

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

**FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Staphylococcus* spp.
EM LEITE DE VACAS COM TRATAMENTO NÃO
CONVENCIONAL DA MASTITE**

**Elka Machado Ferreira
Médica Veterinária**

2020

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

**FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Staphylococcus* spp.
EM LEITE DE VACAS COM TRATAMENTO NÃO
CONVENCIONAL DA MASTITE**

Discente: Elka Machado Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutora em Medicina
Veterinária**

F383f	Ferreira, Elka Machado Fatores de patogenicidade de <i>Staphylococcus</i> spp. em leite de vacas com tratamento não convencional da mastite / Elka Machado Ferreira. -- Jaboticabal, 2020 90 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Luiz Francisco Zafalon 1. Mastite. 2. Homeopatia veterinária. 3. Microbiologia dos laticínios. 4. Resistência a metilicina. 5. Eletroforese em campo pulsátil. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

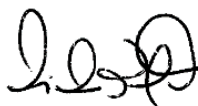
TÍTULO DA TESE: FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Staphylococcus* spp. EM LEITE DE VACAS COM TRATAMENTO NÃO CONVENCIONAL DA MASTITE

AUTORA: ELKA MACHADO FERREIRA

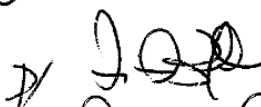
ORIENTADOR: LUIZ FRANCISCO ZAFALON

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

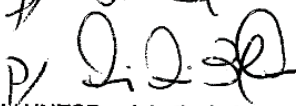
Pesquisador Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON
EMBRAPA Pecuária Sudeste / São Carlos/SP



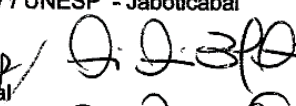
Profa. Dra. MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA
Depto. de Microbiologia e Imunologia / IB/Botucatu - Unesp
(VIDEOCONFERÊNCIA)



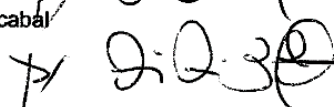
Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS
Depto. Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Prof. Dr. GABRIEL AUGUSTO MARQUES ROSSI
Departamento de Medicina Veterinária-UNICEP / São Carlos/SP
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Jaboticabal, 28 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ELKA MACHADO FERREIRA – Nascida em 27 de junho de 1984 na cidade de São Luís – MA, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís, MA, em setembro de 2003, concluindo em setembro de 2009. Foi bolsista de iniciação científica com o projeto intitulado: Qualidade sensorial e físico-química do camarão salgado seco descascado comercializado na Ilha de São – MA, sob orientação da professora MSc. Maria de Fátima Viégas Lima, com vigência de agosto de 2007 a julho de 2008. Além de ter desenvolvido atividades como bolsista de iniciação a extensão com projeto intitulado: Educação em saúde para ordenhadores de leite de cabra no município de São Luís - MA, sob orientação da professora Dra. Lenka de Moraes Lacerda, no período de março a agosto de 2009. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal na Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, campus São Luís - MA, em março de 2010, obtendo o título de mestre em julho de 2012. Atuou como professora conteudista do Curso Técnico em Tecnologia de Alimentos no Polo de Educação a Distância – UEMANet, São Luís – MA, entre dezembro de 2012 e abril de 2013. Integrou a equipe do Setor de Bolsas da Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico do Maranhão - FAPEMA, entre junho de 2013 e maio de 2016. Em julho de 2016 ingressou no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível doutorado, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp/ FCAV.

Nada te perturbe, nada te espante, tudo passa! Só Deus não muda. A paciência,
por fim, tudo alcança. Quem a Deus tem, nada lhe falta, pois só Deus basta.

(Santa Teresa D'avila)

Aos meus pais, Manoel do Espírito Santo e Maria da Vitória, por todo amor,
cuidado, ensinamentos e investimento em minha educação. Amo vocês!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, sabedoria e por nunca desistir de mim;

À Capes e à Fapesp, pela concessão da bolsa e do financiamento necessários para realização deste experimento;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelo fornecimento de toda estrutura física e humana necessária a minha formação e execução do experimento;

Ao meu orientador, Luiz Francisco Zafalon, pelo aceite para minha orientação em momento em que estava distante da vida acadêmica, pelos ensinamentos, apoio, paciência e confiança depositada;

À professora Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, por abrir as portas de seu laboratório e permitir que eu trabalhasse com algo que sonhava: a biologia molecular. Além do apoio, ensinamentos, paciência e palavras de incentivo;

À minha família, por ser minha base e sempre me apoiar e acreditar nos meus sonhos, em especial aos meus pais, que não mediram esforços para que meus irmãos e eu tivéssemos uma boa educação;

Ao meu namorado, Adriano, pelo apoio, refúgio e cumplicidade;

À equipe do laboratório de bacteriologia do IB - UNESP: Nathália, Thaís, Ana, Nayara, Mariana e Carol, pelos conhecimentos, apoio, paciência e amizade, em especial ao Lucas e à Letícia, pela companhia aos finais de semana e em horários inusitados; sem vocês eu não teria chegado tão longe, amo vocês!

À equipe do laboratório de micologia do IB - UNESP: Hans, Daniele, Carol, Alana, Giselle e Alana, pela amizade, boas risadas, companheirismo, apoio, ensinamentos e por sempre me socorrerem!

Aos doutores Priscila, Danilo, Luiza e Valéria, pelo apoio e ensinamentos;

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste: Wilson, Flávia e Lea, pelo apoio ensinamentos e amizade;

Às minhas amigas queridas que me acolheram em seus lares durante esta jornada de idas e vindas: Aline, Verônica, Amanda, Bruna e Nadja, amo vocês!

A todos que não foram aqui mencionados, mas que fizeram com esta caminhada fosse mais leve, meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Mastite bovina.....	3
2.2 <i>Staphylococcus</i> spp. envolvidos em mastites bovinas.....	5
2.3 Biofilmes compostos por <i>Staphylococcus</i> spp.....	7
2.4 Toxinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp.....	9
2.5 Resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> spp. em mastites bovinas.....	11
2.6 Homeopatia para o tratamento da mastite bovina.....	12
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 Geral.....	14
3.2 Específicos.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Aprovação pelo comitê de ética.....	15
4.2 Formação dos grupos de animais e seleção de princípios ativos.....	15
4.3 Colheitas de amostras de leite e detecção da mastite.....	16
4.4 Identificação prévia de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados no leite bovino.....	16
4.5 Extração de DNA e identificação molecular de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	17
4.6 Detecção de genes codificadores para enterotoxinas, <i>tsst-1</i> , <i>eta</i> e <i>pvl</i>	18
4.7 Detecção de genes codificadores para a produção de biofilme.....	19
4.8 Detecção do gene <i>mecA</i> e gene <i>blaZ</i> de resistência à meticilina e à penicilina.....	20
4.9 Determinação do tipo de SCCmec (<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>).....	21
4.10 Visualização dos produtos amplificados.....	21
4.11 Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (TCP).....	21
4.12 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	22
4.13 Determinação do perfil genético de estipes de <i>Staphylococcus</i> spp. por Pulsed-Field Gel Electroforesis (PFGE).....	23
4.14 Multilocus Sequence Typing (MLST).....	24
4.15 Metodologia estatística.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	56
7 REFERÊNCIAS.....	57



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



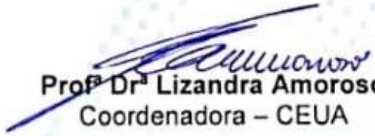
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Fatores de patogenicidade de *Staphylococcus* spp. em leite de vacas com tratamento não convencional da mastite**", protocolo nº 007921/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 01 de junho de 2017.

Vigência do Projeto	01/08/2017 a 01/07/2020
Espécie / Linhagem	Não se aplica
Nº de animais	Não se aplica
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

Jaboticabal, 01 de junho de 2017.


Prof. Dr. Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Staphylococcus* spp. EM LEITE DE VACAS COM TRATAMENTO NÃO CONVENCIONAL DA MASTITE

RESUMO – Objetivou-se caracterizar e comparar a formação de biofilme, suscetibilidade a antimicrobianos *in vitro*, presença e distribuição de genes de virulência e de resistência antimicrobiana, além de determinar a diversidade clonal de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas em leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia. Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram identificados por reação em cadeia da polimerase-espaco transcrito interno (ITS-PCR) e foram investigados quanto a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tsst-1*, *pvl* e *eta* codificadores de toxinas, dos genes *icaABCD*, *bap*, *aap*, *atlE* e *bhp* relacionados com a produção de biofilme e dos genes *blaZ* e *mecA* associados com a resistência antimicrobiana. Amostras *mecA* positivas foram tipadas para o tipo SCCmec por *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (PCR Multiplex), enquanto a pesquisa de produção *in vitro* de biofilme ocorreu pelo método de aderência em placas de poliestireno. O perfil de resistência antimicrobiana foi determinado pelo método de disco-difusão em ágar e o perfil de restrição enzimática por *Pulsed-Field Gel Electroforesis* (PFGE). Clusters de *S. aureus* e *S. epidermidis* com três ou mais isolados tiveram uma linhagem selecionada para tipagem por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), cujas sequências foram analisadas por banco de dados (<http://www.mlst.net>). Verificou-se prevalência de *S. aureus* (50,5%), que apresentou distribuição semelhante nos dois grupos, enquanto *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (CoNS) (70,8%) foram frequentes em vacas tratadas ($p=0,036$). O gene *sec* ocorreu apenas em *S. chromogenes*, com maior frequência em animais tratados ($p=0,004$) e o gene *pvl* foi encontrado em 66,7% de *S. aureus*. O operon *icaADBC* e os genes *icaA* e *icaD* associados prevaleceram em *S. aureus*, porém o gene *icaD* foi predominante no grupo de vacas tratadas ($p=0,012$). Os genes *atlE* e *aap* foram carregados apenas por *S. epidermidis*. Entre as estirpes com produção de biofilme *in vitro*, 76,8% continham pelo menos um gene relacionado com esta característica. Os genes *mecA* e *Blaz* apresentaram distribuição similar em vacas tratadas e não tratadas, porém *mecA* foi identificado apenas em *S. epidermidis* (12,1%), todos tipados como SCCmec tipo I. A susceptibilidade antimicrobiana revelou um perfil de multirresistência em 29,3% das estirpes. Houve predominância de um *cluster* majoritário em *S. epidermidis* e *S. chromogenes*, o que não ocorreu para *S. aureus*. A sequência do tipo (ST) 81 foi predominante em *S. epidermidis*, enquanto as STs 1, 5 e 126 em *S. aureus*. A presença de genes de toxinas, resistência antimicrobiana e biofilme, bem como a produção *in vitro* deste fator de patogenicidade, aliados à persistência de perfis clonais bacterianos, demonstram que sistemas em transição para manejos orgânicos podem representar risco à saúde pública pela circulação de patógenos zoonóticos em leite bovino. Medidas eficazes devem ser tomadas no controle dos produtos lácteos e manejo dos animais.

Palavras-chave: multirresistência, homeopatia, persistência bacteriana, biofilmes

PATHOGENICITY FACTORS OF *Staphylococcus* spp. IN MILK FROM COWS RECEIVING UNCONVENTIONAL MASTITIS TREATMENT

ABSTRACT – The present study aimed to characterize and compare biofilm formation, *in vitro* antimicrobial susceptibility, and the presence and distribution of virulence and antimicrobial resistance genes, as well as to determine the clonal diversity of *Staphylococcus* spp. strains isolated in milk from cows treated or not with homeopathy. The *Staphylococcus* spp. isolates were identified by polymerase chain reaction targeting the internal transcribed spacer (ITS-PCR) and were investigated regarding the presence of the *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tsst-1*, *pvl*, and *eta* toxin-encoding genes, the *icaABCD*, *bap*, *aap*, *atlE*, and *bhp* genes, related to the production of biofilm, and the *blaZ* and *mecA* genes, which are associated with antimicrobial resistance. *mecA*-positive samples were typed for SCC*mec* by *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (Multiplex PCR), while the assessment of *in vitro* biofilm production was carried out using the polystyrene plate adhesion method. The antimicrobial resistance profile was determined using the agar disc diffusion method, and the enzyme restriction profile, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Clusters of *S. aureus* and *S. epidermidis* with three or more isolates had one strain selected for typing by Multilocus Sequence Typing (MLST), and the sequences were analyzed on an online database (<http://www.mlst.net>). A 50.5% prevalence of *S. aureus* was observed, with similar distribution in both groups, while coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CoNS) were frequent (70.8%) in treated cows ($p=0.036$). The *sec* gene was found only in *S. chromogenes* and more frequently in treated animals ($p=0.004$), while the *pvl* gene was observed in 66.7% of the *S. aureus*. The *icaADBC* operon and the associated *icaA* and *icaD* genes prevailed in *S. aureus*, although the *icaD* gene was predominant in the treated cows group ($p=0.012$). The *atlE* and *aap* genes were carried only by *S. epidermidis*. Among the strains presenting *in vitro* biofilm production, 76.8% had at least one gene related to this trait. The *mecA* and *Blaz* genes exhibited similar distribution in treated and untreated cows, although *mecA* was identified only in *S. epidermidis* (12.1%), all of which were typed as SCC*mec* type I. The antimicrobial susceptibility assay revealed a multiresistance profile in 29.3% of the strains. There was a predominance of a major cluster in *S. epidermidis* and *S. chromogenes*, which did not occur for *S. aureus*. Sequence type (ST) 81 was predominant in *S. epidermidis*, while STs 1, 5, and 126 were prevalent in *S. aureus*. The presence of genes related to toxin production, antimicrobial resistance, and biofilm formation, as well as the *in vitro* production of this pathogenicity factor, combined with the persistence of bacterial clonal profiles, demonstrate that systems in transition to organic management can represent a risk to public health due to the circulation of zoonotic pathogens in bovine milk. Effective measures must be taken to control dairy products and animal management.

Keywords: multiresistance, homeopathy, bacterial persistence, biofilms

LISTA DE ABREVIATURAS

Aap: proteína associada à acumulação

AGR: genes resistência antimicrobiana

AtlE: autolisina E

BAP: proteína associada ao biofilme

BHI: brain heart infusion

Bhp: proteína homóloga à BAP

CCS: contagem de células somáticas

CDC: centers for disease control and prevention

CEUA: comissão de ética no uso de animais

CoNS: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos

CoPS: *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos

ETs: toxinas esfoliativas estafilocócicas

ITS-PCR: reação em cadeia da polimerase-espaco transcrito interno

MDR: micro-organismos multirresistentes

MGE: elementos genéticos móveis

MLST: Multilocus Sequence Typing

MRCoNS: *Staphylococcus* spp. coagulase negativo meticilina resistente

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

MRSE: *Staphylococcus epidermidis* meticilina-resistente

PBP2a: proteína com baixa afinidade à penicilina

PBS: tampão fosfato salina

PFGE: pulsed-field gel electroforesis

PIA: adesão intercelular de polissacarídeos

PVL: leucocidina Pantón-Valentine

SAGs: superantígenos

SaPIs: ilhas de patogenicidade estafilocócica

SCC*mec*: cassete cromossômico estafilocócico *mec*

SCCs: cassetes cromossômicos estafilocócicos

SE: enterotoxinas estafilocócicas

SSSS: síndrome da pele escaldada estafilocócica

TBE: tampão tris-borato-EDTA

TSB: trypticase soy broth

TSS: síndrome do choque tóxico - 1

TSST-1: toxina da síndrome do choque tóxico - 1

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR para a identificação genotípica de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na técnica de ITS-PCR para a identificação genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. não aureus.....	18
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção de genes de toxinas.....	19
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes envolvidos na formação de biofilme.....	20
Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes envolvidos na resistência antimicrobiana.....	21
Tabela 6. Sequências iniciadoras utilizadas para o estudo dos complexos clonais de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados em amostras de leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	24
Tabela 7. Sequências iniciadoras utilizadas para o estudo dos complexos clonais de <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolados em amostras de leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	25
Tabela 8. Número de isolados e frequência de genes relacionados com a produção de toxinas e biofilme, associados e isolados, em estirpes de <i>S. aureus</i> e CoNS em animais tratados e não tratados com homeopatia.....	30
Tabela 9. Percentual de <i>Staphylococcus</i> spp. positivos e negativos para genes do operon <i>icaADBC</i> , <i>atlE</i> , <i>bap</i> , <i>bhp</i> e <i>aap</i> em vacas com mastite subclínica tratadas e não tratadas com homeopatia.....	34
Tabela 10. Frequência de <i>Staphylococcus</i> spp. positivos e negativos para genes do operon <i>icaADBC</i> , <i>atlE</i> , <i>bap</i> , <i>bhp</i> e <i>aap</i> e fenotípico para produção de biofilme em vacas com mastite subclínica tratadas e não tratadas com homeopatia.....	38

Tabela 11. Distribuição de genes de resistência antimicrobiana entre vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	40
Tabela 12. Distribuição de genes de resistência antimicrobiana entre espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	41
Tabela 13. Padrões gerais de susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	43
Tabela 14. Padrões de resistência de estipes de <i>S. aureus</i> isoladas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	45
Tabela 15. Padrões de resistência de estipes de <i>S. epidermidis</i> isoladas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	46
Tabela 16. Padrões de resistência de estipes de <i>S. chromogenes</i> isoladas de vacas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	46
Tabela 17. Perfil de virulência e resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. meticilina resistentes isolados de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia, com as respectivas contagens de células somáticas.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
Figura 1. Frequência (%) de estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.....	27
Figura 2. Distribuição das estirpes de <i>S. aureus</i> e CoNS nos grupos de vacas tratadas com homeopatia e vacas não tratadas.....	29
Figura 3. Mapa perceptual da análise de correspondência entre as variáveis vacas tratadas e não tratadas com homeopatia; agente etiológico e genes de virulência. Linhas pontilhadas valor de $p < 0,05$	39
Figura 4. Dendrograma dos perfis PFGE-Smal de estirpes de <i>S. epidermidis</i> provenientes de vacas não tratadas e tratadas com homeopatia.....	49
Figura 5. Dendrograma dos perfis PFGE-Smal de estirpes de <i>S. chromogenes</i> provenientes de vacas não tratadas e tratadas com homeopatia.....	50
Figura 6. Dendrograma dos perfis PFGE-Smal de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de vacas não tratadas e tratadas com homeopatia.....	52

1 INTRODUÇÃO

A mastite consiste na inflamação da glândula mamária, considerada uma das doenças mais comuns em vacas leiteiras (Dai et al., 2020). Dentre os principais agentes etiológicos as bactérias são as maiores causadoras, sendo frequentemente contagiosas e amplamente distribuídas no ambiente de animais leiteiros, contribuindo assim para o aumento da taxa de prevalência das infecções intramamárias (Kibebew, 2017). Em mastites subclínicas, o estafilococo não aureus é o segundo maior causador, após *Staphylococcus aureus* (Persson et al., 2011).

S. aureus possui uma variedade de fatores de virulência que contribuem para o tipo e a gravidade das infecções estafilocócicas. A maioria dos genes de virulência de *S. aureus* é suportada por elementos genéticos móveis (MGE) e pelo tipo de *S. aureus*, portanto, as infecções dependem tanto de características específicas da cepa quanto de características do hospedeiro (Imanishi et al., 2019). Embora *S. aureus* seja o agente mais envolvido na mastite subclínica, estafilococos coagulase-negativos (CoNS) ganharam importância como agentes causadores de infecções intramamárias (Mello et al., 2016), devido a seus diversos fatores de virulência, tanto em humanos quanto em animais (Ruiz-Romero et al., 2018). Muitos *S. aureus* isolados da mastite bovina possuem genes que codificam toxinas superantigênicas, como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs). Estas compõem a família de toxinas pirogênicas, que inclui toxinas clássicas, como enterotoxina estafilocócica (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) e toxinas recém-descritas, como a SEG, SEI e SEK (Fang et al., 2019).

A persistência do *S. aureus* na glândula mamária tem sido associada a múltiplos fatores de virulência (Torres et al., 2019), entre eles a produção de biofilmes. Os mecanismos responsáveis pela produção de biofilmes mais estudados estão relacionados aos biofilmes dependentes da adesão intercelular de polissacarídeos (PIA), associados ao operon *ica*, e aos biofilmes independentes de PIA, geralmente mediados pela proteína associada ao biofilme (BAP), que é codificada pelo gene *bap* (McCarthy et al., 2015). Após formado, o biofilme pode atuar como uma barreira que impede a adsorção/penetração de antimicrobianos, e a matriz promove sua diluição para concentrações subinibitórias (Marques et al., 2017).

Estudos sobre a presença e os efeitos do *Staphylococcus* spp. em sistemas tradicionais de produção de leite são amplamente descritos na literatura. No entanto, em sistemas de produção de leite orgânico os animais são submetidos a métodos alternativos para tratamento da mastite, como a homeopatia, e poucos são os relatos de patógenos e seus genes de virulência envolvidos em mastites de animais criados nesse tipo de sistema.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite bovina

Em vacas leiteiras a mastite é um desafio global, porque prejudica a saúde e o bem-estar dos animais (Ren et al., 2020), além de estar entre as doenças mais caras que a indústria de laticínios enfrenta atualmente (Rocha et al., 2019; Wallis et al., 2019). Este ônus econômico deve-se aos gastos com sua prevenção e tratamento, redução da produção e qualidade do leite e descarte de leite e vacas (Schukken et al., 2011; McMillan et al., 2016; Goetz., 2017; Aghamohammadi et al., 2018; Ren et al., 2020).

A mastite é a inflamação da glândula mamária geralmente causada por patógenos que se desenvolvem na cisterna da glândula e alvéolos após penetração no canal do teto (Banos et al., 2017). A doença infecciosa é definida pela presença de bactérias em conjunto com contagens de células somáticas (CCS) elevadas, em amostras de quartos individuais ou compostas (Tremblay et al., 2013). Pode ocorrer nas formas clínica e subclínica (Kurjogi e Kaliwal, 2014). A forma clínica é caracterizada por início súbito, inchaço e vermelhidão do úbere, dor, febre, depressão e anorexia, além da diminuição e alteração do leite dos quartos afetados, que pode conter coágulos ou flocos e tornar-se aquoso. A forma subclínica caracteriza-se pela ausência de sinais visíveis no úbere ou no leite, porém há aumento de CCS e diminuição da produção (Hamadani et al., 2013; Langoni, 2013) e qualidade do leite, por nem sempre ser detectada pelos produtores, torna-se de desenvolvimento silencioso evoluindo frequentemente para infecções crônicas (Rocha et al., 2019).

Durante a invasão bacteriana no úbere, um pequeno número de células somáticas que estão comumente presentes no leite é mobilizado para o combate à invasão dos micro-organismos. As células somáticas do leite incluem 75% de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) e eritrócitos e 25% de células epiteliais e podem ser utilizadas para monitorar o nível ou a ocorrência de mastite subclínica em rebanhos ou vacas individualmente (Sharma et al., 2011).

A inflamação da glândula mamária possui uma variedade de agentes etiológicos, no entanto, as infecções por bactérias são as principais causas da

mastite (De Vliegher et al., 2012). Em função do impacto sobre a saúde do úbere, os agentes infecciosos da mastite bovina são divididos em primários e secundários (Vanderhaeghen et al., 2015). Os patógenos primários mais frequentes incluem *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, estreptococos e enterococos de origem ambiental (Souza et al., 2009). Entre os patógenos secundários estão espécies de *Staphylococcus* coagulase negativas, tais como *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus epidermidis* (Hamadani et al., 2013). Estudos epidemiológicos nacionais e internacionais destacam o gênero *Staphylococcus* spp. no envolvimento de aproximadamente 50% dos casos de mastite bovina, com ocorrência do *S. aureus* tanto na forma subclínica como clínica (Radostitis et al., 2007; Türkyilmaz et al., 2010; Mello et al., 2016), porém mais frequente em mastites subclínicas (Song et al., 2016).

Os patógenos envolvidos em infecções intramamárias também podem ser classificados em contagiosos e ambientais. Os agentes contagiosos, transmitidos durante a ordenha, incluem *S. agalactiae*, *S. aureus* e *Mycobacterium bovis*, enquanto os agentes ambientais, reconhecidos por estarem no ambiente dos animais, são representados por *Streptococcus* spp. (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus equinus*) e coliformes ambientais (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.) (Hamadani et al., 2013). Os agentes patogênicos contagiosos geralmente causam maior elevação de CCS quando comparados aos ambientais (Sharma et al., 2011).

Uma vez que um animal afetado por mastite tenha sido identificado, a eliminação da doença é importante (Ebert et al., 2017), visto que o leite produzido representa uma ameaça para a saúde humana, pela eliminação constante de grande número de células bacterianas (McMillan et al., 2016). Principalmente em infecções subclínicas, que exibem leite sem alterações sensoriais do produto, contribuindo para a disseminação de micro-organismos pela cadeia de laticínios (Caruso et al., 2016). Acredita-se que para cada caso de mastite clínica confirmada há pelo menos 40 outros animais no rebanho com mastite subclínica (Banos et al., 2017).

As medidas preventivas da transmissão da mastite entre animais geralmente falham em eliminar o problema dos rebanhos leiteiros, pois a transmissão ocorre

principalmente por meio de máquinas de ordenha, panos de limpeza do úbere ou mãos dos ordenhadores. Apesar de décadas de pesquisa, o controle de mastite em rebanhos leiteiros ainda depende de esforços conscientes e contínuos por parte do agricultor ou gerente de rebanho e sua equipe (Zadoks et al., 2011).

2.2 *Staphylococcus* spp. envolvidos em mastites bovinas

O *Staphylococcus* spp. é um gênero de bactérias Gram-positivas (Duracova et al., 2018) que desempenham um papel importante na etiologia das infecções intramamárias em bovinos leiteiros (Marques et al., 2017). São bactérias comensais normais da pele e membranas mucosas de humanos e outros animais (Gómez-Sanz et al., 2019). Até o momento, mais de 50 espécies e subespécies de *Staphylococcus* spp. foram caracterizadas como agentes causais da mastite (Qu et al., 2019).

No diagnóstico da mastite, os estafilococos podem ser divididos em coagulase-positivos (CoPS) e coagulase-negativos (CoNS), com base na capacidade de coagular o plasma de coelho (Xu et al., 2015). Dentre as espécies de CoNS mais prevalentes em infecções intramamárias bovinas tem-se *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. warneri* e *Staphylococcus equorum* (Jenkins et al., 2019), enquanto entre as CoPS destaca-se *S. aureus* (Podkowik et al., 2013). A mastite bovina causada por *S. aureus* e CoNS continua a ser um problema considerável para os produtores de leite em todo o mundo (Darwish e Asfour, 2013).

S. aureus geralmente reside inofensivamente desde em amostras ambientais até na pele e mucosa de humanos e outros animais. No entanto, algumas cepas são altamente patogênicas e frequentemente implicadas em doenças humanas e animais (McMillan et al., 2016), como infecções de pele, abscessos, doenças respiratórias e intoxicação alimentar (Duracova et al., 2018). É possivelmente o patógeno da mastite mais estudado em bovinos leiteiros (Zadoks et al., 2011), caracterizado como oportunista e que pode causar múltiplas infecções com severidade diversa. Sua epidemiologia em animais ganhou interesse nos últimos anos, devido ao surgimento de algumas linhagens clonais associadas aos animais e com potencial zoonótico cada vez mais evidenciado (Lozano et al., 2016).

Pode ser transmitido entre vacas, por meio de contato com leite contaminado, e resultar em mastite subclínica que geralmente é difícil de detectar na fase inicial (Feng et al., 2016).

S. aureus pode também apresentar vários fatores de virulência que incluem produção de antígenos, toxinas e várias proteínas de resistência à antimicrobianos (McMillan et al., 2016), em que a ausência, presença ou combinação destes, determinam as diferenças de contagiosidade de cepas no desenvolvimento da mastite (Magro et al., 2017). Coombs et al. (2020) afirmam que o sucesso de *S. aureus* apresenta capacidade de utilizar elementos genéticos móveis para adquirir e disseminar resistência a antibióticos, virulência e mecanismos adaptativos entre as populações estafilocócicas (Coombs et al., 2020). Tal característica permite sua evasão de quase todas as estratégias de reconhecimento imunológico e consequente sobrevivência durante a infecção, tornando-o adaptado e limitando os esforços para o seu controle (Alonzo e Torres, 2014).

Os CoNS constituem um grupo heterogêneo de bactérias conhecidas como patógenos comuns e frequentemente envolvidos na mastite bovina (Antók et al., 2020), e em medicina humana são patógenos nosocomiais oportunistas (Klibi et al., 2018). Até recentemente, era difícil tirar conclusões consistentes sobre sua relevância na saúde do úbere bovino (Isaac et al., 2017). Porém CoNS atualmente são cada vez mais reconhecidos como causas de mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras em todo o mundo (Qu et al., 2019). Apesar do potencial patogênico bem conhecido, as causas potenciais e os mecanismos permanecem obscuros (Lee et al., 2019). Embora o nível de resposta imunológica de vacas à infecção por CoNS seja moderada, em comparação com a resposta a *S. aureus*, a elevada CCS também contribui para a redução da qualidade do produto e uma diminuição geral da produção de leite no período lactação (Rasooly et al., 2020).

No que diz respeito ao diagnóstico de mastite, o CoNS geralmente não é identificado no nível da espécie e é tratado como um grupo uniforme (Tremblay et al., 2013). No entanto, novos métodos de identificação de CoNS, baseados em biologia molecular, permitem investigações em nível de linhagem e comparação entre diferentes fontes (Taponen et al., 2008). Bem como para *S. aureus*, várias tecnologias de tipagem têm se mostrado úteis para explorar linhagens e traçar sua

relação clonal em investigações epidemiológicas em isolados veterinárias e humanas (Saei e Panahi, 2020).

Nas últimas duas décadas, diversos métodos de fenotipagem e genotipagem foram desenvolvidos ou implementados em estudos com bactérias causadoras de mastite em gado leiteiro. Os métodos de genotipagem usados para caracterizar patógenos variam de simples restrição por digestão até o sequenciamento do genoma total. Tais estudos contribuem para melhor compreensão dos mecanismos de adaptação ao hospedeiro e causa de doenças, além de fornecerem informações sobre a evolução de patógenos e o risco de troca de elementos genéticos ou patógenos entre espécies bacterianas e espécies hospedeiras (Zadoks et al., 2011).

2.3 Biofilmes compostos por *Staphylococcus* spp.

A sobrevivência dos patógenos bacterianos às condições adversas impostas pelo ambiente é possível pela expressão de seus diferentes fatores de virulência (Thänert et al., 2017), cujas funções primárias são inibir as respostas imunitárias do hospedeiro e contribuir para a patogênese da mastite (Üna et al., 2012). Para algumas espécies, como *S. aureus*, a presença de um vasto número de fatores de virulência, muitos codificados por elementos genéticos móveis como os plasmídeos, permite maior versatilidade pela transferência horizontal de genes (Otto, 2014).

Entre os fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. tem-se os biofilmes, constituídos por bactérias aderidas a uma superfície e envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos de natureza proteica ou polissacarídica, denominados glicocálice (Costerton et al., 1999). A estrutura dos biofilmes pode ser encontrada em todas as superfícies abióticas e bióticas (Nakamura et al., 2016) e sua associação à superfície é uma forma eficiente de permanecer em um microambiente favorável, em vez de ser removido (Watnick e Koller, 2000).

Em ambientes naturais, o biofilme é normalmente uma comunidade microbiana multiespécie que abriga bactérias que permanecem e saem com um propósito e compartilham seu material genético a altas taxas (Watnick e Koller, 2000). A formação de biofilme é um processo de desenvolvimento genético desencadeado por sinais de estresse que foram selecionados através da evolução para permitir a sobrevivência bacteriana em condições adversas (Fuente-Núñez et

al., 2013). Sua formação envolve as etapas de aderência, acúmulo, maturação e dispersão, em que a inicial é mediada por proteínas ancoradas na parede celular como (proteína homóloga à BAP) Bhp e AtlE (autolisina E). O estágio acumulativo é caracterizado pela produção de PIA codificada pelo operon *icaADBC*, além da formação de biofilme independente de PIA por meio de proteínas associadas à superfície celular, Aap (proteína associada à acumulação) (Soumya et al., 2017) e BAP (Guo et al., 2019).

A síntese de biofilmes codificadas pelo locus *ica* do operon *icaADBC* é responsável pela produção da N-acetilglucosamina polimérica, principal componente da matriz de biofilmes estafilocócica que está relacionada à adesão intercelular (Feng et al., 2017). Enquanto AtlE é uma autolisina bifuncional com um domínio alanina amidase N-terminal, de ancoragem na parede celular central, que consiste em três repetições (R1 a R3), cada uma com cerca de 165 aminoácidos e um domínio de glucosaminidase C-terminal (Sivadon et al., 2006), a Aap é uma proteína com função na adesão e agregação intercelular (Salgueiro et al., 2017), capaz de formar tufo de fibrilas proteicas localizadas na superfície celular (Soumya et al., 2017) e mediar formação de biofilme na ausência de PIA (Schaeffer et al., 2015). A BAP é de superfície e possui 239 KD, cuja proteína homóloga é denominada Bhp (Peerayeh et al., 2016), e que tem função de auxiliar na adesão intercelular e na formação de biofilme (Marques et al., 2017).

A composição de um biofilme maduro inclui a incorporação de íons metálicos e macromoléculas, como proteínas, DNA, lipídeos e substâncias orgânicas, que conferem ao biofilme uma estrutura tridimensional (Soumya et al., 2017). Neste estágio, os biofilmes produzem compostos que induzem sua dispersão, permitindo a colonização de novas superfícies (Fuente-Núñez et al., 2013). A espessura e a composição do biofilme contribuem para sua funcionalidade, em que a matriz polimérica atua como barreira e reduzindo ou bloqueando a difusão de antibióticos. Deste modo, um biofilme mais espesso dificulta a penetração dos antibióticos e o alcance de células bacterianas. Além disso, cargas eletrostáticas na superfície da matriz se ligam aos agentes microbianos e impedem que eles atinjam sua concentração efetiva (Goetz et al., 2017), o que levaria a maior resistência aos

antimicrobianos devido à redução da penetração antimicrobiana e à troca mais fácil de genes de resistência entre células (Montazeri et al., 2020).

Portanto, uma infecção por biofilme é geralmente uma infecção crônica com exacerbações intermitentes, em que tratamentos com antibióticos podem ser úteis no controle das exacerbações agudas, no entanto difíceis de erradicar (Wu et al., 2014).

2.4 Toxinas produzidas por *Staphylococcus* spp.

A intoxicação alimentar por *Staphylococcus* spp. é causada pela ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas produzidas por bactérias deste gênero (Nunes et al., 2015). As SEs são proteínas de aproximadamente 30 kDa que interagem com a mucosa intestinal (Duracova et al., 2018), causando cólicas abdominais, náuseas, vômito, acompanhado ou não por diarreia logo após a ingestão (Maina et al., 2012). SEs pertencem a uma família de superantígenos (SAGs) que foram originalmente identificados em *S. aureus* (Podkowik et al., 2013).

As enterotoxinas de *S. aureus* são consideradas as principais causas associadas à intoxicação alimentar (Ren et al., 2020). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que mais de 240.000 pessoas sejam afetadas anualmente pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *S. aureus*, das quais 23 foram identificadas até momento (Rasooly et al., 2017), com destaque para as SEs clássicas dos tipos A, B, C, D e E (Mello et al., 2016), capazes de causar incidentes esporádicos de intoxicação ou surtos de origem alimentar (Wang et al., 2018).

As enterotoxinas são estáveis ao calor e podem permanecer nos alimentos após processamento térmico, mesmo na ausência de células viáveis de *Staphylococcus* spp. Uma abordagem diagnóstica aplicada aos produtos lácteos deve considerar a detecção de enterotoxinas e a triagem de genes que codificam SE, com o intuito de garantir a segurança do consumidor (Cavicchioli et al., 2015). Embora uma grande variedade de métodos de detecção de SE tenham sido desenvolvidos, a detecção molecular de genes SE continua a ser o método mais comumente usado para investigar a possível contribuição de SE em relação à intoxicação alimentar por estafilococos (Fisher et al., 2018).

Além das enterotoxinas, *Staphylococcus* spp. podem expressar toxinas citolíticas que incluem hemolisinas, leucocidinas e modulinas que participam do desenvolvimento de mastites bovinas (Fursova et al., 2018). A leucocidina Pantón-Valentine (PVL) endógena é uma porotoxina, uma das principais toxinas extracelulares de *S. aureus*, composta pelas proteínas LukS-PV (31-32 kDa) e LukF-PV (33-34 kDa) que após serem secretadas formam heptâmeros que danificam posteriormente as células (Liu et al., 2018; Jia et al., 2020). Essa toxina possui alta especificidade de espécie (Niemann et al., 2018) e tem como principais células-alvo os leucócitos polimorfonucleares (PMNLs, neutrófilos), enfraquecendo a resposta imune do hospedeiro (Magro et al., 2017) e induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ma et al., 2012). A patogênese inclui a ligação inicial da proteína LukS-PV a um receptor com alta afinidade na membrana da célula hospedeira, para então ligar-se posteriormente a LukF-PV formando um dímero (Jia et al., 2020) que se adere às membranas de leucócitos e forma poros na bicamada fosfolipídica (Alonzo e Torres, 2014). Cepas de *S. aureus* positivas para PVL podem causar infecções de pele e tecidos moles (Franck et al., 2017) e complicar doenças semelhantes à influenza em crianças e adultos jovens saudáveis, com rápida progressão para pneumonia grave com hemoptise e leucopenia (Gillet et al., 2002).

A toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1) é um superantígeno pirogênico (Asano et al., 2014) codificada pelo gene *tst* (Andrey et al., 2015), que é transportado por MGE denominados ilhas de patogenicidade estafilocócica (SaPIs) (Sharma et al., 2018). A TSST-1 compõe a família de toxinas relacionadas ao SEs, com capacidade de estimular grandes populações de células T (Nunes et al., 2015), sendo responsável pela síndrome do choque tóxico (TSS). Uma doença potencialmente fatal (Andrey et al., 2015), que na primeira fase manifesta em pacientes febre, mialgia, dor de cabeça e calafrios, podendo ocorrer também náuseas, vômitos e diarreia, enquanto a segunda fase evolui para manifestações sistêmicas, como taquicardia, taquipneia e febre alta (Shumba et al., 2019).

As toxinas esfoliativas estafilocócicas (ETs) são serina-proteases e agente causador da síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS) (Kong et al., 2016). Pertencem à família das serina-proteases que exibem especificidade de substrato e reconhecem e hidrolisam uma única ligação peptídica no segmento extracelular da

desmogleína 1 (Dsg1), uma molécula de adesão célula-célula desmosomal do tipo caderina, que causa uma dissociação de queratinócitos na pele humana e animal (Imanishi et al., 2019).

A SSSS inicialmente se manifesta com febre, mal-estar, letargia e falta de apetite. Posteriormente surgem erupções cutâneas eritematosas e formação de bolhas grandes, frágeis e cheias de líquido. A SSSS pode afetar grandes partes do corpo ou pode se restringir aos locais de infecção, sendo então denominada "impetigo bolhoso" (Bukowski et al., 2010). Os indivíduos infectados sofrem perda de camadas superficiais da pele, que pode levar a desidratação e infecções secundárias (Kong et al., 2016).

2.5 Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. em mastites bovinas

A antibioticoterapia é atualmente o tratamento mais comum em vacas leiteiras infectadas por micro-organismos causadores de mastite bovina (Isaac et al., 2017; Schönborn et al., 2017), em que o sucesso do tratamento depende da identificação adequada do patógeno e da seleção dos agentes antimicrobianos mais adequados (Srednik et al., 2017). No entanto, apresenta desvantagens que incluem baixa taxa de cura, aumento da ocorrência de resistência e presença de resíduos de antibióticos no leite (Gomes e Henriques, 2016).

Um dos fatores mais agravantes de infecções intramamárias por *S. aureus* bovino é a dificuldade de sua eliminação por antibióticos e pelo sistema imunológico do hospedeiro, resultando em infecções persistentes de longa duração (Grunert et al., 2018). As bactérias capazes de resistir intracelularmente na glândula mamária e formar abscessos são mais difíceis de combater devido à restrição do contato com antibióticos, como exemplo o *S. aureus*, em que a porcentagem de cura por meio de antimicrobianos é de aproximadamente 10 a 30% (Gomes e Henriques, 2016).

O aumento no número de cepas resistentes aos antimicrobianos, isoladas de infecções subclínicas, pode contribuir para maior sucesso e disseminação desses patógenos (Rossi et al., 2019). *S. aureus* é particularmente conhecido por sua capacidade de adquirir e desenvolver resistência a múltiplos antibióticos, cuja maioria das infecções é causada por cepas resistentes à meticilina (MRSA) (Fisher et al., 2018).

O fenótipo MRSA representa uma séria ameaça à saúde pública em todo o mundo, devido à sua rápida disseminação e diversificação de clones pandêmicos com crescente virulência e resistência antimicrobiana (Veloso et al., 2019). MRSA de bovinos tem sido cada vez mais relatado, representando também um risco zoonótico de transmissão a humanos (Klibi et al., 2018), bem como para outros animais de produção como aves e suínos. Roedores ou moscas podem servir de transmissores destes patógenos (Magro et al., 2017). CoNS resistentes à meticilina isolados em casos de mastite bovina também requerem atenção devido ao risco de disseminação dos genes *mec* (Klibi et al., 2018).

A resistência de *S. aureus* à meticilina é mediada, principalmente, pela expressão do gene *mecA* localizado sobre um elemento genético móvel, cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), que codifica uma proteína com baixa afinidade à penicilina (PBP2a), tornando possível a sobrevivência de *S. aureus* ao tratamento com antibióticos β -lactâmicos (Hiramatsu et al., 2001; Türkyilmaz et al., 2010; Guillén et al., 2016). Até o momento, foram relatados 13 tipos de SCC*mec* (I a XIII) (Lakhundi e Zang, 2018). A tipagem de SCC*mec* é essencial para investigar a epidemiologia molecular de cepas MRSA (Saei e Panahi, 2020).

Na prática veterinária, *S. aureus* é geralmente resistente à maioria dos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite bovina, principalmente à penicilina. A resistência à penicilina é atribuída especialmente a um gene estrutural *blaZ* (Feng et al., 2017). Diante disto, o desenvolvimento de novas alternativas para combater *Staphylococcus* spp. está se tornando cada vez mais urgente (Côté-Gravel et al., 2019).

2.6 Homeopatia para o tratamento da mastite bovina

O aumento da resistência dos micro-organismos a diversos fármacos está associado principalmente ao uso inadequado e indiscriminado, em que drogas clássicas e de introdução recente no comércio têm se tornando ineficazes, representando um risco nos casos de patógenos que infectam tanto animais como humanos (Nascimento et al., 2001). Desta forma, a introdução de novos antimicrobianos não pode ser encarada com uma solução em longo prazo, considerando o surgimento de clones bacterianos resistentes que se tornam cada

vez mais prevalentes sob pressão seletiva da toxicodependência (Thänert et al., 2017). Também os consumidores têm exigido uma produção de alimentos livres de resíduos químicos e métodos de criação que levem em consideração aspectos humanitários e não agressivos aos animais e ao meio ambiente (Pires, 2005). Neste sentido surgem fazendas sob manejo orgânico, que visam à longevidade e melhoria da saúde geral do úbere, bem como a prevenção de novas infecções (Kiesner et al., 2016).

A homeopatia é uma terapia alternativa no tratamento da mastite e possui por fundamento a lei da semelhança, no qual o tratamento de pacientes ocorre através de um preparado que, quando administrado a um indivíduo sadio, produz os mesmos sintomas constatados em paciente que se deseja curar e tem despertado o interesse de técnicos e produtores (Barbosa et al., 2013). É uma terapia específica de estímulo ao organismo, na qual a escolha do medicamento é feita considerando-se as causas, o desenvolvimento da doença, a forma do adoecer, as circunstâncias concomitantes, bem como as características do organismo doente. Ela é capaz de equilibrar o hospedeiro pelo estímulo de suas defesas naturais, ajudando-o a se defender melhor (Pires, 2005). Na homeopatia clínica, o tratamento é baseado principalmente em sintomas relacionados ao sistema orgânico afetado. Além disso, vários remédios homeopáticos podem ser combinados para apoiar os efeitos dos outros. A homeopatia clássica enfatiza uma visão holística do paciente e da doença, em que é importante registrar o histórico exato do paciente e examinar, avaliar e tratar o paciente com precisão e individualmente (Ebert et al., 2017).

Em propriedades sob manejo orgânico, o controle de micro-organismos contagiosos da mastite é mais difícil que em rebanhos convencionais, devido a não utilização da terapia da vaca seca. Não existem estratégias e terapias alternativas para reduzir a infecção intramamária durante o período seco (Kiesner et al., 2016). Além disso, a falta de um tratamento homeopático individualizado é frequentemente reivindicada como um grande obstáculo em estudos clínicos sobre a eficácia da homeopatia. No entanto, a detecção e avaliação de sintomas homeopáticos individuais podem ser desafiadoras em condições práticas e podem ser a causa da incerteza, mesmo para um especialista veterinário em homeopatia (Keller e Sundrum, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Caracterizar e comparar a formação de biofilme, suscetibilidade a antimicrobianos *in vitro*, presença e distribuição de genes de virulência e de resistência antimicrobiana, além de determinar a diversidade clonal de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas em leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia

3.2 Específicos

- ✓ Identificar isolados estafilocócicos no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia;
- ✓ Investigar os genes codificadores de toxinas estafilocócicas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tsst-1*, *eta* e *pvl* em *Staphylococcus* spp. isolados em vacas tratadas e não tratadas com homeopatia;
- ✓ Investigar os genes *icaADBC*, *atlE*, *bap*, *bhp* e *aap* relacionados com produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas com e sem tratamento homeopático, assim como a expressão desta característica *in vitro*;
- ✓ Investigar os genes de resistência antimicrobiana *mecA* e *blaZ* e caracterizar o tipo SCC*mec* em *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia, bem como determinar seus perfis de suscetibilidade antimicrobiana;
- ✓ Determinar o perfil de similaridade das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia e estabelecer suas relações epidemiológicas com estirpes descritas internacionalmente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação pelo comitê de ética

Todas as técnicas experimentais foram realizadas sob a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº007921/17, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal - SP.

4.2 Formação dos grupos de animais e seleção de princípios ativos

Foi utilizado neste estudo um rebanho bovino leiteiro experimental composto por 50 vacas Holandesas e Jersolandas, localizado em São Carlos, estado de São Paulo. Todas as vacas estavam em estágio inicial de lactação e foram distribuídas de forma homogênea, por amostragem não aleatória por conveniência, de modo que animais com produção média de 25 litros/dia e CCS superior e inferior a 200.000 células mL⁻¹ de leite (Pyorala, 2003) estivessem de maneira semelhante no grupo de vacas tratadas e não tratadas com formulação homeopática. Todos os animais foram mantidos juntos e acompanhados por 12 meses, bem como submetidos aos mesmos procedimentos de manejo antes, durante e após a ordenha.

A escolha dos princípios ativos para o tratamento foi realizada por assessoria técnica especializada na área de homeopatia, após o conhecimento da etiologia infecciosa formada predominantemente por *Staphylococcus* spp. Os princípios ativos *Beladonna* (12 CH), *Hepar sulphur* (12 CH), *Silicea* (12 CH), *Phosphorus* (12 CH) e *Phytolacca decandra* (12 CH) do composto homeopático foram acrescentados à alimentação de 25 vacas em lactação, enquanto as outras 25 receberam apenas placebo com adição de açúcar na ração. Novos animais que entraram em período de lactação foram distribuídos aos grupos com e sem tratamento, obedecendo a critérios de produção e CCS do leite. Animais que já estavam em determinado grupo e retornaram à lactação após o período seco voltaram para o mesmo grupo ao qual pertenciam antes da secagem. Vacas diagnosticadas com mastite clínica foram removidas dos grupos de estudo e tratadas com antimicrobianos.

4.3 Colheitas de amostras de leite e detecção da mastite

A identificação da etiologia infecciosa e as contagens de células somáticas ocorreram por meio de colheitas de amostras de leite mensais, totalizando 12 colheitas. Durante a colheita de leite para as análises microbiológicas foram descartados os primeiros jatos de leite de cada quarto mamário e, em seguida, higienizaram-se as extremidades dos tetos com algodão umedecido com álcool etílico a 70% (v/v). Obteve-se um *pool* de amostras de leite dos quartos mamários de cada vaca. As amostras de leite foram colhidas em duplicata em tubos de ensaio estéreis, antes do início da primeira ordenha do dia. Todos os procedimentos de colheita seguiram as recomendações do *National Mastitis Council* (Harmon et al., 1990; Brito e Brito, 1999).

As colheitas para CCS foram realizadas após a ordenha completa dos animais, nos mesmos dias das colheitas para as análises microbiológicas. A CCS foi determinada por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento Somacount 300® (Bentley Instruments, 1995), a partir amostras acondicionadas em frascos plásticos com a adição de duas pastilhas de bronopol que foram encaminhadas a laboratório credenciado na Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite – RBQL, localizado em Piracicaba, SP.

Os animais foram considerados saudáveis, sem mastite, quando não foram isolados micro-organismos nas amostras de leite ou quando houve isolamento de CoNS, em ambos os casos com CCS abaixo de 200.000 células mL⁻¹ (Sandgren et al., 2008). Contrariamente, o animal foi classificado como doente, positivos para mastite, quando houve isolamento de quaisquer CoPS, independentemente da CCS ou do isolamento de CoNS, com CCS acima de 200.000 células mL⁻¹.

4.4 Identificação prévia de *Staphylococcus* spp. isolados no leite bovino

A identificação de *Staphylococcus* spp. foi realizada após a semeadura de 10 µL de leite sobre a superfície de ágar-sangue e incubação a 37°C por 24 a 48 horas. Posteriormente, as colônias foram avaliadas quanto às suas características morfológicas, aquelas com características de cocos gram positivos agrupados como cachos de uvas foram submetidas às provas de catalase e coagulase lenta (Holmberg, 1973). Os CoPS foram testados frente às provas de produção de

acetoína e fermentação de maltose e trealose, para a diferenciação entre CoPS e *S. aureus*, enquanto os CoNS foram submetidos aos testes de sensibilidade à furazolidona e de oxidase para a diferenciação entre *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. (Krieg e Holt, 1994; Almeida et al., 2005).

4.5 Extração de DNA e identificação molecular de isolados de *Staphylococcus* spp.

Os micro-organismos previamente identificados como *Staphylococcus* spp. foram estirados sobre a superfície de placas de Petri com agar sangue e incubados a 37°C por 24 horas, posteriormente três colônias foram selecionadas e inoculadas em caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. A extração do DNA ocorreu pela utilização do Illustra®kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). A confirmação genotípica dos *S. aureus* foi realizada por meio da detecção do gene que codifica o fragmento de DNA SA442 específico de *S. aureus* (Martineau et al., 1998). A cepa de referência *S. aureus* ATCC 33591 foi usada como controle positivo. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR para a identificação genotípica de *Staphylococcus aureus*.

Iniciador	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado
SA442-Up	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	241pb
SA442-Dn	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAAA	

As amostras de CoNS e CoPS foram submetidas à identificação genotípica por meio de *primers* de sequências conservadas (Tabela 2) adjacentes aos genes que codificam o RNAr16S e RNAr23S pela técnica ITS-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase-Espaço Transcrito Interno) desenvolvida por Couto et al. (2001) e Barry et al. (1991).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na técnica de ITS- PCR para a identificação genotípica de *Staphylococcus* spp. não aureus.

Iniciador	Sequência de nucleotídeos (5'-3')
ITS-Up	GAAGTCGTAACAAGG
ITS-Dn	CAAGGCATCCACCGT

Linhagens de referência internacional foram utilizadas como controles: *S. capitis* subsp. *capitis* (ATCC 27843), *S. capitis* subsp. *ureolyticus* (ATCC 49325), *S. caprae* (ATCC 35538), *S. chromogenes* (ATCC 43764), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. haemolyticus* (ATCC 29970), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (ATCC 700237), *S. hyicus* (ATCC 11249), *S. lugdunensis* (ATCC 700328), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (ATCC 43808), *S. sciuri* subsp. *sciuri* (ATCC 29062), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. warneri* (ATCC 10209). As estirpes que não puderam ser identificadas pela técnica de ITS-PCR foram submetidas ao sequenciamento do gene *rpoB* da subunidade beta da RNA polimerase (nucleotídeos 1444-1928) (Mellmann et al., 2006), seguido por uma análise da Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST).

4.6 Detecção de genes codificadores para enterotoxinas, *tsst-1*, *eta* e *pvl*

As reações de PCR para a detecção dos genes que codificam as enterotoxinas A, B, C, D e E e *tsst-1* foram realizadas conforme descritas por Johnson et al. (1991) e Cunha et al. (2006). A identificação dos genes da leucocidina Pantón-Valentine (*pvl*) e da toxina esfoliativa A (*eta*) seguiu as metodologias descritas por Tristan et al. (2007) e Koning et al. (2003). Foram utilizadas as seguintes cepas de referência toxigênicas como controles positivos: *S. aureus* ATCC 13565 (gene *sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (gene *seb*), *S. aureus* ATCC 19095 (gene *sec*), *S. aureus* ATCC 23235 (gene *sed*), *S. aureus* ATCC 27664 (gene *see*), *S. aureus* ATCC 51650 (gene *tst*) e *S. aureus* ATCC 49775 (gene *pvl*). Para a toxina esfoliativa A utilizou-se como controle positivo o isolado internacional *Staphylococcus*

aureus N5. A *S. xylosus* ATCC 29971 foi utilizada como controle negativo. Na Tabela 3 estão descritas as sequências iniciadoras e tamanho dos produtos amplificados.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção de genes de toxinas.

Gene	Iniciador	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado
<i>sea</i>	<i>sea</i> -Up	TTGGAAACGGTTAAACGAA	120pb
	<i>sea</i> -Dn	GAACCTTCCATCAAAAACA	
<i>seb</i>	<i>seb</i> -Up	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478pb
	<i>seb</i> -Dn	GACGGTACTCTATAAGTGCC	
<i>sec-1</i>	<i>sec</i> -Up	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257pb
	<i>sec</i> -Dn	AAATCGGATTAACATTATCC	
<i>sed</i>	<i>sed</i> -Up	CTAGTTTGTAATATCTCCT	317pb
	<i>sed</i> -Dn	TAATGCTATATCTTATAGGG	
<i>see</i>	<i>see</i> -Up	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	170pb
	<i>see</i> -Dn	TAACCTACCGTGGACCCTTC	
<i>tst</i>	<i>tst</i> -Up	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350pb
	<i>tst</i> -Dn	TTTCCAATAACCACCCGTTT	
<i>eta</i>	<i>eta</i> -Up	CTAGTGCATTTGTTATTCAA	119pb
	<i>eta</i> -Dn	TGCATTGACACCATAGTACT	
<i>Luk-PV</i>	<i>pvl</i> -Up	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433pb
	<i>pvl</i> -Dn	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	

4.7 Detecção de genes codificadores para a produção de biofilme

Para a detecção dos genes *ica*ADBC foram utilizados os *primers* (Tabela 4) e os parâmetros para as reações de PCR conforme descritos por Arciola et al. (2001) e Rohde et al. (2007). Em todas as reações foram utilizadas as linhagens de referência internacional *S. epidermidis* ATCC 35985 como controle positivo e *S.*

epidermidis ATCC 12228 como controle negativo. Realizou-se também a detecção dos genes *bap* (Cucarella et al., 2004), *bhp* (Qin et al., 2007a) e *aap* e *atlE* (Vandecasteele et al., 2003) por meio do uso das sequências de nucleotídeos descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes envolvidos na formação de biofilme.

Gene	Iniciador	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> -Up	TGGCTGTATTAAGCGAAGTC	669pb
	<i>icaA</i> -Dn	CCTCTGTCTGGGCTTGACC	
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> -Up	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198pb
	<i>icaD</i> -Dn	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	
<i>icaB</i>	<i>icaB</i> -Up	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA	302pb
	<i>icaB</i> -Dn	AAAGTCCCATAAGCCTGTTT	
<i>icaC</i>	<i>icaC</i> -Up	TAACCTTAGGCGCATATGTTT	400pb
	<i>icaC</i> -Dn	TTCCAGTTAGGCTGGTATTG	
<i>bap</i>	<i>bap</i> -Up	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC	971pb
	<i>bap</i> -Dn	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	
<i>aap</i>	<i>aap</i> -Up	ATACAACCTGGTGCAGATGGTTG	400pb
	<i>aap</i> -Dn	GTAGCCGTCCAAGTTTTACCAG	
<i>bhp</i>	<i>bhp</i> -Up	TGAAAAATAAACAAGGATTTTC	1278pb
	<i>bhp</i> -Dn	GCCTAAGCTAGATAATGTTTG	
<i>atlE</i>	<i>atlE</i> -Up	CAACTGCTCAACCGAGAACA	500pb
	<i>atlE</i> -Dn	CATCGTTTTTCAGCGCTATCA	

4.8 Detecção do gene *mecA* e gene *blaZ* de resistência à meticilina e à penicilina

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923). A pesquisa do gene *blaZ*

seguiu os parâmetros estabelecidos por Kaase et al. (2008), em que cepas de referência *blaZ* positiva (*S. aureus* ATCC 29213) e negativa (*S. aureus* ATCC 25923) foram incluídas em todas as reações. Os *primers* utilizados nas duas reações estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes envolvidos na resistência antimicrobiana.

Gene	Iniciador	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado
<i>mecA</i>	MRS-Up	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533 pb
	MRS-Dn	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	
<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i> -Up	CAAAGATGATATAGTTGCTTATTCTCC	421 pb
	<i>blaZ</i> -Dn	TGCTTGACCACTTTTATCAGC	

4.9 Determinação do tipo de SCC*mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*)

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se o método de reação de PCR Multiplex, conforme descrito por Oliveira e De Lencastre (2002) e adaptado por Machado et al. (2007).

4.10 Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5M. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. O DNA foi corado com Sybr® safe e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

4.11 Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (TCP)

A pesquisa de produção de biofilme em placas de cultura foi realizada por meio do método proposto por Christensen et al. (1985), utilizando modificações propostas por Oliveira e Cunha (2010). Foram utilizadas culturas em *trypticase soy broth* (TSB), incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas a 1:1 com TSB, preparado com 2% de glicose. Foram utilizadas placas estéreis compostas por 96

cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela *Corning Incorporated*). Os poços foram preenchidos em quadruplicata com 200 µL da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todos os testes foram utilizados controles positivo (*S. epidermidis* ATCC 35983) e negativo (*S. epidermidis* ATCC 12228) e uma amostra de TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal e, então, lavados quatro vezes com 200 µL de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por uma hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto e, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado por meio de uma lavagem das placas com água destilada utilizando-se de pipeta multicanal e posteriormente secas em temperatura ambiente por 60 minutos, para em seguida realizar-se a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca Labsystem modelo Multiskan EX em filtro 540 nm. Para determinação do ponto de corte foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima com uma placa inteira contendo TSB estéril, após a leitura foi determinada a média e o desvio padrão, com a multiplicação do desvio padrão por três e adição do valor da média da densidade óptica da amostra de TSB estéril no mesmo comprimento de onda segundo fórmula: (ponto de corte = desvio padrão x 3 + média da densidade óptica do TSB estéril). As amostras foram classificadas como não aderente quando o valor de corte era $\leq 0,111$, fracamente aderente quando $> 0,111$ ou $\leq 0,222$ e fortemente aderente quando $> 0,222$.

4.12 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado para todas as estirpes, por meio da técnica de disco-difusão em placas de ágar Mueller-Hinton a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Os princípios ativos utilizados foram: Penicilina/Benzilpenicilina (10 µg), Gentamicina (10 µg), Enrofloxacin (5 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Norfloxacin (10 µg), Eritromicina (15 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Tetraciclina (30 µg), Doxiciclina (30 µg), Oxacilina (1µg) e Cefalexina (30 µg) e Sulfametoxazol/Trimetoprim (25 µg). A atividade do antimicrobiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas

estabelecidas pelo CLSI (2016). Foram considerados micro-organismos multirresistentes (MDR) aqueles resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos testados.

4.13 Determinação do perfil genético de estipes de *Staphylococcus* spp. por *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

Todas as estirpes de *Staphylococcus* spp. foram tipadas por meio do PFGE utilizando o protocolo modificado de McDougal et al. (2003). As amostras foram colocadas em caldo BHI para o crescimento durante 24 horas. Em um microtubo, foram adicionados 400 µL da amostra e centrifugada a 12.000 rpm por 50 segundos. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 300 µL de solução TE (10 mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos a 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 5 µL de lisostafina (1mg/mL em 20 mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300 µL de agarose lowmelt.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em placa de 24 poços com 2 mL de solução EC (6 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas a 37°C por no mínimo 4 horas. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 mL de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora.

A enzima *SmaI* (*Fast Digest SmaI*®, Fermentas *Life Science*, Canadá) foi utilizada para a restrição do DNA genômico. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (*BioRad Laboratories*, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5 M (*Pulsed Field Certified Agarose*, *BioRad Laboratories*, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5 M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado *Lambda Ladder PFG Marker* (*New England BioLabs*) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, *Biotium*, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade entre as estirpes estafilocócicas foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; *AppliedMaths*, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*

with Arithmetic Mean) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,2% e 1%, respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos *clusters*.

4.14 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Após análise do PFGE foram selecionadas cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* pertencentes aos *clusters* formados para o sequenciamento das amostras pela técnica de MLST. O MLST de *S. aureus* foi realizado segundo normas descritas por Enright et al. (2000) enquanto o de *S. epidermidis* conforme Thomas et al. (2007), utilizando-se sete genes *housekeeping* para *S. aureus* (Tabela 6) e *S. epidermidis* (Tabela 7).

Tabela 6. Sequências iniciadoras utilizadas para o estudo dos complexos clonais de *Staphylococcus aureus* isolados em amostras de leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Gene	Iniciador	Sequencia (5'-3')	Produto amplificado
<i>arcC</i>	<i>arcC</i> -Up	TTGATTACACCAGCGCGTATTGTC	570 pb
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTTC	536 pb
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTATTATAACGATATC	
<i>glpF</i>	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	534 pb
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>gmk</i>	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	488 pb
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	
<i>pta</i>	<i>pta</i> -Up	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG	575 pb
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> -Up	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA	475 pb
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL</i>	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	598 pb
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Tabela 7. Sequências iniciadoras utilizadas para o estudo dos complexos clonais de *Staphylococcus epidermidis* isolados em amostras de leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Gene	Iniciador	Sequencia (5'-3')	Produto amplificado
<i>arcC</i>	<i>arcC</i> -Up	TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG	465
	<i>arcC</i> -Dn	TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG	
<i>aroE</i>	<i>aroE</i> -Up	CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC	420
	<i>aroE</i> -Dn	CAAGCGAAATCTGTTGGGG	
<i>gtr</i>	<i>gtr</i> -Up	CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT	438
	<i>gtr</i> -Dn	GTGATTAAAGGTATTGATTGAAT	
<i>mutS</i>	<i>mutS</i> -Up	GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA	412
	<i>mutS</i> -Dn	GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT	
<i>pyrR</i>	<i>pyrR</i> -Up	GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT	428
	<i>pyrR</i> -Dn	GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA	
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> -Up	ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC	424
	<i>tpi</i> -Dn	TTAATGATGCGCCACCTACA	
<i>yqiL</i>	<i>yqiL</i> -Up	CACGCATAGTATTAGCTGAAG	416
	<i>yqiL</i> -Dn	CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA	

As PCRs foram realizadas com um volume de reação de 25 µL, contendo 3 µL de DNA genômico (aproximadamente 15 ng), 10 pMol de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 2,5 µL de tampão 10 X (fornecido com a *Taq* DNA polimerase), 1,5 mM de MgCl₂ e 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatos. O DNA de *S. aureus* foi submetido a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e extensão final a 72°C por um minuto. Em seguida realizou-se uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para *S. epidermidis* realizou-se uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os amplicons foram purificados com enzima Exosap IT, segundo protocolo do fabricante. Adicionou-se 5 µL de cada amplicon e 2 µL de enzima Exosap IT em poços de placa de PCR de 96 poços. A mistura foi submetida a 37°C por 15 minutos e a 80°C por 15 minutos. Para a reação de sequenciamento com o kit BigDye^R Terminator v 3.1 *Cycle Sequencing*, adicionou-se 1 uL do produto purificado aos 9

μL de mix, preparado conforme instruções do kit. Preparou-se a reação de sequenciamento e o produto foi purificado com etanol antes de ser inserido no equipamento ABI 3100 Avant para a obtenção das sequências.

As análises e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados *on line* (<http://www.mlst.net>). Os tipos de sequências (sequence type, STs) mostraram que seis de sete alelos idênticos foram agrupados em complexos clonais (CC) usando o algoritmo e-BURST (www.eburst.mlst.net).

4.15 Metodologia estatística

O teste de Qui-quadrado foi realizado utilizando-se o procedimento Proc Freq do SAS (SAS, 2012), com cruzamento da variável “grupo” (vacas tratadas e sem tratamento) com as variáveis “etiologia”, “produção de biofilme” e “genes de virulência”, a um nível de significância $P \leq 0,05$. Na análise de correspondência múltipla foram utilizadas as variáveis que mostraram melhor dependência ($p \leq 0,05$), como variável resposta para os dois grupos por meio do software STATISTICA (StatSoft, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, 99 estirpes de *Staphylococcus* spp. foram identificadas nas amostras de leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia, em que *S. aureus* foram as de maior ocorrência (50,5%), seguidas por *S. chromogenes* (29,3%), *S. epidermidis* (17,2%), *S. warneri* (2,0%) e *S. agnetis* (1,0%) (Figura 1).

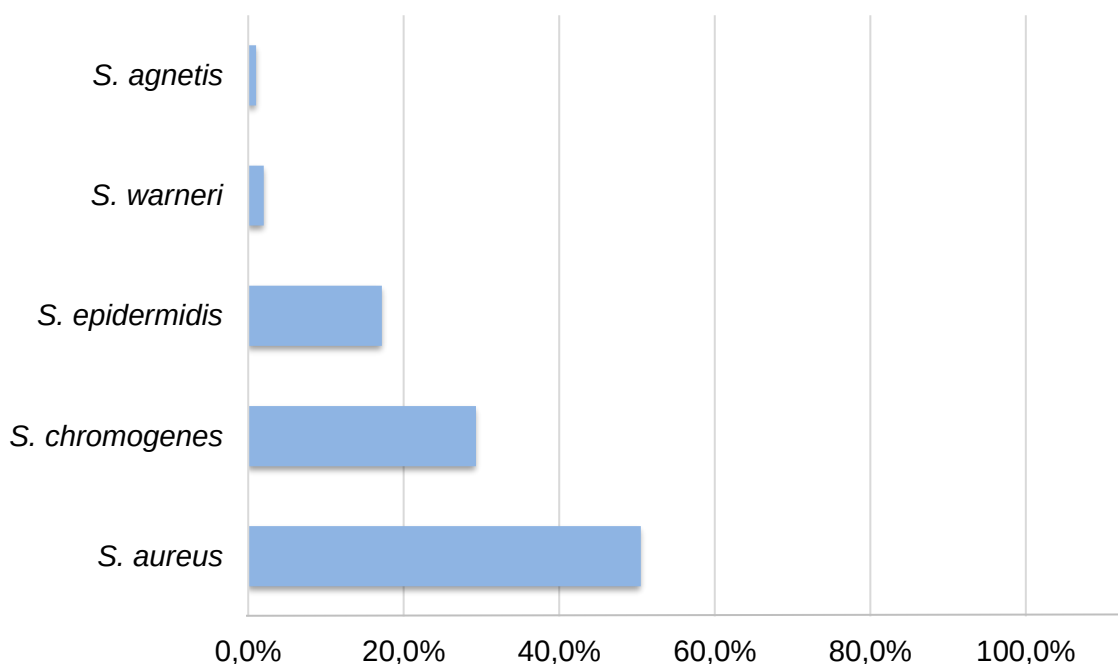


Figura 1. Frequência (%) de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Diante dos impactos da mastite dentro de rebanhos leiteiros, verifica-se atualmente o desenvolvimento de várias pesquisas que demonstram diferenças quanto aos tipos de patógenos e sua ocorrência em rebanhos leiteiros. Em Ruanda, Ndahetuye et al. (2019) observaram elevada frequência de CoNS (40,2%) seguidos por *S. aureus* (22%), em que o *S. epidermidis* foi predominante dentre CoNS. Entretanto, Phophi et al. (2019) verificaram em estirpes de CoNS, isoladas de vacas da África do Sul, que o *S. chromogenes* (70%) foi dominante, assim como Nobrega et al. (2018) em rebanhos canadenses, seguido por *S. epidermidis* (12%). Kim et al. (2019) constataram predomínio de estirpes de *S. chromogenes* (34,4%), *S. simulans* (20,3%) e *S. epidermidis* (18,6%) em estudo feito na Coreia.

S. aureus e CoNS envolvidos em casos de mastites bovinas são um problema para produtores de leite em todo o mundo (Darwish e Asfour, 2013). *S. aureus* é o agente etiológico mais importante (Caruso et al., 2016), considerado um patógeno oportunista com capacidade de afetar vários tecidos e órgãos em humanos e animais, além de induzir infecções agudas e crônicas (Côté-Gravel et al., 2019). Mesmo em rebanhos leiteiros bem manejados, *S. aureus* pode causar mastites clínicas e subclínicas recorrentes (Antók et al., 2020). A presença deste patógeno no gado leiteiro com mastite pode levar a contaminação de produtos lácteos (Fisher et al., 2018), representando um risco à saúde pública, uma vez que algumas cepas são altamente patogênicas e frequentemente envolvidas em doenças humanas e de animais (McMillan et al., 2016).

A presença de CoNS na pele saudável do úbere e nas mãos dos ordenhadores proporciona fácil acesso ao canal da teta e, em condições favoráveis, estes micro-organismos são capazes de penetrar na glândula mamária, resultando em infecção oportunista (Srednik et al., 2017). Tal fato foi observado em estudo que constatou a presença de pulsotipos de *S. chormogenes* em leite e em locais extramamários e confirmou esta espécie como micro-organismo oportunista e causador da mastite bovina (Taponen et al., 2008). *S. epidermidis* é um micro-organismo comensal que emergiu como importante patógeno, capaz de causar infecções em pacientes imunocomprometidos e paciente com implantes de biomateriais (Bowden et al., 2005).

A frequência de isolamento de *S. aureus* foi semelhante nos dois grupos de estudo, 48% em animais não tratados e 52% em vacas tratadas com homeopatia. Dentre CoNS, 70,8% das estirpes foram isoladas de leite de vacas tratadas e 29,2% de animais não tratados ($p=0,036$) (Figura 2).

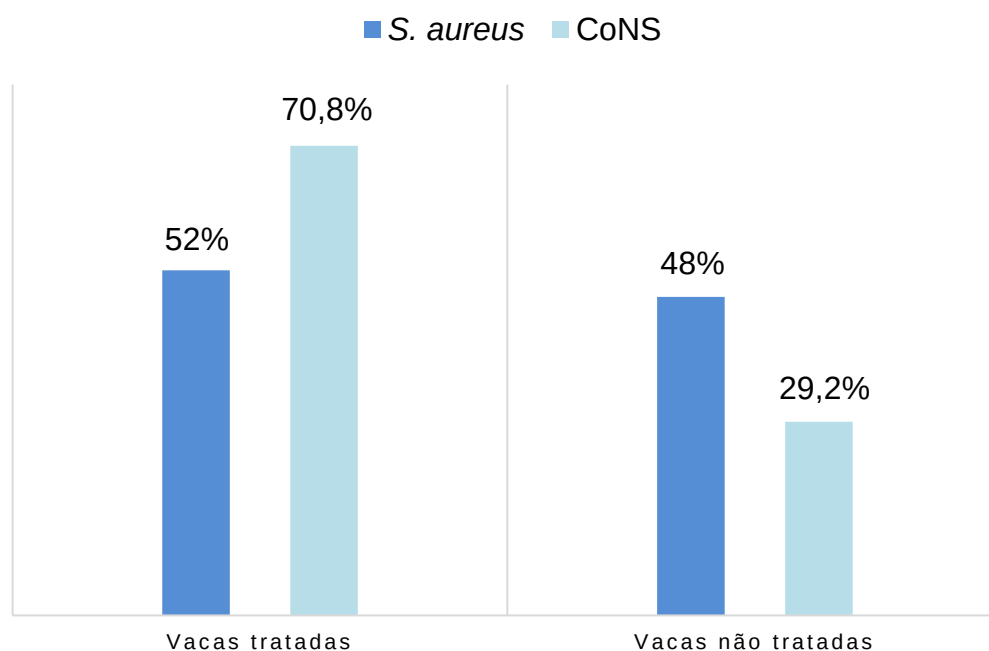


Figura 2. Distribuição das estirpes de *S. aureus* e CoNS nos grupos de vacas tratadas com homeopatia e vacas não tratadas.

A presença de *S. aureus* em animais após o tratamento homeopático é preocupante, uma vez que este micro-organismo pode acarretar problemas para a saúde pública, como surtos de intoxicação alimentar pelo consumo de produtos lácteos contaminados (Ren et al., 2020). Estudos também verificaram a presença de genes de toxinas típicos de *S. aureus* em estirpes de CoNS de leite de vacas com mastite, o que as torna também possíveis reservatórios de genes de toxinas tipicamente identificadas em *S. aureus* (Xu et al., 2015), demonstrando assim sua importância na saúde pública. Atualmente, os tratamentos alternativos da mastite têm surgido como uma opção no combate à resistência antimicrobiana, entre os quais a homeopatia tem desfrutado de grande popularidade e crescimento, principalmente em fazendas orgânicas (Keller e Sundrum, 2018). No entanto, a qualidade de seus produtos deve ser melhor avaliada do ponto de vista da segurança dos alimentos, uma vez que podem persistir patógenos com genes de virulência com potencial de causar danos à população.

Na Tabela 8 constam os resultados obtidos para detecção de genes que codificam enterotoxinas e biofilmes em estirpes de *Staphylococcus* spp..

Tabela 8. Número de isolados e frequência de genes relacionados com a produção de toxinas e biofilme, associados e isolados, em estirpes de *S. aureus* e CoNS em animais tratados e não tratados com homeopatia.

Genes de virulência	<i>S. aureus</i>		<i>S. chromogenes</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. warneri</i>		Total
	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	
<i>icaADBC</i>	3 (3,0%)	2 (2,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,0%)	0 (0%)	6 (6,1%)
<i>icaAD</i>	25 (25,2%)	24 (24,2%)	0 (0%)	1 (1,0%)	4 (4,0%)	0 (0%)	2 (2,0%)	0 (0%)	56 (56,5%)
<i>icaA</i>	26 (26,3%)	24 (24,2%)	3 (3,0%)	1 (1,0%)	6 (6,1%)	0 (0%)	2 (2,0%)	0 (0%)	62 (62,6%)
<i>icaD</i>	25 (25,2%)	24 (24,2%)	1 (1,0%)	5 (5,0%)	5 (5,0%)	1 (1,0%)	2 (2,0%)	0 (0%)	63 (63,6%)
<i>icaB</i>	19 (19,2%)	14 (14,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,0%)	0 (0%)	34 (34,3%)
<i>icaC</i>	5 (5,0%)	2 (2,0%)	9 (9,1%)	7 (7,1%)	0 (0%)	1 (1,0%)	2 (2,0%)	0 (0%)	26 (26,3%)
<i>bap</i>	8 (8,1%)	6 (6,1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,0%)	1 (1,0%)	2 (2,0%)	0 (0%)	19 (19,3%)
<i>aap</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (12,1%)	4 (4,0%)	0 (0%)	0 (0%)	16 (16,1%)
<i>atlE</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (11,1%)	4 (4,0%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (15,1%)
<i>sea</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>seb</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>sec</i>	0 (0%)	0 (0%)	12 (12,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (12,1%)
<i>sed</i>	2 (2,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,0%)
<i>see</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,0%)	0 (0%)	1 (1,0%)
<i>tst</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>eta</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>pvl</i>	5 (10,0%)	1 (2,0%)	-	-	-	-	-	-	6 (12%)

T = Vacas tratadas NT = Vacas não tratadas

O gene *sec* foi identificado apenas em estirpes de *S. chromogenes* com maior frequência em isolados de animais tratados ($p=0,0035$), em que 66,7% demonstraram $CCS < 200.000$ células/mL de leite. Cinco foram isolados de um mesmo animal, enquanto três de outro e dois de um terceiro animal. Os restantes pertenciam a animais distintos. O baixo percentual de estirpes positivas para o gene

sed foi semelhante ao constatado por Guimarães et al. (2013), em *S. aureus* isoladas de amostras de leite obtidas de animais no Estado de São Paulo, e por Kot et al. (2016), na Polônia. Maior ocorrência (29,4%) foi relatada por Grispoli et al. (2019) em vacas com mastite subclínica na Itália. Rossi et al. (2019) não detectaram o gene em *S. aureus* de vacas com mastite subclínica.

Tanto o gene *sed* quanto o *see* foram carregados por estirpes de animais com mastite, e nenhum isolado exibiu os genes *sea* e *seb*. Todas as amostras positivas para os genes de enterotoxinas foram obtidas de animais tratados com homeopatia. Esse fato merece atenção, pois na produção de leite orgânico os animais são submetidos a tratamentos alternativos para mastite, como a homeopatia, além de esse produto ser visto pela população como um alimento mais saudável quando comparado ao leite produzido em sistemas de produção convencionais.

Cepas portadoras de genes que codificam enterotoxinas podem chegar aos alimentos e causar episódios de intoxicação alimentar (Veloso et al., 2019), por meio da ingestão de enterotoxinas pré-formadas (Maina et al., 2012). Estudos demonstraram que a SEC purificada é uma toxina superantigênica e emética potente (Maina et al., 2012). As SEs são capazes de atravessar as condições ácidas do intestino causando quadros de intoxicação mesmo na ausência de bactérias vivas, sendo necessárias apenas pequenas quantidades para serem tóxicas em humanos (Fisher et al., 2018). Apesar de a pasteurização destruir células de *Staphylococcus* spp., o mesmo não ocorre com as SEs, por serem termoestáveis, o que faz com que permaneçam ativas no alimento (Cavicchioli et al., 2015).

Embora a intoxicação estafilocócica raramente se torne uma doença com risco de morte, sua frequência gera um impacto significativo na economia, resultando em perda de produtividade, bem como ônus financeiro, especialmente para a indústria de alimentos e os sistemas públicos de saúde (Fisher et al., 2018).

A presença de estirpes que carregam genes codificadores de enterotoxinas no leite deve ser analisada com preocupação, quanto à disseminação destes entre estirpes humanas e ambientais, visto que os genes que codificam as SEs estão localizados principalmente em elementos genéticos móveis e, portanto, podem se espalhar entre estirpes ou espécies estafilocócicas (Xu et al., 2015).

Os genes *tst* da toxina 1 da síndrome do choque tóxico e *eta* da toxina

esfoliativa A não foram detectados. Fursova et al. (2018) verificaram baixa prevalência (1,6%) do gene *tst* em *S. aureus* isolados de vacas holandesas com mastite subclínica em fazendas na Rússia Central, enquanto Wang et al. (2016) detectaram ocorrência de 40% em *S. aureus* de vacas com mastite clínica e subclínica em quatro rebanhos na China. Na Polônia o gene *eta* foi identificado em 5,6% de *S. aureus* de vacas com mastite subclínica (Kot et al., 2016), enquanto Xu et al. (2015) encontraram resultados semelhantes aos de nosso estudo.

O gene *pvl* foi identificado em estirpes isoladas de diferentes vacas, com 66,7% delas demonstrando CCS < 200.000 células/mL de leite. Dentre as estirpes positivas para *pvl*, 83,3% foram provenientes de vacas que receberam tratamento homeopático. Outros estudos constataram alta ocorrência deste gene em micro-organismos isolados de leite bovino. Mistry et al. (2016) verificaram prevalência de 82% em leite de vacas com mastite subclínica na Índia, enquanto Wang et al. (2018) observaram ocorrência de 93,8% em estirpes isoladas de vacas com mastite clínica, em duas fazendas de uma empresa de produção de laticínios na China, com atividade de exportação. Em contrapartida, Rossi et al. (2019) detectaram baixa prevalência em estirpes de vacas com diagnóstico de mastite subclínica acompanhadas durante um ano.

A PVL é uma toxina extracelular secretada por *S. aureus* (Gillet et al., 2002), que promove a abertura de poros na membrana plasmática de leucócitos, causando vazamento do conteúdo celular e lise (Otto, 2010), contribuindo para a apoptose de células epiteliais mamárias bovinas, estas consideradas a primeira barreira contra patógenos invasores que cruzam a barreira mecânica da extremidade do teto (Jia et al., 2020). Nos últimos anos, tem aumentado a taxa de detecção do gene *pvl* em casos de mastite bovina (Jia et al., 2020). A descoberta deste gene em estirpes de vacas sugere a possibilidade de transmissão de *S. aureus* de humanos para vacas. De modo semelhante, estudos demonstraram que isolados bovinos podem ser encontrados em humanos (Mekonnen et al., 2018). A capacidade de obter DNA transportado em elementos genéticos móveis torna as linhagens específicas de animais adequadas para colonizar os seres humanos e também as torna mais virulentas e resistentes (Agabou et al., 2017).

Em *Staphylococcus* spp. a síntese de PIA é mediada pelo produto dos genes cromossômicos *ica*, responsável pela adesão intercelular na formação do biofilme, organizado em uma estrutura de operon que contém os genes do operon *ica* (Oliveira e Cunha, 2010). No rebanho estudado, o operon *ica*ADBC ocorreu predominantemente em *S. aureus*, em um número reduzido de estirpes. Entretanto, a coexistência dos genes *icaA* e *icaD* prevaleceu na maioria das estirpes de *S. aureus*, quando comparadas com CoNS (Tabela 8). De forma semelhante, a dominância dos genes *icaA* e *icaD* em *S. aureus* foi observada em estudos com estirpes de vacas com mastite subclínica (Marques et al., 2017) e nosocomiais (Salehzadeh et al., 2016). Neste último, os autores afirmam que a alta prevalência de genes *ica* e sua relação com a formação de biofilme indicam a importância do biofilme nos mecanismos patogênicos de infecções por *S. aureus*. Os genes *icaA* e *icaD* são importantes na síntese de exopolissacarídeos, em que o gene *icaA* codifica a enzima *N*-acetilglucosaminil transferase, necessária na síntese do polímero poli-*N*-acetilglucosamina, principal componente exopolissacarídeo da matriz de biofilme estafilocócica (Arciola et al., 2015). Segundo Buttner et al. (2015) o gene *IcaD* é necessário para a atividade completa de *IcaA* *in vitro*. A ocorrência do gene *icaC* foi maior em CoNS (39,6%) que em *S. aureus* (14%), enquanto o gene *icaD* foi predominante em animais tratados ($p=0,012$) (Tabela 9).

Tabela 9. Percentual de *Staphylococcus* spp. positivos e negativos para genes do operon *icaADBC*, *atlE*, *bap*, *bhp* e *aap* em vacas com mastite subclínica tratadas e não tratadas com homeopatia.

Gene	Vacac tratadas		Vacac não tratadas		P
	N%	P%	N%	P%	
<i>icaA</i>	34,21	65,79	39,34	60,66	0,608
<i>icaB</i>	63,16	36,84	67,21	32,79	0,679
<i>icaC</i>	73,68	26,32	73,77	26,23	0,992
<i>icaD</i>	21,05	78,95	45,90	54,10	0,012
<i>atlE</i>	81,97	18,03	89,47	10,53	0,311
<i>bap</i>	80,33	19,67	81,58	18,42	0,878
<i>bhp</i>	100	0	100	0	-
<i>aap</i>	80,33	19,67	89,47	10,53	0,229

N = Percentual de negativos; P = Percentual de positivos

Os outros genes que codificam produção de biofilme em CoNS demonstraram frequências de 29,2% (*icaD*), 25,0% (*icaA*) e 2,1% (*icaB*). O biofilme é um dos fatores de virulência mais importantes para o CoNS e está relacionado à resistência à terapia antimicrobiana e à cronicidade da infecção (Ahmed et al., 2019). Estudo de Tremblay et al. (2013) demonstrou relação entre a formação de biofilme por CoNS e infecções intramamárias persistentes.

O gene *bap* foi identificado em estirpes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. warneri* com maior ocorrência em animais tratados (63,2%; $p=0,8778$), porém o gene *bhp* não foi encontrado. A presença do gene *bap* em isolados de vacas com mastite é relatada em vários estudos como o de Marques et al. (2017), que verificaram baixa prevalência em *S. aureus* de vacas com mastite subclínica em três fazendas leiteiras no Rio de Janeiro, enquanto Xu et al. (2015) constataram o gene apenas em CoNS de animais com mastite subclínica. Na Colômbia, Torres et al. (2019) encontraram o gene *bap* em *S. aureus* de vacas com mastite clínica pertencentes a 91 fazendas, e

Tremblay et al. (2013) identificaram o gene em CoNS de leite de fazendas canadenses. A proteína BAP está ancorada na parede celular de bactérias e permite que células se liguem e colonizem diferentes superfícies, como forma alternativa da PIA na formação de biofilmes (Montazeri et al., 2020), bem como na patogênese das infecções contribuindo para a internalização bacteriana nas células do hospedeiro, promovendo assim a invasão tecidual (Arciola et al., 2015).

O carregamento dos genes *atlE* e *aap* ocorreu apenas por estirpes de *S. epidermidis*, enquanto *S. agnetis* não apresentou nenhum dos genes relacionados com a produção de biofilme. Srednik et al. (2017) também verificaram a presença do gene *aap* em *S. epidermidis*, quando estudaram CoNS isolados de vacas com mastite clínica e subclínica na Argentina. Tremblay et al. (2013), ao analisarem CoNS de fazendas canadenses, verificaram que 16,5% das estirpes possuíam o gene *atlE* e 65,8% o gene *aap*. Estudo de Murugesan et al. (2018) constatou a importância dos genes *aap* e *atlE* na formação de biofilme de *S. epidermidis*, em que estes apresentaram associação significativa entre suas presenças e os perfis de expressão de biofilme, com tendência de isolados com forte produção de biofilmes a abrigarem os genes do operon *ica*, *atlE* e *aap* simultaneamente.

Segundo Rohde et al. (2005), *S. epidermidis* pode formar uma matriz de biofilme por via alternativa à PIA, por exemplo através da expressão da proteína Aap, enquanto a AtlE é uma das proteínas estafilocócicas associada à superfície (Lou et al., 2011), com atividade autolítica que induz a lise de uma subpopulação bacteriana resultando na produção de DNA extracelular, necessário para a fixação inicial às superfícies do restante da população e ao desenvolvimento do biofilme (Qin et al., 2007b). Dai et al. (2012) sugerem que a expressão do gene *atlE* funcione como um mecanismo de autorrenovação do biofilme de *S. epidermidis* por meio da morte celular, dispersão e formação do novo biofilme.

A distribuição semelhante da maioria dos genes relacionados com a produção de biofilme entre os animais do grupo tratado e controle (Tabela 9) não deve ser menosprezada do ponto de vista da saúde pública, uma vez que a permanência dessas estirpes, após o tratamento homeopático, pode contribuir para a persistência de infecções e consequentemente disseminação de genes de virulência. Segundo Costa et al. (2019), infecções crônicas sustentadas por biofilmes são extremamente

resistentes aos agentes antimicrobianos e às defesas do hospedeiro, além de fornecerem mecanismos através dos quais micro-organismos do ambiente podem circular em paciente e vice-versa.

De acordo com Savage et al. (2013), os biofilmes produzidos por *S. aureus* aumentam a transferência de plasmídeos por conjugação e mobilização, promovendo a disseminação horizontal de determinantes de resistência antimicrobiana, uma vez que o contato estreito célula a célula e a matriz do biofilme estabilizam a proximidade bacteriana. Os biofilmes também contribuem para proteger as células de diferentes agentes, incluindo antimicrobianos (Fuente-Núñez et al., 2013). Embora o tratamento com antimicrobianos seja a medida mais importante e eficaz no controle de infecções microbianas, tratamentos antimicrobianos dificilmente erradicam (Wu et al., 2014), contribuindo assim para infecções crônicas e recorrentes em animais e humanos (Ren et al., 2020). A predominância de *Staphylococcus* spp. portadores de genes de biofilme em vacas com mastite, requer a necessidade de melhorias nos sistemas de produção leiteira quanto à qualidade do produto gerados, a fim de diminuir e eliminar estirpes com esta característica.

A pesquisa de produção *in vitro* de biofilme revelou que 76,8% das estirpes que continham algum gene relacionado com esta característica de patogenicidade apresentaram fraca ou forte produção. Em 11,2%, apesar da presença de genes que codificam a produção de biofilme, não houve produção *in vitro*. Estudo na China envolvendo isolados oculares humanos também observou esta particularidade e concluiu que, embora cepas bacterianas possuam a capacidade genética de produzir biofilmes, isso não implica necessariamente que biofilmes serão formados (Hou et al., 2012). Isso ocorre porque os genes são expressos mais facilmente em condições de necessidades competitivas, como em um quadro infeccioso, por exemplo. Segundo Arciola et al. (2015), a expressão de biofilmes é influenciada por mecanismos coordenados de forma coletiva, capazes de detectar estímulos ambientais e de densidade bacterianas. Em condições de injúria bacteriana como limitação de ferro, ausência de nutrientes, estresse térmico ou concentrações subinibitórias de etanol e alguns antibióticos, pode haver aumento da produção de biofilme.

Em 12,1% (11 *S. chromogenes* e um *S. agnetis*) das estirpes verificou-se formação de biofilme, porém nenhum dos genes estudados foi encontrado. Dentre estas estirpes, cinco delas identificadas como *S. chromogenes* foram isoladas de um mesmo animal. Segundo Seixas et al. (2014), cepas com fenótipo positivo para biofilme, mas negativas para genes podem ser explicadas pela existência de outros mecanismos de produção de biofilme. A capacidade de formação de biofilmes é considerada uma importante característica de virulência, em que as adesinas são essenciais para ligação entre células hospedeiras, particularidade observada em *S. aureus* (Ren et al., 2020) e mencionada para CoNS como reponsável pela resistência antimicrobiana e cronicidade de infecções (Ahmed et al., 2019). Além disso, Grunert et al. (2018) verificaram níveis mais altos de formação de biofilme em linhagens com alta prevalência dentro de rebanhos.

Na Tabela 10 estão expressas as associações entre genes codificadores e produção *in vitro* de biofilme relacionados com a produção de biofilmes de estirpes de *Staphylococcus* spp..

Tabela 10. Frequência de *Staphylococcus* spp. positivos e negativos para genes do operon *ica*ADBC, *atlE*, *bap*, *bhp* e *aap* e fenotípico para produção de biofilme em vacas com mastite subclínica tratadas e não tratadas com homeopatia.

Espécie	Biofilme	Genes	N	Total
<i>S. aureus</i>	NA	<i>icaA icaD</i>	4	11
<i>S. aureus</i>	NA	<i>icaA icaD bap</i>	2	
<i>S. aureus</i>	NA	<i>icaA icaB icaD bap</i>	2	
<i>S. aureus</i>	NA	<i>icaA icaB icaD</i>	1	
<i>S. chromogenes</i>	NA	<i>icaB</i>	1	
<i>S. chromogenes</i>	NA	<i>icaA icaC icaD</i>	1	
<i>S. aureus</i>	FRA	<i>icaA icaB icaD</i>	9	26
<i>S. aureus</i>	FRA	<i>icaA icaB icaD bap</i>	2	
<i>S. aureus</i>	FRA	<i>icaA icaB icaC</i>	1	
<i>S. aureus</i>	FRA	<i>icaA icaB</i>	3	
<i>S. aureus</i>	FRA	<i>icaA icaB bap</i>	2	
<i>S. epidermidis</i>	FRA	<i>icaA bap aap</i>	1	
<i>S. epidermidis</i>	FRA	<i>icaA icaD bap aap</i>	1	
<i>S. epidermidis</i>	FRA	<i>icaC icaD atlE bap aap</i>	1	
<i>S. chromogenes</i>	FRA	<i>icaC</i>	3	
<i>S. chromogenes</i>	FRA	<i>icaA icaC</i>	2	
<i>S. warneri</i>	FRA	<i>icaA icaB icaC icaD bap</i>	1	
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaB icaD</i>	12	50
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaB icaC icaD bap</i>	3	
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaB icaC icaD</i>	2	
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaD</i>	2	
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaB icaD bap</i>	1	
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaC icaD</i>	1	
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaD bap</i>	2	
<i>S. aureus</i>	FOA	<i>icaA icaC</i>	1	
<i>S. epidermidis</i>	FOA	<i>atlE aap</i>	8	
<i>S. epidermidis</i>	FOA	<i>icaA icaD atlE bap aap</i>	2	
<i>S. epidermidis</i>	FOA	<i>icaA icaD atlE aap</i>	1	
<i>S. epidermidis</i>	FOA	<i>icaD atlE</i>	1	
<i>S. epidermidis</i>	FOA	<i>icaA aap</i>	1	
<i>S. epidermidis</i>	FOA	<i>aap</i>	1	
<i>S. chromogenes</i>	FOA	<i>icaC</i>	5	
<i>S. chromogenes</i>	FOA	<i>icaD icaC</i>	3	
<i>S. chromogenes</i>	FOA	<i>icaA icaC</i>	1	
<i>S. chromogenes</i>	FOA	<i>icaD</i>	2	
<i>S. warneri</i>	FOA	<i>icaA icaC icaD bap</i>	1	

FOA= forte aderente, FRA= fraco aderente, NA= não aderente e N= número absoluto

As combinações demonstraram que 87,9% das estirpes apresentaram pelo menos um gene associado com a produção de biofilme. Em *S. aureus* o perfil predominante foi *icaA*, *icaB*, *icaD* e FOA (13,8%) e *icaA*, *icaB*, *icaD* e FRA (10,3%), em *S. epidermidis* *atlE*, *aap* e FOA (9,2%) e em *S. chromogenes* *icaC* e FOA (5,7%).

A análise de correspondência entre os genes de virulência e os animais tratados e não tratados com homeopatia, demonstrou que no grupo de vacas

tratadas houve associação entre *S. aureus* e o gene *icaD* e entre CoNS e o gene *sec* (Figura 3).

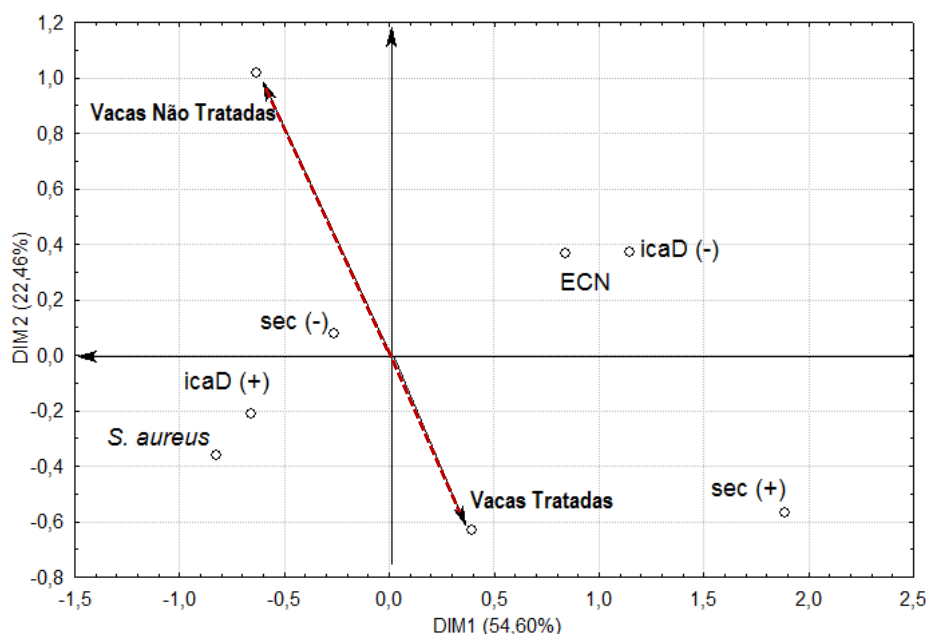


Figura 3. Mapa perceptual da análise de correspondência entre as variáveis vacas tratadas e não tratadas com homeopatia; agente etiológico e genes de virulência. Linhas pontilhadas valor de $p < 0,05$.
ECN = *Staphylococcus* spp. coagulase negativa

A presença do gene *icaD* também foi majoritária em estirpes de *S. aureus* de vacas com mastites na Ilha de São Luís – MA (Costa et al., 2018) e em estudo de Namvar et al. (2013), que verificaram produção de biofilme em 58% de isolados humanos de *S. aureus* e afirmaram que a capacidade de formação de filme só ocorreu em amostras positivas para o gene *icaD*. Segundo Meroni et al. (2019), o mecanismo regulador do biofilme é complexo e ainda não está totalmente elucidado. Diante disso, o monitoramento da capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. e dos genes envolvidos fornecerá novas ideias ou estratégias para a prevenção e o tratamento eficaz da mastite bovina (Darwish e Asfour, 2013).

Os genes *mecA* e *blaZ* apresentaram distribuição similar entre os dois grupos de estudo (Tabela 11). A não influência da homeopatia sobre micro-organismos portadores destes genes contribui para que eles continuem a ser disseminados entre ordenhadores e ambiente de ordenha.

Tabela 11. Distribuição de genes de resistência antimicrobiana entre vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Grupo	<i>gene mecA</i>		<i>gene blaZ</i>	
	N%	P% ²	N% ¹	P% ²
Vacas tratadas	83,61	16,39	40,98	59,02
Vacas não tratadas	92,11	7,89	28,95	71,05
p-valor	0,2234		0,226	

N = Percentual de amostras negativas P = Percentual de amostras positivas

O gene *blaZ* apresentou ocorrência superior em estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, enquanto o gene *mecA* foi identificado apenas em *S. epidermidis* (12,1%), em que todas foram tipadas como SCCmec Tipo I para o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (Tabela 12), e 50% demonstraram resistência à oxacilina.

Observou-se também que três estirpes exibiram resistência à oxacilina e ausência do gene *mecA*. Pesquisas demonstram que a falsa positividade de resistência à oxacilina pelo método de difusão em disco pode ocorrer devido à hiperprodução de β -lactamases, em que isolados apresentam expressão fenotípica para a resistência à oxacilina, porém não possuem mecanismo genético em virtude da ausência de gene *mecA* (Mathews et al., 2010; Ghanwate et al., 2016; Hryniewicz e Garbacz, 2017; Thiruvannamalai et al., 2018). Como em MRSA, o surgimento de isolados de origem animal com falsa resistência à oxacilina, pode estar relacionado ao uso indiscriminado de antimicrobianos (Hryniewicz e Garbacz, 2017).

Thiruvannamalai et al. (2018) verificaram que o método de difusão em disco de oxacilina é menos sensível para a detecção de MRSA e enfatizam que o método da cefoxitina pode ser uma alternativa ao PCR na detecção de MRSA, devido a facilidade de execução e por ser menos oneroso. Afirmam, ainda, que a cefoxitina ao ser combinada ao ágar oxacilina e ao E-teste auxiliam na identificação de cepas MRSA e com hiperprodução de betalactamase.

Tabela 12. Distribuição de genes de resistência antimicrobiana entre espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Espécie	Grupo de vacas tratadas			Grupo de vacas não tratadas		
	gene <i>blaZ</i>	gene <i>mecA</i>	Tipo <i>SCCmec</i>	gene <i>blaZ</i>	gene <i>mecA</i>	Tipo <i>SCCmec</i>
<i>S. aureus</i>	18	0		14	0	
<i>S. chromogenes</i>	4	0		10	0	
<i>S. epidermidis</i>	11	9	I	3	3	I
<i>S. warneri</i>	2	0		0	0	
<i>S. agnetis</i>	1	0		0	0	
Total	36	9		27	3	

A presença de gene *mecA* em *S. epidermidis* é relatada em vários estudos. Na China, elevada frequência foi observada (89%) (Qu et al., 2019), bem como na Coreia (85,7%), em que 4,8% foram caracterizados como *SCCmec* Tipo I (Kim et al., 2019). Em fazendas canadenses notou-se ocorrência semelhante à do presente trabalho para *mecA* (17%), além de alta prevalência do gene *blaZ* (Nobrega et al., 2018). No País de Gales baixa ocorrência de *S. epidermidis* *SCCmec* tipo I foi notada em amostras de tanques de refrigeração (Fisher e Paterson, 2020). Estudo envolvendo seis estados brasileiros revelou que todos os CoNS *mecA*-positivos foram identificados como *S. epidermidis* e resistentes a todos os antimicrobianos β -lactâmicos testados, em que nove isolados apresentaram resistência múltipla às drogas (Santos et al., 2015). Pesquisa MRSA e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo metilina resistente (MRCoNS) de ambiente, manipuladores e animais verificou que o *S. epidermidis* foi a espécie que mais carregou o gene *mecA*, seguida de *S. aureus*, com maior detecção em estirpes de leite (Venugopal et al., 2019).

Em *S. epidermidis* a resistência à metilina é conferida por mecanismo em que genes são transportados por elementos genéticos móveis, chamados cassetes cromossômicos estafilocócicos (SCCs) (Du et al., 2013), por transferência horizontal (Soumya et al., 2017). A detecção de *S. epidermidis* metilina-resistente (MRSE) em

leite pode representar ameaça ao consumidor pelo contato com estas bactérias, por meio do consumo de leite cru e seus derivados e por pessoas que trabalham ou convivem próximo a esses animais. De acordo com Venugopal et al. (2019), cepas MRCoNS de origem animal com determinantes de resistência, podem ser disseminadas devido à estreita associação dos animais com o microbioma ecológico. É importante ressaltar que, em humanos, *S. epidermidis* está frequentemente envolvido em infecções crônicas, associadas a biofilmes, com difícil ação de antibióticos convencionais e complexo processo de formação (Mu et al., 2019). Estudos recentes relatam também o isolamento de MRCoNS de dispositivos médicos, pacientes ambulatoriais e infecções da corrente sanguínea (Venugopal et al., 2019).

Kim et al. (2019) afirmam que MRSE associados a humanos em vacas leiteiras são inevitáveis. Experiências em medicina humana têm mostrado que *Staphylococcus* spp. tem potencial para aquisição de mecanismos de resistência e genes de virulência, com capacidade de persistir após intenso uso de antimicrobianos (Nobrega et al., 2018). Diante disso, há necessidade de monitorar os perfis de resistência e corresponsabilidade à meticilina em estirpes estafilocócicas provenientes de infecções bovinas e humanas, a fim de prevenir e controlar a disseminação dessas cepas (Seixas et al., 2014). Em vacas com mastite, a vigilância de estafilococos resistentes à meticilina contribui também para o tratamento adequado dos animais (Santos et al., 2015). Uma forma possível é através do estabelecimento de planos estratégicos de uso de antimicrobianos em propriedades leiteiras (Kim et al., 2019). Venugopal et al. (2019) também acrescentam a importância do acompanhamento da saúde de humanos e do ambiente, e afirmam que indivíduos em contato persistente com animais devem ser informados sobre o risco de provável transmissão de resistência dos animais aos seres humanos e vice-versa.

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* revelaram maior ocorrência de estirpes resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim (97%), seguido pela penicilina (33,3%), tetraciclina (24,2%), gentamicina (13,1%) e eritromicina (12,1%), enquanto 9,1% das estirpes apresentaram resistência *in vitro* à oxacilina. A

resistência intermediária foi detectada frente à doxiciclina (11,1%), gentamicina (4%), ciprofloxacina (3%), eritromicina (2%) e enrofloxacina (1%) (Tabela 13).

Tabela 13. Padrões gerais de susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Princípio ativo	Padrões de Suscetibilidade Antimicrobiana								
	Resistente N (%)			Intermediária N (%)			Sensível N (%)		
	T	NT	Total	T	NT	Total	T	NT	Total
PEN	20(32,8)	13(34,2)	33(33,3)	0(0)	0(0)	0(0)	41(67,2)	25(65,8)	66(66,7)
GEN	8(13,1)	5(13,2)	13(13,1)	3(4,9)	1(2,6)	4(4,0)	50(82)	32(84,2)	82(82,8)
ENO	0(0)	1(2,6)	1(1,0)	1(1,6)	0(0)	1(1,0)	60(98,4)	37(97,4)	97(98)
CIP	0(0)	1(2,6)	1(1,0)	2(3,3)	1(2,6)	3(3,0)	59(96,7)	36(94,7)	95(96)
NOR	0(0)	1(2,6)	1(1,0)	0(0)	0(0)	0(0)	61(100)	37(97,4)	98(99)
ERI	9(14,7)	3(7,9)	12(12,1)	2(3,3)	0(0)	2(2,0)	50(82)	35(92,1)	85(85,9)
NIT	0(0)	2(5,3)	2(2,0)	0(0)	0(0)	0(0)	61(100)	36(94,7)	97(98)
TET	14(22,9)	10(26,3)	24(24,2)	2(3,3)	0(0)	2(2,0)	45(73,8)	28(73,7)	73(73,7)
DOX	7(11,5)	5(13,2)	12(12,1)	8(13,1)	3(7,9)	11(11,1)	46(75,4)	30(78,9)	76(76,8)
SUT	59(9,6)	38(100)	97(98)	0(0)	0(0)	0(0)	2(3,3)	0(0)	2(2,0)
OXA	6(9,8)	3(7,9)	9(9,1)	0(0)	0(0)	0(0)	55(90,2)	35(92,1)	90(90,9)
CFE	2(3,3)	1(2,6)	3(3,0)	0(0)	0(0)	0(0)	59(96,7)	37(97,4)	96(97)

T = vacas tratadas, NT = vacas não tratadas, N= Número absoluto, PEN= penicilina, GEN= gentamicina, ENO= enrofloxacina, CIP= ciprofloxacina, NOR= norfloxacina, ERI= eritromicina, NIT= nitrofurantoína, TET= tetraciclina; DOX= doxiciclina, SUT= sulfametoxazol-trimetoprim, OXA= oxacilina, CFE= cefalexina

Wang et al. (2018) verificaram resistência à penicilina semelhante à deste estudo, porém em rebanhos canadenses a resistência antimicrobiana foi inferior para tetraciclina (10%), penicilina (10%) e eritromicina (6%) entre *Staphylococcus* spp. não aureus (Nobrega et al., 2018). Depreende-se que a resistência antimicrobiana

de *S. aureus* e outras espécies estafilocócicas variam conforme a região e são influenciadas pelo uso de agentes antimicrobianos (Ren et al., 2020).

Neste estudo a alta resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim pode estar atrelada ao fato de que na propriedade estudada, animais jovens que apresentavam quadros de diarreia com suspeita de coccidiose eram tratados com medicamentos com sulfonamidas na composição. Segundo Epe et al. (2005) em muitos países as sulfonamidas são utilizadas no tratamento da coccidiose bovina, em que aplicações sucessivas contribuem para a redução dos sintomas clínicos, porém são ineficazes como medida preventiva. Em humanos algumas sulfonamidas foram amplamente utilizadas em tratamentos, porém atualmente seu uso é limitado devido ao aumento da resistência bacteriana (Vila-Costa et al., 2017).

Na medicina humana e veterinária, as sulfonamidas podem ser utilizadas como antibacterianos, antifúngicos e antiprotzoários (Baran et al., 2020), em que seu uso em rebanhos bovinos favorece a contaminação do solo e das águas superficiais (Hruska e Franek, 2012) por meio de fezes, contribuindo para a resistência a esses medicamentos. Tal fato representa maior risco que os efeitos tóxicos destes fármacos (Baran et al., 2011). Em alimentos, as sulfonamidas são inaceitáveis como contaminantes (Hruska e Franek, 2012).

Dentre os principais mecanismos de resistência às sulfonamidas destacam-se os mecanismos de degradação microbiana e de disseminação de genes resistência antimicrobiana (AGR), em que o mecanismo de degradação prevalece em altas concentrações de sulfonamidas, enquanto a disseminação de AGR em concentrações moderadas a baixas (Vila-Costa et al., 2017).

Ao segregar as resistências aos antimicrobianos por espécie identificada, o *S. aureus* apresentou maior número de estirpes resistentes à ciprofloxacina (3), eritromicina (2), enrofloxacin (1), doxiciclina (6), gentamicina (2) e tetraciclina (1) (Tabela 14), *S. epidermidis* à doxiciclina (1), tetraciclina (1) e gentamicina (2) (Tabela 15) e *S. chromogenes* à doxiciclina (1) (Tabela 16). Nos últimos anos, o surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos que causam mastites clínicas e subclínicas tornou-se uma grande preocupação de saúde pública (Hoque et al., 2018). Segundo Venugopal et al. (2019), *S. aureus* tem capacidade de desenvolver rápida resistência a quase todos os antibióticos utilizados na prática clínica.

A associação da resistência aos antimicrobianos demonstrou que 29,3% das estirpes apresentaram resistência múltipla às drogas, e 99% das estirpes foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. A avaliação por espécie evidenciou 15 estirpes MDR de *S. aureus*, 11 de *S. epidermidis* e três de *S. chromogenes*. Apesar da baixa prevalência de genes de resistência em *S. chromogenes*, uma estirpe apresentou resistência a nove antimicrobianos. *S. aureus* apresentou 19 padrões de resistência, *S. epidermidis* 13 e *S. chromogenes* seis. Os padrões de resistências mais frequentes foram sulfametoxazol-trimetoprim e sulfametoxazol-trimetoprim + *blaZ*, que ocorreram em *S. aureus* e *S. chromogenes* (Tabelas 14 e 16).

Tabela 14. Padrões de resistência de estirpes de *S. aureus* isoladas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Perfil			T	NT	Total
Resistente	Intermediário	Genes			
PEN TET GEN DOX SUT	CIP	<i>blaZ</i>	1	0	1
PEN TET GEN SUT	CIP ERI ENO	<i>blaZ</i>	1	0	1
PEN TET GEN SUT	CIP DOX	<i>blaZ</i>	1	0	1
PEN TET GEN SUT	DOX	<i>blaZ</i>	4	1	5
PEN TET GEN SUT		<i>blaZ</i>	0	1	1
TET GEN SUT	DOX	<i>blaZ</i>	1	0	1
PEN SUT		<i>blaZ</i>	1	0	1
TET SUT		<i>blaZ</i>	0	1	1
SUT	ERI	<i>blaZ</i>	1	0	1
SUT		<i>blaZ</i>	10	9	19
PEN TET OXA DOX ERI SUT			0	1	1
PEN TET CFE OXA SUT			1	0	1
PEN TET GEN DOX SUT			0	1	1
PEN TET GEN SUT	DOX		1	0	1
PEN TET SUT	GEN DOX		1	0	1
PEN SUT	TET DOX		1	0	1
PEN SUT	GEN		0	1	1
SUT			4	8	12

T = vacas tratadas, NT = vacas não tratadas, PEN= penicilina, GEN= gentamicina, ENO= enrofloxacin, CIP= ciprofloxacina, NOR= norfloxacina, ERI= eritromicina, NIT= nitrofurantoína, TET= tetraciclina; DOX= doxiciclina, SUT= sulfametoxazol-trimetoprim, OXA= oxacilina, CFE= cefalexina

Tabela 15. Padrões de resistência de estipes de *S. epidermidis* isoladas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Perfil			N	NT	Total
Resistente	Intermediário	Genes			
PEN TET OXA DOX ERI SUT		<i>blaZ mecA</i>	0	1	1
PEN TET DOX ERI SUT		<i>blaZ mecA</i>	2	0	2
PEN TET OXA SUT	DOX	<i>blaZ mecA</i>	1	0	1
PEN TET DOX SUT		<i>blaZ mecA</i>	0	1	1
PEN OXA ERI SUT		<i>blaZ mecA</i>	1	1	2
PEN OXA SUT		<i>blaZ mecA</i>	1	0	1
SUT		<i>blaZ mecA</i>	3	0	3
PEN TET DOX ERI SUT OXA		<i>mecA</i>	1	0	1
GEN DOX ERI SUT	TET	<i>baZ</i>	1	0	1
TET DOX ERI SUT		<i>blaZ</i>	1	0	1
ERI SUT	GEN	<i>blaZ</i>	1	0	1
ERI SUT	GEN		1	0	1
PEN TET OXA DOX ERI SUT			0	1	1

T = vacas tratadas, NT = vacas não tratadas, PEN= penicilina, GEN= gentamicina, ENO= enrofloxacina, CIP= ciprofloxacina, NOR= norfloxacina, ERI= eritromicina, NIT= nitrofurantoína, TET= tetraciclina; DOX= doxiciclina, SUT= sulfametoxazol-trimetoprim, OXA= oxacilina, CFE= cefalexina

Tabela 16. Padrões de resistência de estipes de *S. chromogenes* isoladas de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia.

Perfil			T	NT	Total
Resistente	Intermediário	Genes			
SUT		<i>blaZ</i>	4	5	9
PEN SUT		<i>blaZ</i>	0	2	2
PEN TET GEN SUT	DOX	<i>blaZ</i>	0	1	1
NOR PEN NIT TET CIP		<i>blaZ</i>	0	1	1
CFE DOX SUT ENO					
SUT		-	13	1	14
PEN CFE OXA SUT		-	1	0	1

T = vacas tratadas, NT = vacas não tratadas, PEN= penicilina, GEN= gentamicina, ENO= enrofloxacina, CIP= ciprofloxacina, NOR= norfloxacina, ERI= eritromicina, NIT= nitrofurantoína, TET= tetraciclina; DOX= doxiciclina, SUT= sulfametoxazol-trimetoprim, OXA= oxacilina, CFE= cefalexina

Resistência múltipla às drogas foi também verificada em *S. epidermidis* (5,2%) e *S. chromogenes* (2,8%) em estudo de Kim et al. (2019), em que o *S. epidermidis* apresentou maior resistência comparada às outras espécies de CoNS.

Hoque et al. (2018) observaram que 49,0% dos *S. aureus* isolados de mastites em Bangladesh foram MDR. Na Etiópia todas as estirpes de *S. aureus* e CoNS oriundas de mastites apresentaram resistência a mais de três classes de antimicrobianos (Beyene et al., 2017), e na Ilha de São Luís – MA, Costa et al. (2018) evidenciaram elevada ocorrência de *S. aureus* resistentes a multidrogas em vacas com mastites.

As poucas mudanças na última década, quanto às classes de antimicrobianos disponíveis para uso no tratamento de animais destinados a pecuária leiteira, fazem com que não sejam esperadas alterações drásticas na prevalência de resistência antimicrobiana em patógenos da mastite. No entanto, modificações na indústria leiteira impactarão o uso de antimicrobianos por duas tendências: adoção de terapia seletiva em vez de terapia de vaca seca e transição para práticas de agricultura orgânica (Nobrega et al., 2018). Estudo pioneiro de Park et al. (2012) verificou alterações na resistência a antibióticos durante a transição longitudinal do manejo convencional para o orgânico, em que a diminuição da taxa de resistência à beta-lactamase do CoNS foi equiparável à descontinuação do uso de antibióticos beta-lactâmicos, e sugerem que a interrupção do uso de antibióticos em fazendas de gado leiteiro em passagem para o manejo orgânico, diminua o número de patógenos resistentes a antibióticos.

No presente trabalho, o baixo nível de resistência *in vitro* aos agentes antimicrobianos testados, exceto para o sulfametoxazol-trimetoprim, pode ser justificado pelo fato de as estirpes terem sido originadas de animais de um único rebanho, no qual as escolhas dos antimicrobianos para a terapia da mastite eram realizadas de forma criteriosa, em que poucos princípios ativos foram utilizados antes e durante o tratamento. Apesar da baixa prevalência observada de estirpes MDR, tal fato não deve ser ignorado, uma vez que são crescentes as taxas de resistência a macrolídeos, fluorquinolonas, beta-lactâmicos e outros antibióticos utilizados contra bactérias Gram-positivas, principalmente em intervenções graves causadas por bactérias MDR. Diante disso, em breve os tratamentos atuais podem não ser eficazes contra infecções tratáveis (Koulenti et al., 2020). Estão descritos na Tabela 17 os perfis de virulência e resistência de estirpes MRSE.

Tabela 17. Perfil de virulência e resistência de *Staphylococcus* spp. metilina resistentes isolados de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia, com as respectivas contagens de células somáticas.

ID	CCS Valor	Biofilme	Genes											Antibiograma
			IcaA	IcaD	IcaC	IcaB	atlE	bap	bhp	aap	MecA	SCCmec	blaz	
976	197	FRA	N	P	P	N	P	P	N	P	P	I	P	PEN TET OXA DOX ERI SUT
922	2597	FOA	P	P	N	N	P	P	N	P	P	I	P	SUT
922	994	FOA	P	P	N	N	P	P	N	P	P	I	P	PEN OXA SUT
869	1917	FOA	P	N	N	N	N	N	N	P	P	I	P	PEN TET DOX ERI SUT
869	1143	FOA	P	P	N	N	P	N	N	P	P	I	P	SUT
924	333	FOA	N	N	N	N	P	N	N	P	P	I	P	PEN TET DOX SUT
869	1493	FOA	N	N	N	N	P	N	N	P	P	I	P	PEN TET DOX ERI SUT
1013	1856	FOA	N	N	N	N	P	N	N	P	P	I	P	PEN OXA ERI SUT
826	2573	FOA	N	N	N	N	P	N	N	P	P	I	P	PEN OXA ERI SUT
869	207	FOA	N	N	N	N	N	N	N	P	P	I	N	PEN TET DOX ERI SUT OXA
926	1612	FOA	N	N	N	N	P	N	N	P	P	I	P	SUT
870	413	FOA	N	N	N	N	P	N	N	P	P	I	P	PEN TET OXA SUT

ID = identificação do animal, N= negativo, P=positivo, CCS= contagem de células somáticas, I= SCCmec tipo I, FOA= forte aderente, FRA= fraco aderente, PEN= penicilina, GEN= gentamicina, ENO= enrofloxacin, CIP= ciprofloxacina, NOR= norfloxacina, ERI= eritromicina, NIT= nitrofurantoína, TET= tetraciclina, DOX= doxiciclina, SUT= sulfametoxazol-trimetoprim, OXA= oxacilina, CFE= cefalexina

Os perfis de restrição enzimática de *S. epidermidis* (Figura 4), *S. chromogenes* (Figura 5) e *S. aureus* (Figura 6) estão ilustrados a seguir. A menor frequência de isolamentos de *S. warneri* e *S. agnetis* impediu a investigação de clusters para essas espécies.

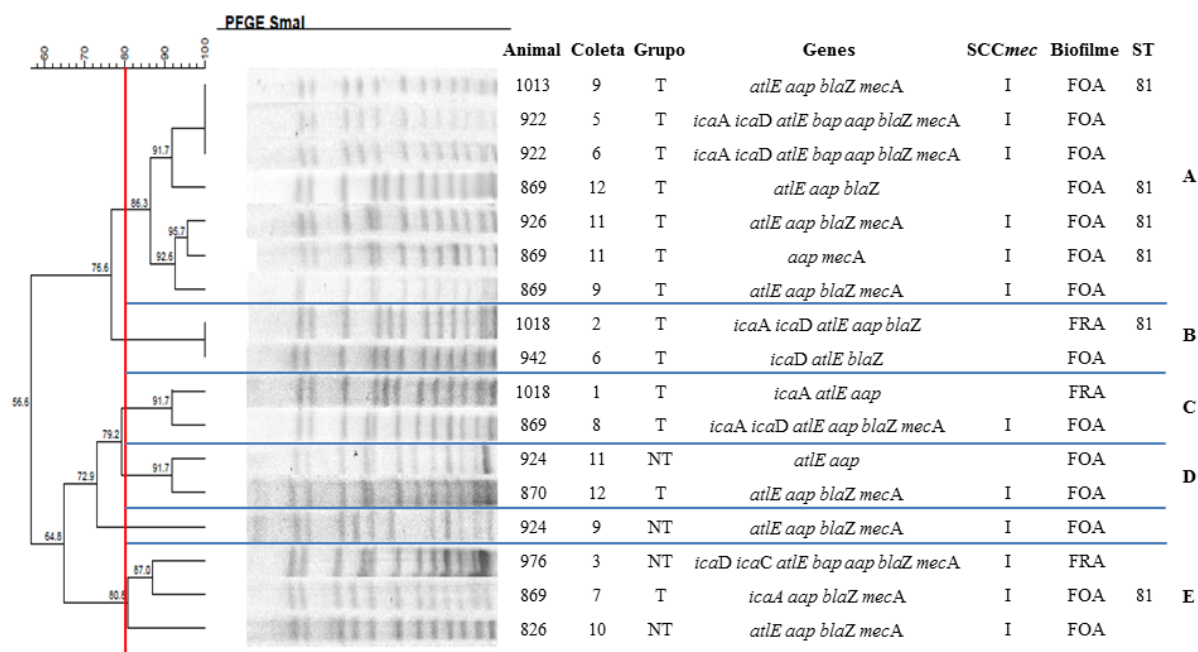


Figura 4. Dendrograma dos perfis PFGE-SmaI de estirpes de *S. epidermidis* provenientes de vacas não tratadas e tratadas com homeopatia.

As estirpes de *S. epidermidis* agruparam-se em cinco *clusters* (A, B, C, D e E) e um único isolado (vaca 924) (Figura 4). O *cluster A* foi majoritário, composto por sete estirpes, das quais duas foram isoladas do animal 922, no quinto e sexto mês de coleta, e demonstraram o mesmo perfil genético de PFGE com 100% de similaridade. Os animais 1013, 869 e 926 também apresentaram mastite subclínica por *S. epidermidis*, em coletas posteriores às estirpes isoladas da vaca 922, o que sugere que a transmissão da mastite ocorreu mesmo com o tratamento homeopático. Nesse *cluster*, todas as estirpes foram isoladas de vacas tratadas com homeopatia e demonstraram forte produção de biofilme, o que pode ter contribuído para maior persistência e disseminação desses patógenos no rebanho. É possível observar também no *cluster A* que o gene *mecA* foi persistente no animal 922, que manteve os mesmos genes associados à produção de biofilmes e resistência à penicilina, tipo SCCmec e fenotípico para produção de biofilmes. Kim et al. (2019), em estudo na

Coreia, verificaram que isolados de *S. epidermidis* que carregavam o gene *mecA* produziram biofilmes e foram persistentes em fazendas leiteiras.

Quatro *clusters* menores (B, C, D e E), compostos por duas ou três estirpes, também foram agrupados para o *S. epidermidis*, em que os *clustes* D e E foram os únicos que apresentaram diversidade quanto à origem das estirpes, uma vez que cada *cluster* continha estirpes isoladas tanto de vacas tratadas como do grupo de vacas não tratadas, o que sugere que a transmissão da mastite ocorreu também entre animais de grupos distintos. Apenas o isolado do animal 924 na coleta “9” não esteve claramente relacionado aos outros *clusters* de *S. epidermidis* (Figura 4).

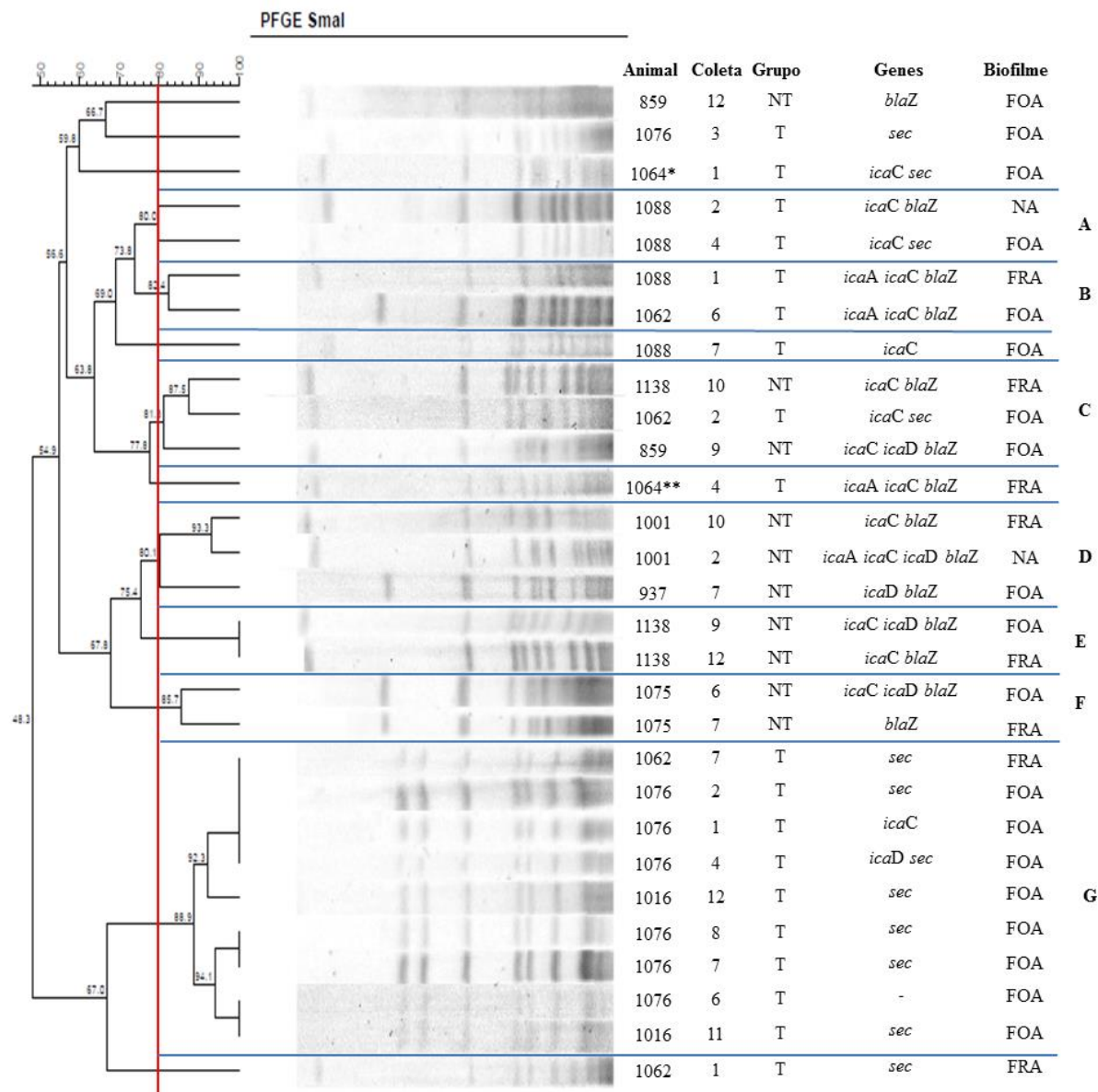


Figura 5. Dendrograma dos perfis PFGE-SmaI de estirpes de *S. chromogenes* provenientes de vacas não tratadas e tratadas com homeopatia.

As estirpes de *S. chromogenes* foram agrupadas em sete *clusters* (A, B, C, D, E, F e G), e seis estirpes foram geneticamente distintas de todos os agrupamentos (859, 1076, 1064*, 1088, 1064**, 1062) (Figura 5). Assim como para *S. epidermidis*, houve predominância de um perfil clonal entre as linhagens de *S. chromogenes*, correspondente ao *cluster* G. Nele houve agrupamento de nove estirpes, o que sugere uma possível transmissão da mastite subclínica entre animais. Tipos predominantes de *S. chromogenes* podem estar relacionados à adaptação do úbere, além de contribuírem com sua disseminação pela transmissão vaca a vaca (Qu et al., 2019). Dentre as nove estirpes identificadas dentro do *cluster* G, seis delas foram identificadas em um mesmo animal em meses intermitentes. Todas elas estavam presentes em vacas submetidas ao tratamento homeopático. O *cluster* majoritário também concentrou um maior número de estirpes com gene codificador da toxina C (*sec*) e com forte produção de biofilme, que pode ter contribuído para a maior persistência e disseminação de patógenos entre os animais.

Nos *clusters* menores também foi observada uma possível transmissão e/ou origem comum da mastite entre animais e a persistência da doença em vacas tratadas do *cluster* A e em vacas não tratadas nos *clusters* D, E e F (Figura 5). O gene *blaZ* foi persistente nos *clusters* D, E e F para os animais 1001, 1138 e 1075, respectivamente. Nas linhagens dos *clusters* menores verificou-se maior persistência dos genes relacionados com a produção de biofilme do que no *cluster* majoritário. É importante ressaltar que tanto os *clusters* de *S. epidermidis* quanto os de *S. chromogenes* foram constituídos fundamentalmente por estirpes pertencentes a animais que receberam tratamento homeopático.

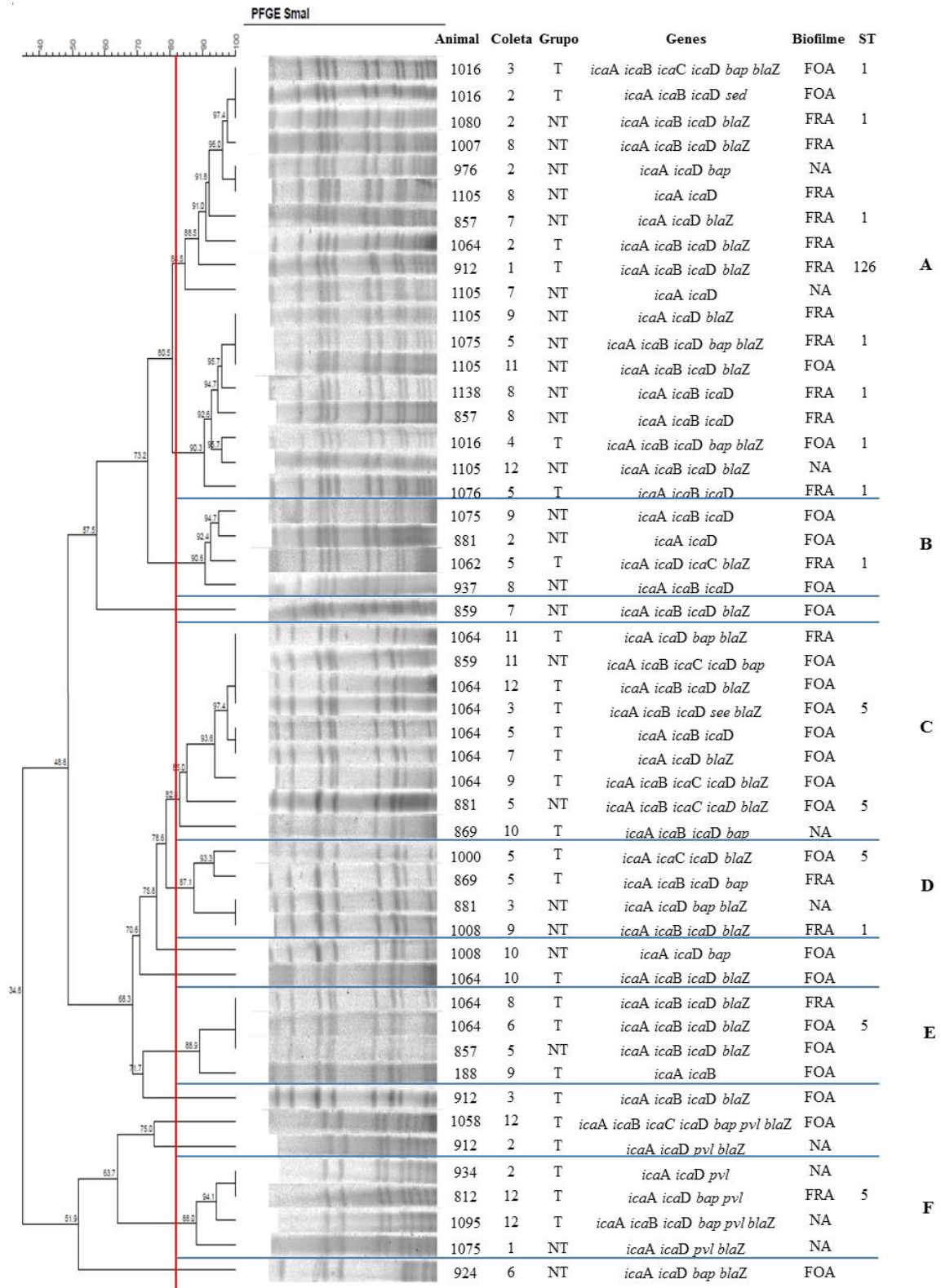


Figura 6. Dendrograma dos perfis PFGE-Smal de estirpes de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas não tratadas e tratadas com homeopatia.

Diferentemente dos perfis clonais das duas espécies de CoNS, não foi notada a predominância de um único perfil clonal para *S. aureus*. O perfil de restrição enzimática de *S. aureus* revelou seis *clusters* (A, B, C, D, E e F) e sete linhagens geneticamente distintas (859, 1008, 1064, 912, 1058, 912 e 924). Em cada *cluster* houve diversidade das linhagens, relacionada ao tratamento homeopático, demonstrando que houve grande disseminação de *S. aureus* em vacas tratadas e não tratadas com homeopatia. Entretanto, essa distribuição entre animais tratados e não tratados ocorreu nos primeiros cinco meses de acompanhamento do rebanho. No sexto mês esse perfil não foi isolado e, a partir do sétimo mês, foi exclusivo em animais não tratados com homeopatia. Esse clone foi isolado em um animal tratado por quatro meses consecutivos. No quinto mês essa vaca tratada saiu da linha de ordenha por entrar em período seco. Micro-organismos que possuem genótipos idênticos podem conter características que possibilitam vantagens para a sua sobrevivência no ambiente e também colonização do úbere (Buzzola et al., 2001). Adaptação do hospedeiro a espécies bacterianas resulta em infecções mais persistentes associadas a doenças menos graves clinicamente, contribuindo assim para a ocorrência de estirpes dominantes no rebanho, bem como sua persistência.

É possível observar um perfil persistente de genes codificadores de biofilme em todos os *clusters*, o que pode ter contribuído para a persistência da mastite e maior disseminação de *S. aureus* no rebanho. A maior prevalência do gene *pvl* foi detectada no *cluster* F.

Estudos epidemiológicos demonstram uma variedade de perfis moleculares de *S. aureus* na etiologia da mastite, como observado por Rossi et al. (2019) em vacas mastíticas acompanhadas por dozes meses. Estes autores ressaltaram a relevância de informações sobre os reservatórios de *S. aureus* em infecções subclínicas, que poderia ajudar na prevenção da doença.

Os complexos clonais pela técnica de MLST foram estudados para *S. aureus* e *S. epidermidis*, por existirem bancos de dados para essas espécies, diferentemente de *S. chromogenes*. As análises foram realizadas para estirpes que representavam diferentes *clusters* identificados pela técnica de PFGE. Os complexos clonais 1, 5 e 126 foram identificados para as estirpes de *S. aureus*, representados pelos Sequence types (ST) de mesmas numerações. STs 1 e 5 também foram identificados por Zhang

et al. (2016), que caracterizaram tais espécies como resistentes à penicilina e ampicilina, além de fortemente formadoras de biofilmes. Estes autores relatam a identificação prévia desses STs em infecções humanas na Ásia, África e Europa, mas pela primeira vez relataram-nas como responsáveis pela mastite. Consulta ao banco de dados disponível em pubmlst.org, em fevereiro de 2020, mostra que o ST1 apresenta 451 descrições em diferentes enfermidades em vários países como Reino Unido, Canadá e Dinamarca, inclusive causando mastite no Japão, Holanda, Itália, Irlanda e Brasil, no estado do Paraná. O ST5, por sua vez, apresenta 3995 descrições em fevereiro de 2020 (pubmlst.org), com relatos de envolvimento em casos de mastite bovina na Irlanda e no Japão. No Brasil, existem relatos para o isolamento do ST5 a partir de suabes nasais, orofaríngeos, em pele e em casos de bacteremias.

S. aureus ST126 foi encontrado no presente estudo e, até fevereiro de 2020, apresentava 10 descrições cadastradas (pubmlst.org). Dentre estas descrições, oito são originárias do Brasil, com micro-organismos isolados em casos de mastite e em leite não pasteurizado nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. Snel et al. (2015) também isolaram o *S. aureus* ST126 de casos de mastite bovina na Itália.

Todas as estirpes de *S. epidermidis* avaliadas pertenciam à ST 81. Isso indica uma possível origem comum, sobretudo porque o trabalho foi baseado em um único rebanho. Em banco de dados online consultado para *S. epidermidis* (pubmlst.org), verificou-se que há seis descrições para essa ST, na Dinamarca, Polônia, Rússia e Brasil, inclusive em caso de mastite bovina originário de Santa Catarina. O MLST é um método menos discriminatório que o PFGE e não é surpreendente que tenhamos ST semelhantes para as estirpes submetidas a essa técnica de identificação.

Biofilmes estão entre os fatores de virulência mais importantes para CoNS e estão relacionados com resistência a terapias antimicrobianas e à cronicidade da infecção (Ahmed et al., 2019). Estudos demonstram a relação entre a formação de biofilme por CoNS e infecções intramamárias persistentes (Tremblay et al., 2013). A presença de *Staphylococcus* spp. em animais tratados com homeopatia é preocupante, já que o consumidor tem a impressão do leite orgânico ser um produto mais saudável, porém estes micro-organismos podem acarretar problemas para a saúde pública, como surtos de intoxicação alimentar pelo consumo de produtos lácteos contaminados (Ren et al., 2020). Atualmente, a homeopatia tem desfrutado de

grande popularidade e crescimento, principalmente em fazendas orgânicas (Keller e Sundrum, 2018), no entanto, a qualidade de seus produtos deve ser mais bem avaliada do ponto de vista da segurança alimentar, uma vez que podem persistir patógenos com genes de virulência com potencial de causar danos à saúde da população.

Infecções crônicas sustentadas por biofilmes são extremamente resistentes aos agentes antimicrobianos e às defesas do hospedeiro, além de fornecerem mecanismos através dos quais micro-organismos do ambiente podem circular nos animais e destes ao ambiente (Costa et al., 2020). O mecanismo regulador do biofilme é complexo e ainda não está totalmente elucidado (Meroni et al., 2019). Diante disto, o monitoramento da capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. e dos genes envolvidos fornecerão novas ideias ou estratégias para a prevenção e tratamento eficaz da mastite bovina (Darwish e Asfour, 2013). A ausência de influência positiva da homeopatia sobre a presença de micro-organismos no leite dos animais faz com que estes micro-organismos, causadores de mastites e portadores de genes codificadores de biofilme, possam ser disseminados entre animais, ordenhadores e ambiente de ordenha.

6. CONCLUSÕES

- ✓ *Staphylococcus* spp. foram isolados no leite de vacas tratadas e não tratadas com homeopatia, com predominância de CoNS nos animais que receberam o tratamento;
- ✓ Riscos à saúde pública podem ocorrer após o consumo de leite e derivados lácteos originados de animais tratados com homeopatia, uma vez que genes codificadores de toxinas estafilocócicas foram identificados em leite de vacas tratadas;
- ✓ A ocorrência de genes codificadores e a produção de biofilme ocorreu em *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de vacas tratadas e não tratadas, uma característica que pode ter favorecido a manutenção dos micro-organismos no rebanho durante o período de tempo analisado;
- ✓ *Staphylococcus* spp. apresentou potencial de disseminação de genes de resistência antimicrobiana e baixa diversidade de tipos genéticos relacionados ao SCCmec, além da circulação de estirpes com capacidade de múltipla resistência aos antimicrobianos em vacas tratadas e não tratadas com homeopatia, representando o risco de disseminação destes patógenos no ambiente e em pessoas que trabalham diretamente com esses animais;
- ✓ Houve persistência no rebanho de *Staphylococcus* spp. relacionados com a mastite durante o período de tempo estudado, similares às estirpes isoladas no Brasil e em outros países.

7. REFERÊNCIAS

- Agabou A, Ouchenane Z, Ngba Essebe C, Khemissi S, Chehboub MTE, Chehboub IB, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lavigne JP (2017) Emergence of nasal carriage of ST80 and ST152 PVL+ *Staphylococcus aureus* isolates from livestock in Algeria. **Toxins** 9: 1-12.
- Aghamohammadi M, Haine D, Kelton DF, Barkema HW, Hogeveen H, Keefe GP, Dufour S (2018) Herd-level mastitis-associated costs on canadian dairy farms. **Frontiers Veterinary Science** 5: 100.
- Ahmed DM, Messih MAWA, Ibrahim NH, Meabed MH, Abdel-Salam SM (2019) Frequency of *icaA* and *icaD* determinants and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci associated with nasal carriage in neonatal intensive care units. **Germes** 9: 61-70.
- Almeida LAB, Brito MAVP, Brito JRF, Pires MFA, Benites NR (2005) Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico** 72: 1-6.
- Alonzo F, Torres VJ. (2014) The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 78: 199 – 230.
- Andrey DO, Jousselin A, Villanueva M, Renzoni A, Monod A, Barras C, Rodriguez N, Kelley WL (2015) Impact of the regulators sigb, rot, sara and sars on the toxic shock tst promoter and tsst-1 expression in *Staphylococcus aureus*. **Plos One** 10: 1-8.
- Antók FI, Mayrhofer R et al (2020) Characterization of antibiotic and biocide resistance genes and virulence factors of staphylococcus species associated with bovine mastitis in Rwanda **Antibiotics** 9: 1-17.
- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology** 39: 2151-2156.
- Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L (2015) Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 5: 1-10.
- Asano K, Asano Y, Ono HK, Nakane A (2014) Suppression of starvation-induced autophagy by recombinant toxic shock syndrome toxin-1 in epithelial cells. **Plos One** 9: 1-24.
- Banos G, Bramis G, Bush SJ, Clark EL, McCulloch MEB, Smith J, Schulze G, Arsenos G, Hume DA, Psifidi A (2017) The genomic architecture of mastitis resistance in dairy sheep. **BMC Genomics** 18: 624.

Baran W, Adamek E, Ziemiańska J, Sobczak A (2011) Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials** 196: Pages 1-15.

Baran W, Adamek E, Włodarczyk A, Lazur J, Opoka W, Muszyńska B (2020) The remediation of sulfonamides from the environment by *Pleurotus eryngii* mycelium. Efficiency, products and mechanisms of mycodegradation. **Chemosphere** 262: 128026.

Barbosa AS, Nero BD, Ambrosio CE (2013) Terapia homeopática em dermatopatias de gatos - revisão de literatura. **Acta Veterinária Brasileira** 7: 29-37.

Barry T, Glennon CM, Dunican LK, Gannon F (1991) The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **PCR Methods Applications** 1: 51-62.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acessado em: maio de 2019.

Bentley Instruments (1995) Somacount 300: operator's manual. Chaska. 12p.

Beyene T, Hayishe H, Gizaw F, Beyi AF, Abunna F, Mammo B, Ayana D, Waktole H, Abdi RD (2017) Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. **BMC Research Notes** 10: 171.

Bowden MG, Chen W, Singvall J, Xu Y, Peacock SJ, Valtulina V, Speziale P, Höök M (2005) Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology** 151: 1453-1464.

Brito MAVP, Brito JRF (1999) Diagnóstico microbiológico da mastite. Juiz de Fora-MG: Embrapa Gado de Leite 26p.

Bukowski M, Wladyka B, Dubin G (2010) Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins (Basel)** 2: 1148-1165.

Büttner H, Mack D, Rohde H (2015) Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 5: 14.

Buzzola FR, Quelle L, Gomez MI, Catalano M, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Denamiel G, Sordelli DO (2001) Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. **Epidemiology & Infection** 126: 445-452.

Caruso M, Latorre L, Santagada G, Fraccalvieri R, Miccolupo A, Sottili R, Palazzo L, Parisi (2016) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. **Small Ruminant Research** 135: 26-31.

Cavicchioli VQ, Scatamburlo TM, Yamazi AK, Pieri FA, Nero LA (2015) Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Dairy Science** 98: 8386-8390.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology** 22: 996-1006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2016) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard- 26th Edition (M100S).

Coombs GW, Baines SL, Howden BP, Swenson KM, O'Brien FG (2020) Diversity of bacteriophages encoding Pantón-Valentine leukocidin in temporally and geographically related *Staphylococcus aureus*. **Plos One** 15: e0228676.

Costa FN, Belo NO, Costa EA, Andrade GI, Pereira LS, Carvalho LS, Santos RL (2018) Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1. And biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the northeast of Brasil. **Tropical Animal Health and Production** 5: 1089-1097.

Costa PSB, Oliveira LT, Pedroso RS, Tosta PO, Martins CHG, Jamur MC, Pires RH (2020) Single-species (bacterial, fungal, or mycobacterial) biofilms or dual-species (mycobacterial-fungal) biofilms formed in dialysis fluids. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 96: 114870.

Costerton JW, Stewart Philip S, Greenberg EP (1999). Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. **Science** 284: 1318-1322.

Côté-Gravel J, Brouillette E, Malouin F (2019) Vaccination with a live-attenuated small-colony variant improves the humoral and cell-mediated responses against *Staphylococcus aureus*. **Plos One** 14: 1-16.

Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, De Lencastre H (2001) Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology** 39: 3099-3103.

Cucarella C, Tormo MA, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR (2004). Role of biofilm - associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity** 72: 2177-2185.

Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP (2006) Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology** 37: 64-69.

Dai L, Yang L, Parsons C, Findlay VJ, Molin S, Qin Z (2012) *Staphylococcus epidermidis* recovered from indwelling catheters exhibit enhanced biofilm dispersal and "self-renewal" through downregulation of *agr*. **BMC Microbiology** 12: 102.

Dai H, Coleman DN, Hu L, Martinez-Cortés I, Wang M, Parys C, Shen X, Looor JJ. (2020) Methionine and arginine supplementation alter inflammatory and oxidative stress responses during lipopolysaccharide challenge in bovine mammary epithelial cells in vitro. **Journal of Dairy Science** 103: 676-689.

Darwish SF, Asfour HAE (2013) Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **The Scientific World Journal** 2013: 1-10.

De Vliegher S, Fox LK, Piepers S, Mcdougall S, Barkema HW (2012) Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science** 95: 1025-1040.

Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, Yang C, Cao C, Lu Y, Li M (2013) Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. **Plos One** 8: 1-10.

Duracova M, Klimentova J, Fucikova A, Dresler J (2018) Proteomic methods of detection and quantification of protein toxins. **Toxins (Basel)** 10: 2-30.

Ebert F, Staufenbiel R, Simons J, Pieper L (2017) Randomized, blinded, controlled clinical trial shows no benefit of homeopathic mastitis treatment in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 100: 4857-4867.

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** 38: 1008-1015.

Epe C, Samson-Himmelstjerna GV, Wirtherle N, Heyden VVD, Welz C, Beening J, Radeloff I, Hellmann K, Schnieder T, Krieger K (2005) Efficacy of toltrazuril as a metaphylactic and therapeutic treatment of coccidiosis in first-year grazing calves. **Parasitology Research** 97: S127–S133.

Fang R, Cui J, Cui T, Guo H, Ono HK, Park CH, Okamura M, Nakane A, Hu DH (2019) staphylococcal enterotoxin c is an important virulence factor for mastitis. **Toxins** 11: 1-13.

Feng Y, Qi W, Xu-rong W, Ling W, Xin-pu L, Jin-yin L, Shi-dong Z, Hong-sheng L (2016) Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. **Journal of Integrative Agriculture** 15: 2842–2847.

Feng Y, Long-hai L et al (2017) Penicillin-resistant characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Gansu, China **Journal of Integrative Agriculture** 16: 1874–1878.

Fisher EA, Paterson GK (2020) Prevalence and characterisation of methicillin-resistant staphylococci from bovine bulk tank milk in England and Wales. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 20: 30014-X.

Fisher EL, Otto M, Cheung GC (2018) Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. **Frontiers in Microbiology** 9: 436.

Franck KT, Gumpert H, Olesen B, Larsen AR, Petersen A, Bangsbo J, Albertsen P, Westh H, Bartels MD (2017) *Staphylococcal aureus* enterotoxin c and enterotoxin-like I associated with post-partum mastitis. **Frontiers in Microbiology** 8: 173.

Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock RE (2013) Bacterial biofilm development as multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion Microbiology** 16: 580-589.

Fursova KK, Shchannikova MP et al (2018) Exotoxin diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis in Central Russia. **Journal of Dairy Science** 101: 4325-4331.

Ghanwate N, Thakare P, Bhise PR, Gawande S (2016) Colorimetric method for rapid detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and its comparison with PCR for *mecA* gene. **Scientific Reports – Nature** 6: 23013.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for panton-valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **The Lancet** 359: 753-759.

Goetz C, Tremblay YDN, Lamarche D, Blondeau A, Gaudreau AM, Labrie J, Malouin F, Jacques M (2017) Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. **Journal of Dairy Science** 100: 6454-6464.

Gomes F, Henriques M (2016) Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. **Current Microbiology** 72: 377-382.

Gómez-Sanz E, Ceballos S, Ruiz-Ripa L, Zarazaga M, Torres C (2019) Clonally diverse methicillin and multidrug resistant coagulase negative staphylococci are ubiquitous and pose transfer ability between pets and their owners. **Frontiers in Microbiology** 10: 1-17.

Grispoli L, Massetti L, Sechi P, Iulietto MF, Ceccarelli M, Karama M, Popescu PA, Pandolfi F, Cenci-Goga BT (2019) Short communication: characterization of enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Dairy Science** 102: 1059-1065.

Grunert T, Stessl B, Wolf F, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M (2018) Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. **Scientific Reports** 8: 1-10.

Guillén R, Carpinelli L et al (2016) *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos. **Revista Chilena de Infectología** 33: 6.

Guimarães FF, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, Pantoja FJC, Langoni H (2013) Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science** 96: 2866-2872.

Guo Y, Ding Y, Liu L, Shen X, Hao Z, Duan J, Jin Y, Chen Z, Yu F (2019) Antimicrobial susceptibility, virulence determinants profiles and molecular characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates in Wenzhou, eastern China. **BMC Microbiology** 19: 1-11.

Hamadani H, Khan AA, Banday MT, Ashraf I, Handoo N, Shah SB, Hamadani A (2013) Bovine mastitis - a disease of serious concern for dairy farmers. **International Journal of Livestock Research** 3: 42-55.

Harmon RJ, Eberhart RJ, Jasper DE, Langlois BE, Wilson RA (1990) Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. National Mastitis Council, Arlington. 34p.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology** 9: 486-493.

Holmberg O (1973) *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica** 45: 1-144.

Hoque MN, Das ZC, Rahman ANMA, Haider MG, Islam MA (2018) Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. **International Journal of Veterinary Science and Medicine** 6: 53-60.

Hou W, Sun X, Wang Z, Zhang Y (2012) Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. **Invertigative Ophythamology e Visual Science** 53: 5624-5631.

Hruska K, Franek M (2012) Sulfonamides in the environment: a review and a case report. **Veterinarni Medicina** 57: 1–35.

Hryniewicz MM.; Garbacz K (2017) Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected? **Journal of Medical Microbiology** 66: 1367–1373.

Imanishi I, Nicolas A et al (2019) Exfoliative toxin E, a new *Staphylococcus aureus* virulence factor with host-specific activity. **Scientific Reports** 9: 16336.

Isaac P, Bohl LP, Breser ML, Orellano MS, Conesa A, Ferrero MA, Porporatto C (2017) Commensal coagulase-negative *Staphylococcus* from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. **Veterinary Microbiology** 207: 259-266.

Jenkins SN, Okello E et al (2019) Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. **PeerJ** 7: 2-25.

Jia F, Ma W, Zhang X, Wang D, Zhou X (2020) Matrine and baicalin inhibit apoptosis induced by panton-valentine leukocidin of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science** 103: 2731-2742.

Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin. In: *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology** 29: 426-430.

Kaase M, Lenga S, Friedrich S, Szabados F, Sakinc T, Kleine B, Gatermann SG (2008) Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection** 4: 614-616.

Keller D, Sundrum A. (2018) Eficácia comparativa da homeopatia individualizada e antibióticos no tratamento da mastite clínica bovina: estudo controlado randomizado. Registro Veterinário. 407p.

Kibebew K (2017) Bovine mastitis: a review of causes and epidemiological point of view. **Journal of Biology, Agriculture Healthcare** 7: 1-14.

Kiesner K, Wente N, Volling O, Krömker V (2016) Selection of cows for treatment at dry-off on organic dairy farms. **Journal of Dairy Research** 83: 468-475.

Kim SJ, Moon DC, Park SC, Kang HY, Na SH, Lim SK (2019) Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea. **Journal of Dairy Science** 102: 11439-11448.

Klibi A, Maaroufi A, Torres C, Jouini A (2018) Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. **International Journal of Antimicrobial Agents** 52: 930-935.

Kong C, Neoh H, Nathan S (2016) Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. **Toxins (Basel)** 8: 1-21.

Koning S, van Belkum A et al (2003). Severity of nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Pantón-Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid pSK41. **Journal of Clinical Microbiology** 41: 3017-3021.

Kot B, Szweda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K (2016) Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **Journal of Dairy Research** 83: 228-235.

Koulenti D, Xu E, Song A, Mok IYS, Drosos E, Armaganidis A, Tsiodras S, Lipman J (2020) Emerging treatment options for infections by multidrug-resistant gram-positive microorganisms. **Microorganisms** 8: 191.

Krieg NR, Holt JC (1994) Bergey's manual of systematic bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.984.

Kurjogi MM, Kaliwal BB (2014) Epidemiology of bovine mastitis in cows of Dharwad district. **International Scholarly Research Notices** 2014: 968076.

Lakhundi S, Zhang K (2018) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews** 31: 1-103.

Langoni H (2013) Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33: 620-626.

Lee S, Hwang J, Kim J, Lee J, Kim H, Rhim H, Han J (2019) Biofilm production of coagulase-negative staphylococci isolated from rescued wild animals in the Republic of Korea. **Acta Veterinaria Scandinavica** 61: 50.

Liu XL, Roux MJ, Picaud S, Keller D, Sauer A, Heitz P, Prévost G, Gaucher D (2018) Panton-valentine leucocidin proves direct neuronal targeting and its early neuronal and glial impacts a rabbit retinal explant model. **Toxins (Basel)** 10: 455.

Lozano C, Gharsa H, Ben Slama K, Zarazaga M, Torres C (2016) *Staphylococcus aureus* in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. A review in the African continent. **Microorganisms** 4: 12-30.

Ma X, Chang W, Zhang C, Zhou X, Yu F (2012) *Staphylococcal* panton-valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa b activation in neutrophils. **Plos One** 7: e34970.

Machado ABMP, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL (2007) Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in Southern. **Journal of Medical Microbiology** 56: 1328-1333.

Magro G, Biffani S, Minozzi G, Ehricht R, Monecke S, Luini M, Piccinini R (2017) Virulence genes of *S. aureus* from dairy cow mastitis and contagiousness risk. **Toxins (Basel)** 9: 195.

Maina EK, Hu DL, Tsuji T, Omoe K, Nakane A (2012) Staphylococcal enterotoxin A has potent superantigenic and emetic activities but not diarrheagenic activity. **International Journal of Medical Microbiology** 302: 88-95.

Marques VF, Motta CC, Soares BD, Melo DA, Coelho SM, Coelho ID, Barbosa HS, Souza MM (2017) Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastites. **Brazilian Journal Microbiology** 48: 118-124.

Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1998) Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** 36: 618-623.

Mathews AA, Thomas M, Appalaraju B, Jayalakshmi J (2010) Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. **Indian Journal of Pathology & Microbiology** 53: 79-82.

McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP (2015) Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology** 5: 1-9.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, Mcallister SK, Tenover FC (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal Clinical Microbiology** 41: 5113-5120.

McMillan K, Moore SC, McAuley CM, Fegan N, Fox EM (2016) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. **BMC Microbiology** 16: 1-12.

Mekonnen AS, Lam TJGM, Hoekstra J, Rutten VPM, Tessema TS, Broens EM, Rieseboos AE, Spaninks MP, Koop G (2018) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows in small holder farms of North-Western Ethiopia. **BMC Veterinary Research** 14: 1-8.

Mellmann A, Becker K, Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D (2006) Sequencing and staphylococci identification. **Emerging Infectious Diseases** 12: 333-336.

Mello PL, Riboli DFM, Pinheiro L, Martins LA, Brito MAVP, Cunha MLRS. (2016) Detection of enterotoxigenic potential and determination of clonal profile in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis in different Brazilian states. **Toxins** 8: 1-10.

Meroni G, Zamarian V, Prussiani C, Bronzo V, Lecchi C, Martino PA., Cecilian F (2019) The bovine acute phase protein α 1-acid glycoprotein (AGP) can disrupt *Staphylococcus aureus* biofilm. **Veterinary Microbiology** 235: 93-100.

Milheiriço C, Oliveira DC, De Lencastre H (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 51: 3374-3377.

Mistry H, Sharma P, Mahato S, Saravanan R, Kumar PA, Bhandari V (2016) Prevalence and characterization of oxacillin susceptible *mecA*-positive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in India. **Plos One** 11: 1-10.

Montazeri A, Salehzadeh A, Zamani H (2020) Effect of silver nanoparticles conjugated to thiosemicarbazide on biofilm formation and expression of intercellular adhesion molecule genes, *icaAD*, in *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica** 65: 153-160.

Mu YQ, Xie TT, Zeng H, Chen W, Wan CX, Zhang LL (2019) Streptomyces derived actinomycin D inhibits biofilm formation via downregulating *ica* locus and decreasing production of PIA in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Microbiology** 128: 1201-1207.

Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S (1991) Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology** 29: 2240-2244.

Murugesan S, Mani S, Kuppusamy I, Krishnan P (2018) Role of insertion sequence element is 256 as a virulence marker and its association with biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* from hospital and community settings in Chennai, South India. **Indian Journal of Medical Microbiology** 36: 124-126.

Nakamura Y, Yamamoto N, Kino Y, Yamamoto N, Kamei S, Mori H, Kurokawa K, Nakashima N (2016) Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities. **Applied Microbiology Biotechnology** 100: 7263-7279.

Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari AR (2013) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **GMS Hygiene and Infection Control** 8: 1-4.

Nascimento GGF, Maestro V, Campos MSP (2001) Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição** 14: 119-124.

Ndahetuye JB, Persson Y, Nyman AK, Tukei M, Ongol MP, Bage R (2019) Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda. **Tropical Animal Health and Production** 51: 2037-2044.

Niemann S, Bertling A et al (2018) Panton-Valentine Leukocidin associated with *S. aureus* osteomyelitis activates platelets via neutrophil secretion products. **Scientific Reports - Nature** 8: 2185.

Nobrega DA, Naushad S, Naqvi SA, Condas LAZ, Saini V, Kastelic JP, Luby C, Buck J, Barkema HW (2018) Prevalence and genetic basis of antimicrobial resistance in Non-*aureus* *Staphylococci* isolated from canadian dairy herds. **Frontiers in Microbiology** 9: 256.

Nunes RSC, Del Aguila EM, Paschoalin VMF (2015) Safety evaluation of the coagulase-negative staphylococci microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. **BioMed Research International** 2015: 1-17.

Oliveira A, Cunha MLRS (2010) Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. **BMC Research Notes** 3: 1-8.

Oliveira DC, De Lencastre H (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 46: 2155-2161.

Otto M (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology** 17: 32-37.

Park YK, Fox LK, Hancock DD, McMahan W, Park YH (2012) Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. **Journal of Veterinary Science** 13: 103-105.

Peerayeh SN, Moghadas AJ, Behmanesh M (2016) Prevalence of virulence-related determinants in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Jundishapur Journal of Microbiology** 9: 1-6.

Persson Y, Nyman AKJ, Grönlund-Andersson U (2011) Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica** 53: 1-8.

Phophi L, Petzer IM, Qekwana DN (2019) Antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of coagulase-negative staphylococcus species isolated from subclinical mastitis cow milk samples submitted to the onderstepoort milk laboratory. **BMC Veterinary Research** 15: 1-9

Pires MA (2005) A homeopatia para os animais. Juiz de Fora-MG: Embrapa Gado de Leite. 4p. (Comunicado Técnico, 46).

Podkowik M, Park JY, Seo KS, Bystron J, Baniaa J (2013) Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Microbiology** 163: 34-40.

Pyorala S (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research** 34: 565-578.

Qiang Lou, Tao Zhu et al (2011) Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation. **BMC Microbiology** 11: 146.

Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, Qu D (2007a) Formation and properties of in vitro biofilms of *ica* negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology** 56: 83-93.

Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D (2007b) Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology** 153: 2083-2092.

Qu Q, Wang J et al (2019a) In vitro activity and In vivo efficacy of Isoliquiritigenin against *Staphylococcus xylosus* ATCC 700404 by IGPD target. **Plos One** 14: 1-20.

Qu Y, Zhao H, Nóbrega DB, Cobo ER, Han B, Zhao Z, Li S, Li M, Barkema HW, Gao J (2019b) Molecular epidemiology and distribution of antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus* species isolated from chinese dairy cows with clinical mastites. **Journal of Dairy Science** 102: 1571-1583.

Radostitis OM, Gay CC, Hinchcliff KW (2007) Constable, medicina PD Veterinária. Em A Textbook of a doença do gado, cavalos, ovelhas, porcos e cabras, 10^oed.; Saunders Elsevier: Philadelphia, p.2156.

Rasooly R, Molnar A, Do P, Morroni G, Brescini L, Cirioni O, Giacometti A, Apostolidis E (2020) Witch hazel significantly improves the efficacy of commercially available teat dips. **Pathogens** 9: 1-16.

Rasooly R, Do PM.; Hernlem BJ (2017) Rapid cell-based assay for detection and quantification of active staphylococcal enterotoxin type D. **Journal of Food Science** 82: 718-723.

Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, Chen W (2020) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. **Journal of Dairy Science** 103: 3368-3380.

Rocha LS, Silva DM, Silva MP, Vidigal PMP, Silva JCF, Guerra ST, Ribeiro MG, Mendes TAO, Ribon AOB (2019) Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. **Plos One** 14: e0220804.

Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JKM, Heilmann C, Herrmann M, Mack D (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. **Molecular Microbiology** 55: 1883-1895.

Rohde H, Burandt EC et al (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials** 28: 1711-1720.

Rossi BF, Bonsaglia ECR et al (2019) Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis. **Microbial Pathogenesis** 132: 45-50.

Ruiz-Romero RA, Cervantes-Olivares RA, Ducoing-Watty AE, Martínez-Gómez D, Díaz-Aparicio E, Méndez-Olvera ET (2018) Genetic analysis method for *Staphylococcus chromogenes* associated with goat mastitis. **Polish Journal of Microbiology** 67: 171-180.

Saei HD, Panahi M (2020) Genotyping and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminants: differences in the distribution of clonal types between cattle and small ruminants. **Archives of Microbiology** 202: 115-125.

Salehzadeh A, Zamani H, Langeroudi MK, Amir Mirzaie A. (2016) Molecular typing of nosocomial *Staphylococcus aureus* strains associated to biofilm based on the coagulase and protein A gene polymorphisms. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences** 19: 1325-1330.

Salgueiro VC, Iorio NLP, Ferreira MC, Chamon RC, dos Santos KRN (2017) Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. **BMC Microbiology** 17: 2-10.

Santos FF, Mendonça LC, Reis DRL, Guimarães AS, Lange CC, Ribeiro JB, Machado MA, Brito MAVP (2016) Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine. **Journal of Dairy Science** 99: 1374-1382.

Sandgren CH, Waller KP, Emanuelson U (2008) Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. **The Veterinary Journal** 175: 108-117.

SAS Institute Inc. (2012) System for Microsoft Windows, Release 9.4, Cary, NC, USA.

Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ (2013) *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 57: 1968-1970.

Schaeffer CR, Woods KM, Longo GM, Kiedrowski MR, Paharik AE, Büttner H, Christner M, Boissy RJ, Horswill AR, Rohde H, Fey PD (2015) Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. **Infection and Immunity** 83: 214-226

Schönborn S, Wente N, Paduch JH, Krömker V (2017) In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. **Journal of Dairy Research** 84: 198-201.

Schukken YH, Günther J et al (2011) Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 144: 270-289.

Seixas R, Santos JP, Bexiga R, Vilela CL, Oliveira M (2014) Short communication: Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal. **Journal of Dairy Science** 97: 340-344.

Sharma H, Smith D, Turner CE, Game L, Pichon B, Hope R, Hill R, Kearns A, Sriskandan S (2018) Clinical and molecular epidemiology of staphylococcal toxic shock syndrome in the United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases Journal** 24: 258-266.

Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS (2011) Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 24: 429-438.

Shumba P, Shambat SM, Siemens N (2019) The role of streptococcal and staphylococcal exotoxins and proteases in human necrotizing soft tissue infections. **Toxins (Basel)** 11: 1-29.

Sivadon V, Rottman M, Quincampoix JC, Prunier E, de Mazancourt P, Bernard L, Lortat-Jacob A, Piriou P, Judet T, Gaillard JL (2006) Polymorphism of the cell wall-anchoring domain of the autolysin-adhesin *atlE* and its relationship to sequence type, as revealed by multilocus sequence typing of invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains. **Journal of Clinical Microbiology** 44: 1839-1843.

Snel GGM, Monecke S, Ehrich R, Piccinini R (2015) Molecular characteristics of *bap*-positive *Staphylococcus aureus* strains from dairy cow mastitis. **Journal of Dairy Research** 82: 312–316.

Song M, He Y, Zhou H, Zhang Y, Li X, Yu Y (2016) Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. **Scientific Reports** 6: 29390.

Soumya KR, Philip S, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK (2017) Virulence factors associated with coagulase negative staphylococci isolated from human infections. **Biotech** 7: 1-10.

Souza GN, Brito JRF, Moreira EC, Brito MAVP, Silva MVGB (2009) Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 61: 1015-1020.

Srednik ME, Tremblay YDN, Labrie J, Archambault M, Jacques M, Cirelli AF, Gentilini ER (2017) Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. **FEMS Microbiology Letters** 364: 1-8.

StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.

Taponen S, Björkroth J, Pyörälä S (2008) Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. **Journal of Dairy Research** 75: 422-429.

Thänert R, Goldmann O, Beineke A, Medina E (2017) Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during in vivo infection. **Nature Communications** 8: 1-13.

Thiruvannamalai R, Charles J, Sundaramurthy R, Arunagiri R, Ganesan V, Soundaram GVG, Vetrinallathambi B (2018) Study on prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; comparison of four diagnostic methods for detecting MRSA – from a tertiary care hospital, Madurai. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences** 7: 864.

Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC (2007) Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Clinical Microbiology** 45: 616–619.

Torres G, Vargas K, Sánchez-Jiménez M, Reyes-Velez J, Olivera-Angel M (2019) Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections in Colombian dairy farms. **Heliyon** 5: 1-6.

Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M (2012) Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of Dairy Science** 96: 234-246.

Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, Reverdy ME, Enrigh MC, Vandenesch F, Etienne J (2007) Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. **Emerging Infectious Diseases** 13: 594-600.

Türkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan B (2010) Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses Public Health** 57: 197-203.

Üna N, Askar S, Macun HC, Sakarya F, Altun B, Yildirim M (2012) Panton-Valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profile of staphylococci isolated from milks of small ruminants. **Tropical Animal Health and Production** 44: 573-579.

Vandecasteele SJ, Peeterman WE, Merckx RR, Rijnders BJA, Van Eldere J (2003) Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. **Clinical Microbiology and Infection** 9: 114-119.

Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Coillie EV, Haesebrouck F, Vlieghe S (2015) Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **The Veterinary Journal** 203: 44-51.

Veloso JO, Lamaro-Cardoso J, Neves LS, Borges LFA, Pires CH, Lamaro L, Guerreiro TC, Ferreira EMA, André MCP (2019) Methicillin resistant and vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* colonizing patients and intensive care unit environment: virulence profile and genetic variability. **APMIS-Journal of Pathology, Microbiology and immunology** 127: 717-726.

Venugopal N, Mitra S, Tewari R, Ganaie F, Shome R, Rahman H, Shome BR (2019) Molecular detection and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from cattle, animal handlers, and their environment from Karnataka, Southern Province of India. **Veterinary World** 12: 1760-1768.

Vila-Costa M, Gioia R, Aceña J, Pérez S, Casamayor EO, Dachs J (2017) Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. **Water Research** 115: 309-317.

Wallis JK, Krömker V, Paduch JH (2019) Biofilm challenge: lactic acid bacteria isolated from bovine udders versus staphylococci. **Foods** 8: 1-8.

- Wang D, Zhang L, Zhou X, He Y, Yong C, Shen M, Szenci O, Han B (2016) Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. **Journal of Dairy Science** 99: 9560-9569.
- Wang W, Lin X, Jiang T, Peng Z, Xu J, Yi L, Li F, Fanning S, Baloch Z (2018) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology** 9: 1-16.
- Wang W, Song Y, Petrovski K, Eats P, Trott DJ, Wong HS, Page SW, Perry J, Garg S (2015) Development of intramammary delivery systems containing lasalocid for the treatment of bovine mastitis: impact of solubility improvement on safety, efficacy, and milk distribution in dairy cattle. **Journal Drug Design, Development and Therapy** 9: 31-642.
- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology** 182: 2675-2679.
- Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song ZJ (2014) Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science** 7: 1-7.
- Xu J, Tan X, Zhang X, Xia X, Sun H (2015) The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single chinese cow herd. **Microbial Pathogenesis** 88: 29-38.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH (2011) Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal Mammary Gland Biol Neoplasia** 16: 357-372.
- Zhang L, Li Y, Bao H, Wei R, Zhou Y, Zhang H, Wang R (2016) Population structure and antimicrobial profile of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis in China. **Microbial Pathogenesis** 97: 103-109.