramamário, podem colaborar com informações relativas à epidemiologia da doença e contribuir com a adoção de medidas de controle futuras.

10.6 – Caracterização molecular por meio do PFGE

A figura 6 mostra o gel resultante da análise de PFGE, e as figuras 7, 8, 9 e 10 apresentam as tipagens moleculares por PFGE das espécies de SCN encontradas na mesma metade mamária no pré-tratamento e 15 dias pós-parto. Estas espécies permaneceram ou não na mesma metade mamária até os 30 dias pós-parto.

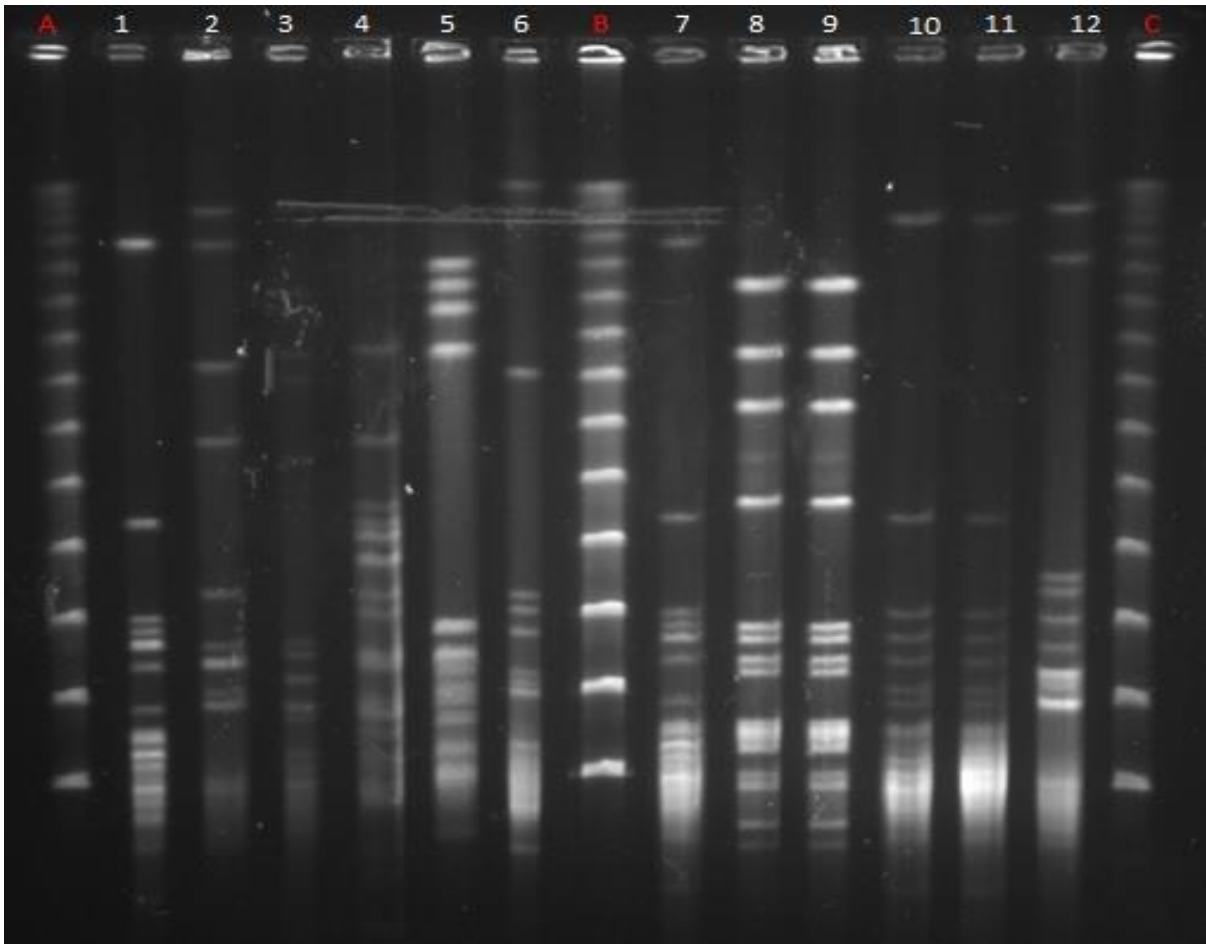


Figura 6. Gel resultante da análise de PFGE corados com GelRed[®] e fotografado sob transluminação UV. Amostras: A / B / C – DNA Ladder; 1 a 12 – cepas de *Staphylococcus coagulase-negativos*.

10.6.1 – *Staphylococcus warneri*

A tipagem molecular foi realizada com 33 isolados de *S. warneri* identificadas nos três grupos experimentais, durante o pré-tratamento aos 15 e 30 dias pós-parto, uma estirpe não possível de ser tipada (Figura 7). A Tabela 12 mostra clones revelados na mesma metade mamária em coletas e lactações diferentes em duas ovelhas. A ovelha 1377D (G1) não apresentou cura da mastite subclínica aos 30 dias pós-parto, e foi revelado clone o mesmo *S. warneri* com o gene *sec* identificado no pré-tratamento e aos 30 dias pós-parto, aos 15 dias pós-parto foi identificada outra estirpe de SCN. A ovelha 28D (G3) não apresentou cura da mastite subclínica aos 15 pós-parto, e *S. warneri* identificado no pré-tratamento e *S. warneri* portador concomitantemente dos genes *icaC*, *icaD* e *sec* aos 15 dias pós-parto, foram

similares. A ausência de cura da mastite subclínica pode estar relacionada com a presença dos genes responsáveis pela produção de proteínas associadas a formação de biofilme e produção de enterotoxinas. As bactérias no interior dos biofilmes ficam protegidas contra os mecanismos de defesa do organismo e sofrem menor ação dos antimicrobianos, conforme já mencionado anteriormente.

Tabela 12. Características dos clones de *S. warneri* identificados no pré-tratamento, 15 e/ou 30 dias pós-parto de ovelhas não curadas da mastite subclínica, e seus fatores de virulência.

Grupo clonal	Animal	Grupos	Número de isolados	Coletas		
				Pré-tratamento	15 dias pós-parto	30 dias pós-parto
A	1377 D	G1	2	1 (<i>sec</i>)	-	1
C	28 D	G3	2	1	1 (<i>sec</i> / <i>icaCD</i>)	-

A / C: Grupos clonais. G1: Grupo de ovelhas sem tratamento com antimicrobiano intramamário e G3: ovelhas tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado. *sec*: genes que codificam as protetinas responsáveis pela produção da enterotoxina C. *icaCD*: genes que codificam as protetinas responsáveis pela produção de biofilme. "-" = Não ocorrência.

Na coleta realizada durante o pré-tratamento, foram encontrados dois clones de *S. warneri*, ambos portadores dos genes *sec* e *icaD* e pertencentes ao G1. Aos 15 dias pós-parto, duas estirpes isoladas no leite das ovelhas 43D (G3) e 14D (G1) foram considerados clones, ambas negativas para fatores de virulência. Aos 30 dias pós-parto, foram encontradas três estirpes clones, provenientes das ovelhas 14D (G1), 12E (G3) e 28E (G3), duas delas portadoras dos genes *sec*, *icaC* e *icaD* e uma portadora do gene *icaD*. Segundo Pilipčinová et al. (2010), a ampla disseminação de cepas homólogas de SCN pode estar relacionada à sua afinidade por pele e mucosas, o que elucidaria o perfil clonal entre *S. warneri* isolados de leite de ovelhas na Eslováquia, semelhante à encontrada no pré-parto aos 15 e 30 dias pós-parto no presente trabalho.

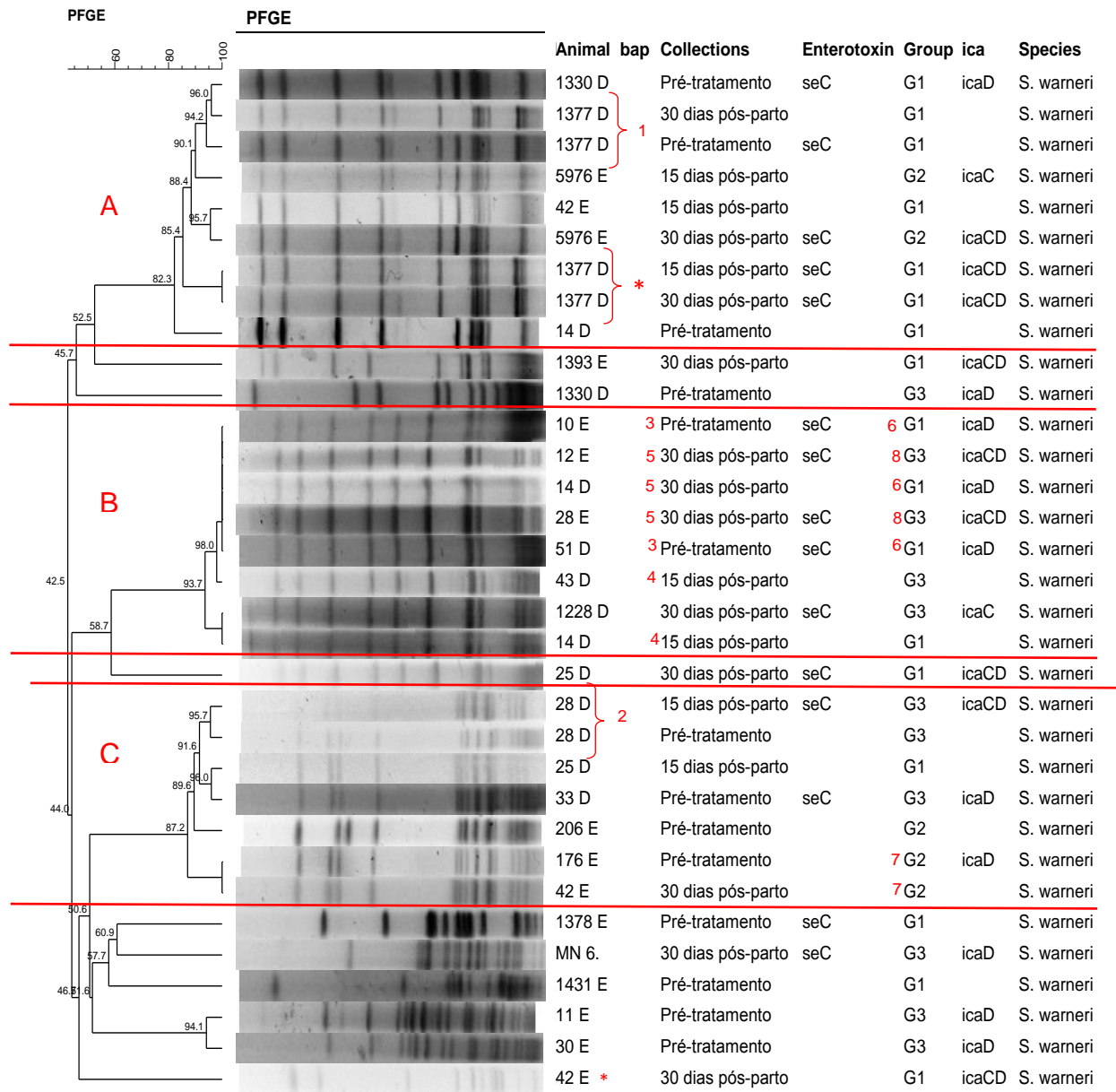


Figura 7. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 33 isolados de *Staphylococcus warneri* (similaridade $\geq 80\%$), encontrados no pré-tratamento, 15 e 30 dias pós-parto, nos três grupos experimentais.

D: metade mamária direita. E: metade mamária esquerda.

*: ovelha submetida ao segundo período de coleta, na segunda estação de monta. 1 / 2; clones bacterianos encontrados na mesma metade mamária em coletas diferentes. 3: clones bacterianos encontrados durante o pré-tratamento. 4: clones bacterianos encontrados aos 15 dias pós-parto. 5: clones bacterianos encontrados aos 30 dias pós-parto. 6: clones bacterianos encontrados em G1. 7: clones bacterianos encontrados em G2. 8: clones bacterianos encontrados em G3. A / B / C: Grupos clonais.

Em G1, foram encontradas três estirpes clones provenientes das ovelhas 14D, 10E e 51D, sendo duas delas portadoras dos genes *sec* e *icaD* e uma portadora do gene *icaD*. Duas estirpes provenientes das ovelhas 176E e 42E, ambas pertencentes ao G2 são clones, sendo uma portadora do gene *icaD* e uma negativa para os fatores de virulência estudados. Já em G3, outras duas estirpes provenientes das ovelhas 12E e 28E são clones, ambas portadoras dos genes *sec*, *icaC* e *icaD*. Os três grupos experimentais tiveram pelo menos uma estirpe portadora do gene *icaD*, resultados inferiores aos encontrados por Ergün et al. (2012), ao coletarem amostras de leite de ovelhas com mastite subclínica e relatarem 60,0% de SCN portadores do gene *icaD*. De acordo com estes autores, os biofilmes ajudam os *Staphylococcus* spp. a aderirem e colonizarem o epitélio da glândula mamária, melhorando a sobrevivência neste ambiente.

Quando os 33 perfis de *S. warneri* foram agrupados entre si, revelaram-se três grupos clonais (A / B / C). O grupo clonal A, composto por nove estirpes de *S. warneri* sendo três isoladas durante o pré-tratamento, uma portadora dos genes *sec* e *icaD*, uma portadora do gene *sec* e uma negativa para os fatores de virulência estudados. Três estirpes isoladas aos 15 dias pós-parto, sendo uma portadora dos genes *sec* e *icaCD*, uma portadora do gene *icaC* e uma negativa para os genes estudados. Três estirpes isoladas aos 30 dias pós-parto, sendo duas portadora concomitantemente dos genes *sec* e *icaCD* e uma negativa para os genes estudados.

O grupo clonal B, composto por oito estirpes de *S. warneri* sendo duas isoladas no pré-tratamento, ambas portadoras concomitantemente dos genes *sec* e *icaD*, duas isoladas aos 15 dias pós-parto e negativas para os fatores de virulência estudados, e quatro isolados aos 30 dias pós-parto, sendo duas portadoras concomitantemente dos genes *sec* e *icaCD*, duas portadoras dos genes *icaCD*, uma portadora do gene *icaC* e uma portadora do gene *icaD*. O grupo clonal C, composto por sete estirpes de *S. warneri* sendo quatro isoladas no pré-tratamento, onde uma é portadora concomitantemente dos genes *sec* e *icaD*, uma portadora do gene *icaD* e uma negativa para os fatores de virulência estudados. Duas estirpes isoladas aos 15 dias pós-parto, sendo uma portadora dos genes *sec* e *icaD* e uma negativa para os

genes pesquisados. Uma estirpe negativa para os fatores de virulência estudados, isolada aos 30 dias pós-parto.

A diversidade clonal de *S. warneri* encontrada no presente estudo pode estar relacionada ao ato de mamar dos cordeiros, pois durante a mamada ocorre à remoção do tampão de queratina, tornando o esfíncter flácido e mais vulnerável à entrada de micro-organismos no canal do teto e na glândula mamária.

A diversidade clonal de cepas causadoras de mastite em ovelhas, não restringe apenas a SCN. Almeida (2009) encontrou quatro perfis clonais distintos de *S. aureus* isolados de ovelhas portadoras de mastite clínica e subclínica. Verificou que cinco isolados de *S. aureus* pertencem ao mesmo grupo clonal, e são provenientes de ovelhas portadoras de mastite subclínica. Concluiu que uma considerável proporção dos casos de mastite deve-se à ocorrência cada vez mais frequente de linhagens genomicamente diversificadas e portadoras de múltiplos fatores de virulência, o que pode ser confirmado pela diversidade de genes de virulência encontrados no presente estudo.

10.6.2 – *Staphylococcus simulans*

O dendrograma a seguir representa o perfil clonal dos *S. simulans* identificados durante o pré-tratamento, 15 e 30 dias pós-parto, nos três grupos experimentais (Figura 8).

Na Tabela 13 pode ser visualizado clones de *S. simulans* na mesma metade mamária em coletas e lactações diferentes em duas ovelhas pertencentes ao G2, uma estirpe não foi tipada. A ovelha 688E não apresentou cura da mastite subclínica aos 15 dias pós-parto, porém *S. simulans* isolados no pré-tratamento e aos 15 dias pós-parto, ambos negativos para os fatores de virulência, são considerados clones. A ovelha 5863E também não apresentou cura da mastite subclínica aos 15 dias pós-parto, e foi revelado clone entre *S. simulans* portador do gene *icaD* isolado no pré-tratamento e aos 15 dias pós-parto.

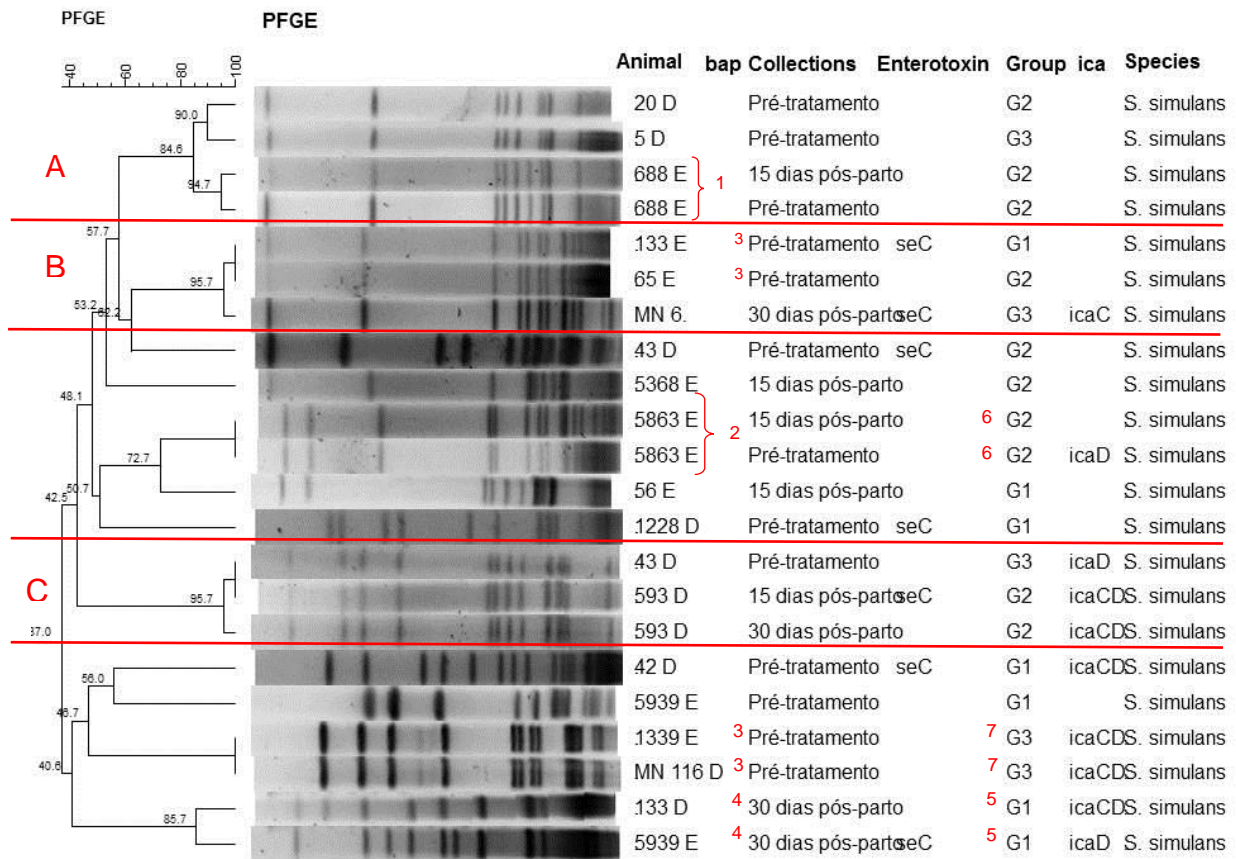


Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 22 isolados de *Staphylococcus simulans* (similaridade $\geq 80\%$), encontrados no pré-tratamento, 15 e 30 dias pós-parto, nos três grupos experimentais.

D: metade mamária direita. E: metade mamária esquerda.

1 / 2: clones bacterianos encontrados na mesma metade mamária. 3: clones bacterianos encontrados no pré-parto. 4: clones bacterianos encontrados aos 30 dias pós-parto. 5: clones bacterianos encontrados em G1. 6: clones bacterianos encontrados em G2 e 7: clones bacterianos encontrados em G3. A / B / C: Grupos clonais.

Aos 15 dias pós-parto não foram encontrados clones de *S. simulans*, o que leva a hipótese de que estirpes presentes no interior da metade mamária tenham sido eliminadas pelos mecanismos de defesa da glândula mamária ou pelos antimicrobianos utilizados no momento da secagem dos animais. Após os 15 dias pós-parto, estirpes clones de SCN presentes na pele do teto podem ter penetrado na metade mamária, levando ao isolamento de clones de *S. simulans* aos 30 dias pós-parto, uma vez que SCN são designados como “microbiota oportunista de pele e teto” (TRINDAD et al., 1990).

Tabela 13. Características dos clones de *S. simulans* identificados no pré-tratamento, 15 e/ou 30 dias pós-parto de ovelhas não curadas da mastite subclínica, e seus fatores de virulência.

Grupo clonal	Animal	Grupo	Número de isolados	Coletas		
				Pré-tratamento	15 dias pós-parto	30 dias pós-parto
A	688 E	G2	2	1	1	-
-	5863 E	G2	2	1 (<i>icaD</i>)	1	-

A: Grupo clonal. G2: Grupo de ovelhas tratadas com antimicrobiano convencional *icaD*: genes que codificam as protetinas responsáveis pela produção de biofilme. "-" = Não ocorrência.

Em G1, duas estirpes de *S. simulans* provenientes das ovelhas 133D e 5939E sendo, uma delas portadora dos genes *icaC* e *icaD* e a outra portadora dos genes *sec* e *icaD*, são consideradas clones. Em G2, as duas estirpes provenientes da ovelha 5863E são clones, uma delas portadora do gene *icaD* e a outra negativa para os fatores de virulência. Em G3, duas estirpes provenientes das ovelhas 1339E e MN116D são clones, ambas portadoras dos genes *icaC* e *icaD*. A ocorrência do gene *icaD* em *S. simulans* isolados do leite de ovelhas também foi relatada por (MARTINS, 2013).

Quando os 22 perfis de *S. simulans* foram agrupados entre si, revelaram-se três grupos clonais (A / B / C). O grupo clonal A, composto por quatro estirpes, sendo três isoladas durante o pré-tratamento e uma isolada aos 15 dias pós-parto, todas negativas para os fatores de virulência estudados. O Grupo clonal B, composto por três estirpes, duas isoladas durante o pré-tratamento, sendo uma portadora do gene *sec* e uma negativa para os genes pesquisados. O grupo clonal C, composto três estirpes, uma isolada durante o pré-tratamento e portadora do gene *sec*, uma isolada aos 15 dias pós-parto e portadora concomitantemente dos genes *sec* e *icaCD*, e uma isolada aos 30 dias pós-parto, portadora dos genes *icaCD*.

Além de clones de SCN clones de *S. aureus* também são isolados de animais portadores de mastite. Melo (2011) realizou o PFGE com 225 estirpes de *S. aureus* isolados de vacas com mastite, do tanque de expansão, das mãos dos ordenhadores, e demais locais pertencentes aos equipamento de ordenha, e verificaram que as estirpes isoladas do leite de vacas apresentaram maiores grupos clonais. A

autora concluiu que houve falha no processo de higienização e manutenção dos equipamentos da ordenha mecânica, e sugeriu a constituição de uma linha correta de ordenha, a fim de evitar a disseminação do *S. aureus* nos insufladores de outros pontos do ambiente de ordenha.

A correta higienização dos equipamentos de ordenha pode evitar a disseminação de micro-organismos entre os animais destinados a produção de leite e que frequentam a ordenha, porém os perfis clonais encontrados no presente estudo são oriundos de ovelhas de dupla aptidão, e que não frequentam ambiente de ordenha, ou seja, é necessário realizar mais trabalhos com a finalidade de identificar os locais passíveis de transmissão de micro-organismos para as ovelhas.

10.6.3 – *Staphylococcus epidermidis*

Na figura 9 está representado o perfil clonal de *S. epidermidis* identificados durante o pré-tratamento, 15 e 30 dias pós-parto, nos três grupos experimentais.

Em uma mesma metade mamária, em coletas e lactações diferentes foram revelados clones de *S. epidermidis* em uma ovelha pertencentes ao G1 (Tabela 14) e uma pertencente ao G2, uma estirpe não foi tipada. A ovelha 430E (G1) não apresentou cura da mastite subclínica aos 30 dias pós-parto, as estirpes de *S. epidermidis* portadora dos genes *icaC* e *icaD* isoladas no pré-tratamento e *S. epidermidis* portadora dos genes *sec* e *icaC* isolada aos 30 dias pós-parto, são clones. A ovelha 642D (G2) também não apresentou cura da mastite subclínica aos 30 dias pós-parto e foi constatado que *S. epidermidis* isolado no pré-tratamento e *S. epidermidis* portador dos genes *icaC* e *icaD* isolado aos 15 dias pós-parto são clones bacterianos.

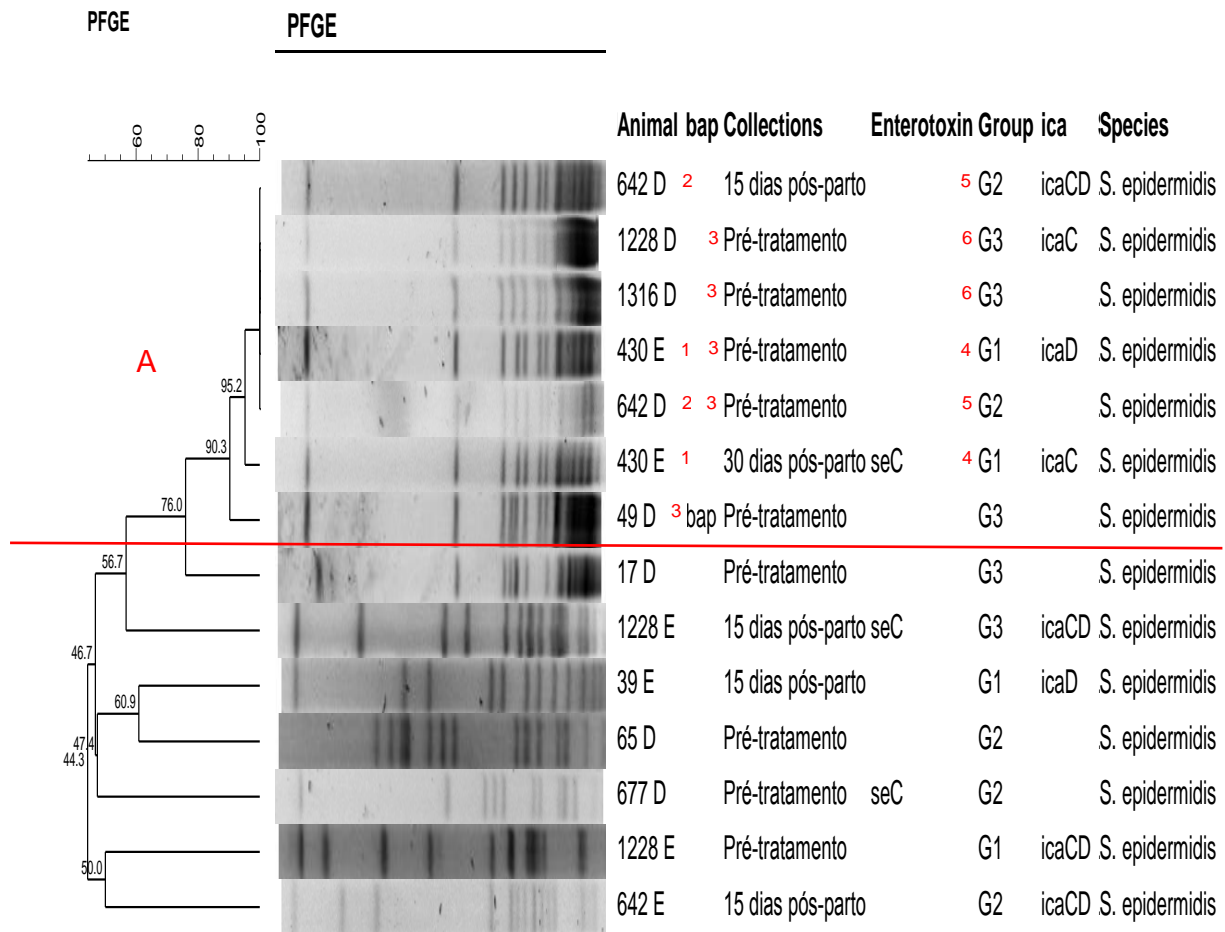


Figura 9. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 14 isolados de *Staphylococcus epidermidis* (similaridade $\geq 80\%$), encontrados no pré-tratamento, 15 e 30 dias pós-parto, nos três grupos experimentais.

D: metade mamária direita. E: metade mamária esquerda.

1 / 2: clones bacterianos encontrados na mesma metade mamária. 3: clones bacterianos encontrados no pré-parto. 4: clones bacterianos encontrados em G1. 5: clones bacterianos encontrados em G2 e 6: clones bacterianos encontrados em G3. A: Grupo clonal.

Nas coletas realizadas nas ovelhas com mastite subclínica durante o pré-tratamento, houve cinco estirpes de *S. epidermidis* clones, provenientes das ovelhas 1228D (G3), portador do gene *icaC*; 430E (G1), portador do gene *icaD*; 49D (G3), portador do *bap*; 642D (G2) e 1316D (G3), negativos para os fatores de virulência. Aos 15 e 30 dias pós-parto o PFGE não revelou clones de *S. epidermidis*. O aparecimento de clones de *S. epidermidis* portadores de fatores de virulência somente no pré-parto de ovelhas com mastite subclínica não significa que esses

animais estejam livres de patógenos causadores de mastite no pós-parto, uma vez que são considerados micro-organismos colonizadores de pele e teto e falhas no manejo dos animais podem facilitar a sua penetração na glândula mamária e acarretar um quadro de mastite nos animais.

Tabela 14. Características dos clones de *S. epidermidis* identificados no pré-tratamento, 15 e/ou 30 dias pós-parto de ovelhas não curadas da mastite subclínica, e seus fatores de virulência.

Grupo clonal	Animal	Grupos	Número de isolados	Coletas		
				Pré-tratamento	15 dias pós-parto	30 dias pós-parto
A	430 E	G1	2	1(<i>icaD</i>)	-	1(<i>sec</i> / <i>icaC</i>)
A	642 D	G2	2	1	1 (<i>icaC</i> / <i>icaD</i>)	-

A: Grupo clonal. G1: Grupo de ovelhas sem tratamento com antimicrobiano intramamário. *icaCD*: genes que codificam as proteínas responsáveis pela produção de biofilme. *sec*: genes que codificam as proteínas responsáveis pela produção de enterotoxina. “-“ = Não ocorrência.

Em G1, dois isolados de *S. epidermidis* provenientes da ovelha 430E são clones, um deles portador do gene *icaD* e outro portador dos genes *sec* e *icaC*. Em G2, outros dois isolados provenientes das ovelhas 642D, sendo um deles portador dos genes *icaC* e *icaD* e outro sem a presença de fatores de virulência, são clones bacterianos. Em G3, dois isolados originados das ovelhas 1228D e 1316D, onde um deles portador do gene *icaC* e outro negativo para fatores de virulência, são considerados clones.

Quando os 14 perfis de *S. epidermidis* foram agrupados entre si, revelaram um grupo clonal (A), composto por sete estirpes. Durante o pré-tratamento foram isoladas cinco estirpes, sendo uma portadora do gene *icaC*, uma portadora do gene *icaD*, uma portadora do gene *bap*, e duas negativas para os fatores de virulência estudados. Aos 15 dias pós-parto foi isolada uma estirpe portadora dos genes *icaCD*, e aos 30 dias pós-parto foi isolado uma estirpes portadora do gene *icaC*.

10.6.4 – *Staphylococcus xylosus*

O dendrograma da figura 10 representa o perfil clonal dos *S. xyloso*s identificados durante o pré-tratamento, 15 e 30 dias pós-parto, nos três grupos experimentais.

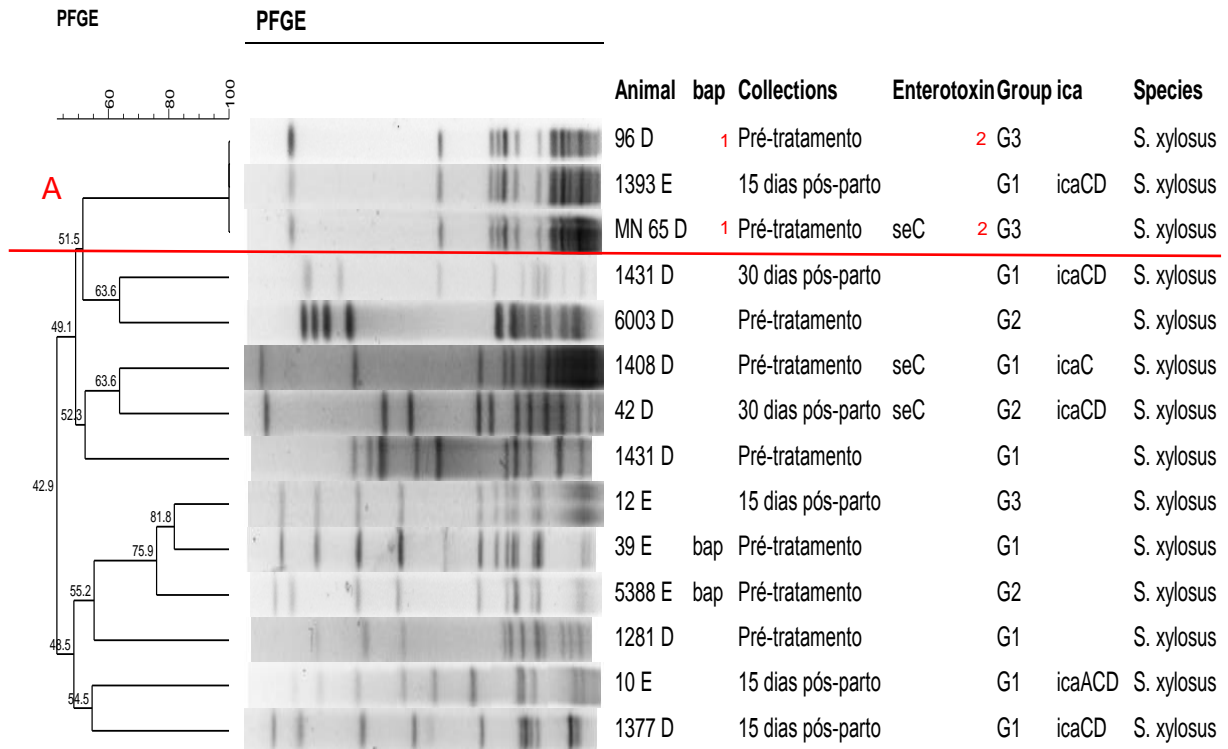


Figura 10. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal dos 14 isolados de *Staphylococcus xyloso*s (similaridade $\geq 80\%$), encontrados no pré-tratamento, 15 e 30 dias pós-parto, nos três grupos experimentais.

D: metade mamária direita. E: metade mamária esquerda.

1: clones bacterianos encontrados no pré-tratamento e 2: clones bacterianos encontrados em G3. A: Grupo clonal.

Não foram encontrados clones de *S. xyloso*s na mesma metade mamária nas coletas durante o pré-tratamento, aos 15 e 30 dias pós-parto. Nas coletas realizadas nas ovelhas pertencentes ao G3 com mastite subclínica durante o pré-tratamento, encontrou-se dois clones, um deles portador do gene *sec* e outro negativo para os fatores de virulência. Foram encontradas estirpes de *S. xyloso*s clones em amostras de leite provenientes das ovelhas 96D (G3) e MN 65D (G3), porém um deles foi portador do gene *sec*, enquanto que o outro foi negativo para os fatores de virulência estudados.

Quando os 33 perfis de *S. xyloso*s foram agrupados entre si, revelaram apenas um grupo clonal (A), composto por três estirpes. Duas isoladas durante o pré-tratamento, sendo uma portadora do gene *sec*, e uma negativa para os genes pesquisados, e a outra estirpe isolada aos 15 dias pós-parto é portadora concomitantemente dos genes *icaCD*.

11 – Mapa de análise de correspondência múltipla

A figura 11 apresenta as relações de correspondência entre as ovelhas curadas e não curadas distribuídas nos grupos experimentais, com as estirpes de SCN identificadas e os fatores de virulência. O mapa bidimensional formado pelos fatores 1 (20,04%) e fator 2 (15,25%) são responsáveis por 35,29% da variância explicada pela análise de correspondência múltipla (ACM). Os grupos tratados 2 e 3 estão mais próximos da cura da mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto dentro do mapa a seguir, ou seja, as ovelhas pertencentes a estes grupos apresentaram maior associação com a cura da mastite subclínica no pós-parto em relação ao G1 sem tratamento.

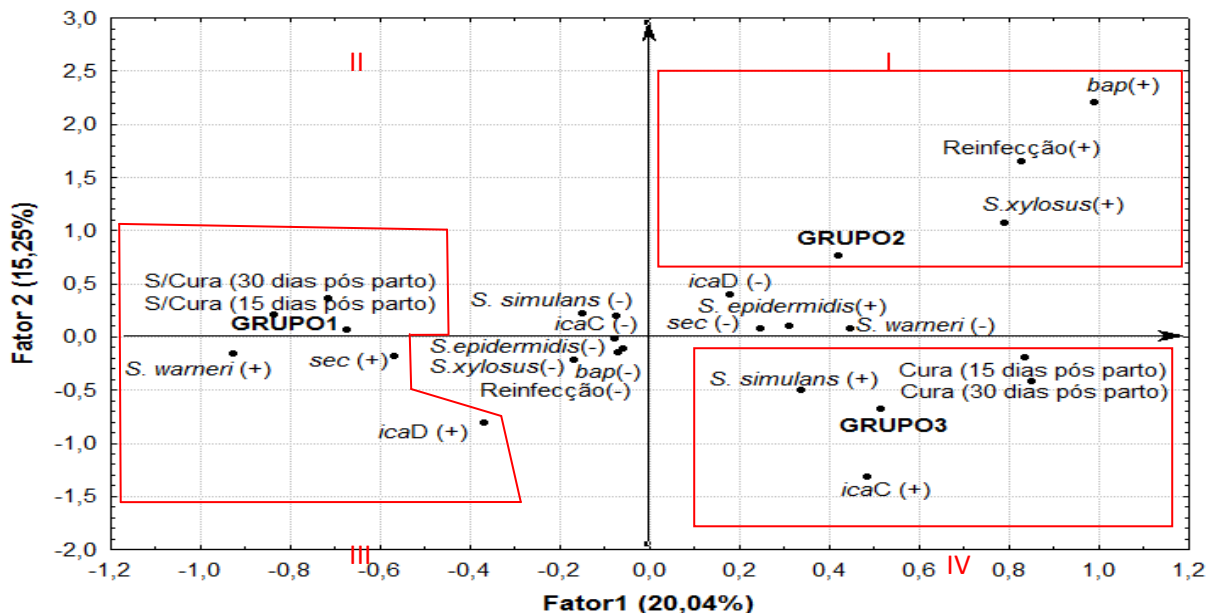


Figura 11. Mapa da análise de correspondência múltipla mostrando a associação entre os grupos, as estirpes de SCN, os fatores de virulência e a presença/ausência de cura da mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto. (+) presença; (-) ausência.

Ao analisar a figura, observa-se que os quadrantes II e III englobam as ovelhas pertencentes ao G1 com mastite causada por *S. warneri* portador concomitantemente dos genes *sec* e *icaD* no pré-tratamento, sem cura espontânea aos 15 e 30 dias pós-parto. Depreende-se que a presença dos genes *sec* e *icaD* pode ter relação com a manutenção dos casos de mastite subclínica no pós-parto de ovelhas. Os mecanismos de defesa da glândula mamária de ovelhas com mastite subclínica durante o pré-tratamento não são capazes de eliminar *S. warneri* portador dos genes *sec* e *icaD* durante o período seco, ou seja, esses micro-organismos permanecem no interior da glândula mamária, podendo desencadear mastite no pós-parto. De acordo com Gerke et al. (1998) o gene *icaD* tem sido apontado como fundamental na máxima expressão do N-acetilglicosamina transferase, conduzindo a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular, e que os genes *icaA* e *icaD* são significantes na formação de biofilme em *S. epidermidis* (ARCIOLA et al., 2001).

O quadrante I engloba ovelhas pertencentes ao G2, tratadas com cloxacilina benzatina contra mastite causada pelo *S. xylosus* portador do gene *bap*. Essas ovelhas apresentaram reinfecção da mastite subclínica aos 30 dias pós-parto. A reinfecção pode estar associada às estirpes portadoras do gene *bap*, pois ele promove a fixação primária dos micro-organismos a superfície e a adesão intercelular, e é suficiente para ocorrer à formação de biofilme (LATASA et al., 2006). O gene *bap* tem sido encontrado em algumas espécies de SCN como: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus* e *S. simulans*, resultados que semelhantes aos encontrados no presente estudo (TORMO et al., 2005).

O quadrante IV mostra que existe associação entre as ovelhas pertencentes ao (G3), ao *S. simulans* portador do gene *icaC* isolado durante o pré-tratamento, e a cura da mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto. A maior taxa de cura apresentada pelas ovelhas pertencentes ao G3 pode estar relacionada ao antimicrobiano nanoparticulado administrado via intramamária durante a secagem das ovelhas. As nanopartículas são capazes de direcionar os antimicrobianos para o epitélio glandular e para o interior de polimorfonucleares (TRONCARELLI et al., 2013).

12 - CONCLUSÕES

- Os mecanismos de defesa da glândula mamária e o tratamento com 100 mg cloxacilina benzatina convencional não eliminaram todas as espécies de SCN no pós-parto das ovelhas. O uso da cloxacilina nanoencapsulada na concentração de 50 mg na secagem das ovelhas foi eficiente para curar a mastite subclínica aos 30 dias pós-parto.

- *Staphylococcus warneri*, *S. simulans*, *S. epidermidis* e *S. xylosus* foram as principais espécies de SCN identificadas no pré e pós de ovelhas.

- Nenhuma das estirpes de SCN apresentou o gene *mecA*.

- O gene *sec* foi o único gene relacionado com a produção de enterotoxina identificado no momento da desmama, aos 15 e 30 dias pós-parto de ovelhas.

- Os genes relacionados com a formação de biofilme encontrados na desmama de ovelhas com mastite subclínica foram *icaC*, *icaD*, *bap*, e aos 15 e 30 dias pós-parto foram *icaA*, *icaD*, *bap*.

- *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus epidermidis* portadores de genes codificadores de proteínas responsáveis pela produção de enterotoxina e formação de biofilme podem sobreviver durante todo o período seco na glândula mamária de ovelhas tratadas e não tratadas durante a secagem e desencadear mastite no pós-parto.

- Estirpes de *Staphylococcus warneri* portadoras dos genes *sec* e *icaD*, estão associadas à ausência de cura microbiológica da mastite subclínica em ovelhas aos 15 e 30 dias pós-parto. *Staphylococcus xylosus* portador do gene *bap* estão associados a quadro de reinfecção da mastite subclínica aos 30 dias pós-parto. *Staphylococcus simulans* portador do gene *icaC* não interferem na taxa de cura da mastite subclínica aos 15 e 30 dias pós-parto.

13 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOL, A. M. D.; CAVALCANTE, M. B.; FRANÇA, C. A.; KREWER, C. C.; QUEIROS, A. A.; COSTA, M. M.; BRAGANÇA, J. F. M.; GIRARDINI, L. K. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from sheep milk Chapecó-SC. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 311-322, 2013.

AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 165-175, 2001.

ALMEIDA, L. M. **Fatores de virulência e genes regulatórios agr de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastite bovina e ovina.** 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). USP (Universidade de São Paulo), São Paulo, 2009.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; ÁVILA, A. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, F. E. M.; SOUZA, F. G. C.; PINHEIRO, R. R.; OLIVEIRA, E. L. Aetiology of clinical in a Santa Inês sheep flock in Sobral-CE – Pilot Study. **Revista Ciência Produção Animal**, v. 12, n. 1, p. 106-109, 2010.

AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓNA, M.; LEIVAB, J.; OTEIZAB, C.; PÉREZA, M.; ALABARTA, J.; HERNÁNDEZ-YAGOC, J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 43–55, 1999.

ANDERSON, D. E.; HULL, B. L.; PUGH, D. G. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos.** São Paulo: Roca, p. 389-395, 2004.

ARAÚJO, R. S. **Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinária.** 2009 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto), Ouro Preto, 2009.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 51-56, 2001.

ARCIOLA, C. R.; GAMBERINI, S.; CAMPOCCIA, D.; VISAI, L.; SPEZIALE, P.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 75, n. 408-413, 2005.

BAKER, J. S. Comparasion of various methodos for differentiation of *Staphylococcus* and micrococci. **Journal Clinical Microbiology**, v. 19, p. 875-879, 1984.

BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R. de; RUPP, R.; LAGRIGOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v. 34, p. 689-716, 2003.

BERNARDI, A. C. A.; PIZZOLITO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 57-66, 2007.

BEZEK, D.; HULL, B. L. Peracute gangrenous mastitis and cheilitis associated with enterotoxin-secreting *Staphylococcus aureus* in a goat. **Canadian Veterinary Journal**, v. 36, p. 106-107, 1995.

CHAFFER M.; LEITNER G.; ZAMIR S.; WINKLER M.; GLICKMAN A.; ZIV N. & SARAN. Efficacy of the dry-off treatment in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 47. p. 11-16, 2003.

CHAMBERS, H. F. Methicilin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basic and clinical implications. **Clinica Microbiology Review**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-second informational supplement**, document M100-S2, v. 32, n. 3, p. 1-184. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 145-153. 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistence infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N.; RIBEIRO, M. G.; TORRES, J. A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 139-151, 2006.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N.; RIBEIRO, SALERNO, T. Efficacy of dry treatment in Santa Inês ewes using intramammary cefalonium. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, 2008.

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; LENCASTRE, H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 99–103, 2001.

CROFT, A.; DUFFIELD, T; MENZIES, P.; LESLIE, K.; BAGG, R.; DICK, P. The effect of tilmicosin administered to ewes prior to lambing on incidence of clinical mastitis and subsequent lamb performance. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 306-311, 2000.

CUCARELLAS, C.; TORMO, M. A.; ÚBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J. R. Role of Biofilm –Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine Staphylococcus aureus. **Infection And Immunity**, v. 72, p. 2177-2185, 2004.

CUNHA, M. L. R .S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, p. 70-74, 2006.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; AZEDO, M. R.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; GOMES, V. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from meat-producing ewes with mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1499-1502, 2010.

DIAS, N. L.; SILVA, D. C. B.; OLIVEIRA, D. C. B. S.; FONSECA JUNIOR, A. A.; SALES, M. L.; SILVA, N. Detection of genes *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1547-1552, 2011.

DOBINSKY, S.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the icaADBC operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. **Plasmid Bethesda**, v. 47, p. 10-17, 2002.

DOMINGUES, P. F.; LUCHEIS, S. B.; SERRÃO, L. S.; FERNANDES, S.; CONTENTE, A. P. A.; MARTINS, E. C. V.; LANGONI, H. Etiology and bacterial sensibility of subclinical mastitis in ewes of Santa inês breed. **Ars Veterinária**, v. 22, p. 146-152. 2006.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

ERGÜN, Y.; ASLANTAŞ, Ö.; KIREÇCI, E.; ÖZTÜRK, F.; CEYLAN, A.; BOYAR, Y. Antimicrobial susceptibility, presence of resistente genes and biofilm formation is coagulase negative staphlococci isolated from subclínical sheep mastitis. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 18, n. 3, p. 449-456, 2012.

EUROPEAN COMISSION. **Veterinary Medicinal Products Administered via the Teat Duct to Cows at Drying off for the Treatment of Subclinical Mastitis and Prevention of New Infections.** Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-7/a/7ae20a_en.pdf>. [Acesso em 2010].

FERNANDES, J. C. T.; CARDOSO M. R. I. Mamite ovina causada por *Staphylococcus aureus*. Primeira observação no Brasil. **Arquivo Faculdade de Veterinária**. UFRGS, Porto Alegre, v. 13, p. 71-74. 1985.

FERREIRA, D. H.; CARVALHO, M. D. G.; NARDELLI, M. J.; SOUZA, F. G. C.; OLIVEIRA, C. J. B. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 633-636, 2014.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Evidence for icaADBC-independent biofilm developmente mechanism in meticilin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1973-1976, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar. Tradução: Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt.** Porto Alegre: Artemed editora, 424p. p. 171-173, 2002.

FRANÇA, C. A.; PEIXOTO, R. M.; CAVALCANTE, M. B.; MELO, N. F.; OLIVEIRA, C. J. B.; VESCHI, J. A.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Antimicrobial resistance os *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 747-753, 2012.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo. Editora Abreu, 2005.

FRANTIŠEK, Z.; VASIL, M.; ELEČKO, J.; FARKAŠOVÁ, Z.; CHRIPKOVÁ, M. Antibiotic resistance and production of enterotoxins of *Staphylococcus* spp. Isolated from samples of milk in dairy sheep. **International Journal of Latest Research in Science and Technology**, v. 3, n. 6, p. 99-102, 2014.

GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Characterization of Staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 548-553, 1980.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÓTZ, F.; Characterization of the N-acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. **Journal og Biological Chemistry**, v. 273, p. 18586-18593, 1998.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J. R.; ARCARI, M. A.; MARTINS, C. M. M. R.; LEE, S. H. I.; OLIVEIRA, C. A. F.; SANTOS, M. V. Capacidade de produção de biofilme de *Staphylococcus* coagulase negative e *Corynebacterium* spp. isolados de mastite subclínica ovina. **XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia**, 2014.

GONZALO C.; TARDÁGUILA J. A.; DE LA FUENTE L. F.; SAN PRIMITIVO F. Effect of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. **Journal Dairy Research**, v. 71. p. 33-38, 2004.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, Baltimore, v. 43, p. 1367-1378, 2002.

GREENACRE, M. **La Pratica del Analisis de Correspondencias**. Bilbao: Fundacion BBVA, 2008.

GUARANÁ, E. L. S.; SANTOS, A.; SILVA e SILVA, N.; CAMPOS, A. G. S. S.; AFONSO, HALE, M. L.; SWIETNICKI, W. Model systems to study a superantigen-induced disease: Toxic shock syndrome. **Infections diseases**, v. 3, n. 1, p. 121-126, 2009.

HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H. F.; Methicilin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 33, n. 7. P. 991-994, 1989.

HAVERI, M.; TAPONEM, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; SALMENLINNA, S.; PYORALA, S. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 959-961, 2005.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 426-430, 1991.

KLOSS, W. E.; SCHLEIFER, K. H.; Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 1, p. 82-88, 1975.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 984. 1994.

LAFFRANCHI, A.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; SALVADOR, R. Aetiology of mammary infections in primiparous during the first four months of lactation. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6. p. 1027-1032, 2001.

LANCASTRE, H.; FIGUEIREDO, A. M. S.; URBAN, C.; RAHAL, J.; TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 632-639, 1991.

LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99-107, 2006.

LATASA, C.; SOLANO, C.; PENADÉS, J. R.; LASA I. Biofilm Associated Proteins. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, p. 849-857, 2006.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Review: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **App Environm Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.

LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; MERIN, U. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 221-225, 2008.

LINAGE, B.; GONZALO, C. Influence of an intramammary infusion at drying-off of combined penethamate hydriodidr, benethmine penicillin, and framycetin sulfate on intramammary infections and somatic cell counts in dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3459-3466, 2008.

LIU, P. F.; LO, C. W.; CHEN, C. H.; HSIEH, M. F.; HUANG, C. M. Use of Nanoparticles as Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Current Drug Metabolism**, v. 10, p.875-884, 2009.

LUCHEIS, S. B.; HERNANDES, G. S.; TRONCARELLI, M. Z. Microbiological monitoring of the region of ovine mastitis Bauru, SP. **Arquivo Instituto Biológico**. v. 77, n. 3, p. 395-403, 2010.

MACHADO, A. B. M. P. **Resistência a meticilina mediada pelo gene mecA nos *Staphylococcus spp. coagulase negativa*. 2007. 162 f. Dissertação** (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 162, 2007.

MAKI, H.; MURAKAMI, K, Formation of potente hybrid promoters of the mutante *lIm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v. 179, n. 22, p. 6944-6948, 1997.

MANIERI, F. Z.; LOPES, N. S. S.; FIM JUNIOR, G. A.; PILON, L. E.; SANTANA, R. C. M.; ZAFALON, L. F. Relação entre a contagem de células somáticas do leite de ovelhas com mastite subclínica e a cura da doença após o tratamento à secagem. In: VI Jornada Científica, 2014, São Carlos. **Anais ... Embrapa São Carlos**. p. 110, 2014.

MARIANO, F. A.; FOLLY, M. M.; TEIXEIRA, G. N.; CARMO, L. S.; VIEIRA-da-MOTTA, O. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 14, n. 2, p. 105-110, 2007.

MARQUES, C. S.; REZENDE, J. G. O. S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.

MARQUES, V. F.; SOUZA, M. M. S.; MENDONÇA, E. C. L.; ALENCAR, T. A.; PRIBUL, B. R.; COELHO, S. M. O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E. B. Phenotypic and genotypic of virulence in *Staphylococcus* spp. and its clonal dispersion as a contribution to the study of bovine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 161-170, 2013.

MARTINS, K. B. **Caracterização do perfil clonal, fatores de virulência e determinação da resistência em *Staphylococcus* spp isolados de leite ovino**. 2013 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Botucatu, SP, 2013.

MARTINS, K. B.; ZAFALON, L. F.; DIAS, W. A. F.; VERÍSSIMO, C. J.; ESTEVES, S. N. Composição do leite ovino em animais com mastite subclínica infecciosa. In: I Jornada Científica 2009, São Carlos. **Anais ... Embrapa São Carlos** 2009.

MAVROGIANNI, V. S.; CRIPPS, P. J.; BROOKS, H.; TAITZOGLU, I. A.; FTHENAKIS, G. C. Presence of subepithelial lymphoid nodules in the teat of ewes. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia, histologia, embryologia**, v. 36, p. 168-171, 2007.

MCDUGALL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, MCDUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DENANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 3 p. 245-254, 2001.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections. **Veterinary Journal**, v. 171, p. 398-407, 2006.

MELO, C. B.; ALMEIDA, B. M.; OLIVEIRA, A. A.; AZEVEDO, H. C.; MELO, L. S. S.; MATA, S. S. Avaliação de uma metodologia profilática contra a mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 1011-1013, 2008.

MELO, P.C. **Estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilme isoladas do ambiente de ordenha.** 2011 140f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, D. A.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 859-864, 2012.

MENZIES P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 2. p. 333-355, 2001.

MIDDLETON, J. R.; FOX, L. K. **Influence os *Staphylococcus aureus* strains on mammary quarter milk production.** In: Proc. 39th Annu. Mtg. National Mastitis Council. p. 179-180, 2001.

MORAIS, G.; ALMEIDA, A. C.; MAGALHÃES TEIXEIRA, L.; REIS XAVIER, M. T.; DE SOUZA, R. M.; ROBSON DUARTE, E. Characterization of ovine mastitis in Santa Inês sheep in the north of Minas Gerais: Occurrence, etiology and epidemiology. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 164-171, 2011.

MORONI, P.; PISONI, G.; VARISCO, G.; BOETTCHER, P. Effect of intramammary infection in Bergamasca meat sheep on milk parameters and lamb growth. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 340-344, 2007.

MOTA, R. A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 3, p. 57-61, 2008.

MURAKAMI, K.; MINAMIDO, W. Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2240-2244, 1991.

NACCARI, F.; MARTINO, D.; GIOFRÉ, F.; PASSANTINO, A.; DE MONTIS, P. Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 1-9, 2003.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1316-1318, 2007.

NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands os staphylococci. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 585-594, 2001.

OLIVEIRA, A. A.; SIMÕES, T. V. M. D.; AZEVEDO, H. C.; TEIXEIRA, K. M.; MELO, P. O.; EMÍDIO, K. S.; OLIVEIRA, S. S. Mastitis monitoring and determination of milk composition in first lambing Santa Inês ewes. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 66**. Embrapa Tabuleiros Costeiro. 19p. 2012.

OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R. R. Biofilm bactéria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 6, n. 2, p. 86-92, 2002.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

PENGOV, A. The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 572-574, 2001.

PEREIRA, I. A. **Etiologia dos processos infecciosos e abordagem sobre a avaliação em *Staphylococcus* spp. dos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de uso clínico em cães e gatos.** 2010, 158 f Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

PEREIRA, P. F. V.; STOTZER, E. S.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E.; LISBÔA, J. A. N. Risk factors, etiology and clinical aspects of mastitis in meat ewes of Parana, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 1, p. 1-10, 2014.

PILIPČINCOVÁ, I.; BHIĐE, M.; DUDRIKOVÁ, E.; TRÁVNIČEK, M. Genotypic characterization of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from sheep Milk in Slovakia. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 79. p. 269-275, 2010.

PILON, L. E. **Perfil microbiológico e de resistência dos *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de novilhas tratadas no pré-parto.** 2012, 82 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável). Instituto de Zootecnia – SP. Nova Odessa, 2012.

PILON, L. E.; ZAFALON, L. F.; SANTANA, R. C. M.; FIM JUNIOR, G. A.; MANIERI, F. Z.; LOPES, N. S. S. Coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from the mammary gland of sheep with subclinical mastitis. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 5, p. 34-39, 2014.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHLER, C.; BENITA, S. Em *Polymeric Biomaterials*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, cap. 16. 1994.

QIN, Z.; YANG, X.; YANG, L.; JIANG, J.; OU, Y.; MOLIN, S.; QU, D. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates, **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 83-93, 2007.

RASMUSSEN, T. B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296(2-3), p. 149-161, 2006.

RICARDO, S. B. Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na Comunidade. **Prática Hospitalar**, v. 5, n. 34, 2004.

ROSA, J. O.; MOURA, J. P.; PALOS, M. A. P.; GIR, E.; REIS, C.; KIPNIS, A.; CANINI, S. R. M. S.; BELISSIMO-RODRIGUES, F.; PIMENTA, F. C. Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes á oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42. p. 398-403. 2009.

SAHM, D. F. *Streptococci* and *staphylococci*: laboratory considerations for in vitro susceptibility testing. **Clinical microbiology Newsletter**, v. 16, p. 9-14, 1994.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 221p. 1998.

SANTANA, R. C. M.; ZAFALON, L. F.; ESTEVES, S. N.; TANAKA, E. V.; PILON, L. E.; MASSA, R. Occurrence of etiologic agents causing subclinical mastitis in Morada Nova and Santa Inês ewes. **Ars Veterinária**. v. 29, n. 3, p. 148-152, 2014.

SANTOS, R. A.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; SIMÃO, L. C. V. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 6-12, 2007.

SAS Institute Inc., System for Microsoft Windows, Release 9.3, Cary, NC, USA, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737. 2003.

SCHALM, O. W.; & NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-207, 1957.

SILVA, G. V. Identificação das espécies de *Staphylococcus* presentes no leite ovino. **Revista Verde** (Mossoró – RN), v. 7, n. 4, p. 188-194, 2012.

SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; KUNG, E. S.; NASCIMENTO, R. B.; FERNANDES, M. F. T. S.; BEZERRA, M. J. G.; SÁ, S. G.; RIBEIRO, M. N.; MOTA, R. A. Etiology of mastitis in native goats and sheeps born and raised in Brazilian semi-arid biom. **Medicina Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 26-31, 2013.

SILVA, N. S.; SILVEIRA, J. A. S.; PINHEIRO, C. P.; SOUSA, M. G. S.; OLIVEIRA, C. M.; MENDONÇA, C. L.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de ovelhas com mastite na região nordeste do estado do Para. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1043-1048, 2010.

SMITH, T. H.; FOX, L. K.; MIDDLETON, J. R. Outbreak of mastitis caused one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, p. 553-556, 1998.

SPANU, C.; BERGER, Y. M.; THOMAS, D. L.; RUEGG, P. L. Impact of intramammary antimicrobial dry treatment and teat sanitation on somatic cell count and intramammary infection in dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v. 97, p. 139-145, 2011.

STAT SOFT INC. Statistica (data analysis software system) version 7. Disponível em <http://www.statsoft.com>, 2004.

STILES, B. G.; KRAKAUER, T. Staphylococcal enterotoxins: a purging experience in Review, Part q. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 27, n. 23, p. 179-186, 2005.

TANAKA, E. V.; ZAFALON, L. F.; SANTANA, R. C. M. Uso do *California Mastitis Test* e da contagem de células somáticas para a seleção de ovelhas para o tratamento contra a mastite subclínica. In: **V Jornada Científica**, São Carlos, **Anais ...** São Carlos, Embrapa Pecuária Sudeste e Embrapa Instrumentação, 2013.

TEJADA, T. S.; SILVA, D. T.; DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; MÜLLER NETO, H.; TIMM, C. D. Subclinical mastitis caused by *Staphylococcus* coagulase-negative in meet-producing sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 1074-1076, 2012.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H. B.; LENCASTRE, H. M.; JABES, D.; McDOUGALL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicilin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PP2a gene and contain normal penicilin-binding with penicilin-binding capacity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 1869-1874, 1989.

TORMO, M. Á.; KNECHT, E.; GÖTZ, F.; LASA, I.; PENADÉS, R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer. **Journal Microbiology**, v. 151, p. 2465-2475, 2005.

TRINDAD, P.; NICKERSON, S. C.; ALLEY, T. K. Prevalence of intramammary and teat canal colonization in unbreed and primigravid dair heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 107-114, 1990.

TRONCARELLI, M. Z.; BRANDÃO, H. M.; GERN, J. C.; GUIMARÃES, A. S.; LANGONI, H. Bovine mastitis under nanocontrol: nanostructured própolis as a new perspective of treatment for organic dairy cattle, **Veterinária e Zootecnia**, v. 20. p. 124-136, 2013.

UNDERWOOD, C.; EPS, A.W. Nanomedicine and Veterinary science: The reality and the pratically. **The Veterinary Journal**. v. 193. p. 12-23, 2012.

VAUTHLER-HOLTZSCHERER, C.; BENABBOU, S.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; COUVREUR. **STP Pharma Science**, v. 1, p. 109. 1991.

VAZ, A .K. **Mastite em ovinos**. Hora Veterinária. Porto Alegre, v. 16, p. 75-77, 1996.

VERÍSSIMO, C. J.; NASSAR, A. F. C.; RODRIGUES, A. D.; KATIKI, L. M.; BUENO, M. S. Mastite em ovelhas primíparas em rebanho sob manejo intensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69. p.125. 2007.

VERÍSSIMO, C. J.; ZAFALON, L. F.; OTSUK, I. P.; NASSAR, A. F. C. Prejuízos causados pela mastite em ovelhas Santa Inês. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77. p. 583-591. 2010.

VESCHI, J. L. A. Effects if infectious subclinical mastitis on the performance of lambs in Santa Ines breed. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 35, n. 4, p. 299-305, 2013.

WONG, A .C. L.; BERGDOLL, M. S. **Staphylococcal food poisoning**. In: Cliver, D.O.; Reimann, H.P. Foodborne diseases. 2.ed. Amsterdan: Academic Press, p. 231-248, 2002.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. **Water Science and Technology**, v. 49, p. 327-336, 2004.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; VESCHI, J. L. A. Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 269-277, 2009.

ZAFALON, L. F.; MARTINS, K. B.; DIAS, W. A. F.; VERÍSSIMO, C. J.; ESTEVES, S. N.; VESCHI, J. L. A. Effects of infectious subclinical mastitis on the performance of lambs in Santa Ines breed. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 35, n. 4, p. 299-305, 2013.

ZAFALON, L. F.; MARTINS, K. B.; DIAS, W. A. F.; VERÍSSIMO, C. J.; ESTEVES, S. N. Infectious etiology of subclinical mastitis in sheep flocks for meat production. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n.4, p. 568-576, 2010.

ZAFALON, L. F.; VERÍSSIMO, C. J.; MAMIZUKA, K. B.; ALMEIDA, L. M.; VESCHI, J. L. A. Oxacilin-resistant *Staphylococci* isolated from ovine subclinical mastitis. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 1-7, 2012.

ZAFALON, L. F.; VESCHI, J. L. A.; BRANDÃO, H. M.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTANA, R. C. M. Controle da mastite subclínica ovina à secagem com o uso de antimicrobiano nanoparticulado. In; **V Conferência Nacional de Defesa Agropecuária**, Santa Catarina. **Anais ... Florianópolis; Defesa Agropecuária**, 2014.

14 - Anexos

Tabela 15. Resultados do CMT obtidos das metades mamárias durante o pré-tratamento.

Grupos	Resultados do CMT							
	Negativo		1+		2+		3+	
	N	%	N	%	N	%	N	%
G1	6	28,6	1	4,8	2	9,7	12	57,1
G2	7	36,9	3	15,0	4	21,0	5	26,3
G3	3	15,0	9	45,0	3	15,0	5	25,0

G1: Grupo controle, composto de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: Ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina).

N: número de animais.

Tabela 16. Médias da CCS das amostras de leite coletadas durante o pré-tratamento das ovelhas portadoras de mastite subclínica.

Grupos	CCS < 250 x 10 ⁵	CCS ≥ 251 e < 500 x 10 ⁵	CCS > 501 x 10 ⁵
	células/ mL de leite	células/ mL de leite	células/ mL de leite
G1	136.000	403.000	3,789.000
G2	-	328.000	2,578.000
G3	130.000	388.000	2,520.000

G1: Grupo controle, composto de ovelhas que não receberam antimicrobiano intramamário; G2: Grupo de ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano convencional (100 mg de cloxacilina-benzatina) e G3: Ovelhas que foram tratadas com antimicrobiano nanoencapsulado (50 mg de cloxacilina-benzatina).

CCS: Contagem de células somáticas.

Tabela 17. Tabela das probabilidades, das respectivas tabelas de contingência, geradas pelo teste de qui-quadrado.

	S. <i>warneri</i>	S. <i>simulans</i>	S. <i>epidermidis</i>	S. <i>xyloso</i>	<i>sec</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>	cura aos 15 dias pós- parto	cura aos 30 dias pós- parto	reinfecção
grupos	0,338	0,616	0,429	0,838	0,023	0,277	0,037	0,213	0,116	0,072	0,978
<i>S. warneri</i>	-	0,002	0,020	0,030	0,096	0,068	0,766	0,236	0,522	0,301	0,910
<i>S. simulans</i>		-	0,027	0,040	0,856	0,264	0,766	0,236	0,522	0,301	0,910
<i>S. epidermidis</i>			-	0,125	0,160	0,362	0,459	0,534	0,710	0,935	0,377
<i>S. xyloso</i>				-	0,713	0,960	0,030	0,020	0,120	0,293	0,451
<i>sec</i>					-	0,869	0,766	0,236	0,522	0,801	0,910
<i>icaC</i>						-	0,056	0,488	0,381	0,268	0,488
<i>icaD</i>							-	0,213	0,753	0,592	0,978
<i>bap</i>								-	0,550	0,658	0,052
cura aos 15 dias pós-parto									-	0,0001	0,073
cura aos 30 dias pós-parto										-	0,658
reinfecção											-

sec: gene responsável pela produção de enterotoxina. *icaC*, *icaD* e *bap*: genes responsáveis pela produção de biofilme.