SANDRA RENATA SAMPAIO SALABERRY

**Fatores de virulência de *Staphylococcus* ssp. e viabilidade
celular na mastite subclínica de cabras**

São Paulo
2014

SANDRA RENATA SAMPAIO SALABERRY

Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2984
FMVZ

Salaberry, Sandra Renata Sampaio
Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras /
Sandra Renata Sampaio Salaberry. -- 2014.
81 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Adesina. 2. Biofilme. 3. Contagem de células somáticas. 4. California Mastitis Test. 5. Leite.
I. Título.

ERRATA

SALABERRY, S. R. S. Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras. 2014. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Capa	1º	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Fatores de virulência de *Staphylococcus spp.* associados à viabilidade celular na mastite subclínica de cabras leiteiras”, protocolado sob o nº 2973/2013, utilizando 80 (oitenta) caprinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research “Virulence factors of *Staphylococcus spp.* associated with cell viability in subclinical mastitis of dairy goats”, protocol number 2973/2013, utilizing 80 (eighty) caprine, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Salaberry, Sandra Renata Sampaio

Título: Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e viabilidade celular na mastite
subclínica de cabras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio e carinho em todas as fases da minha vida.

Aos meus amigos e namorado, pelo companheirismo e paciência.

Ao meu orientador, prof. Dr. Nilson Benites, pela orientação e ensinamentos e a Dra. Priscilla Melville, por todos ensinamentos laboratoriais.

À profa. Dra. Sônia Pinheiro, pelos ensinamentos e amizade durante todos esses anos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), pelo apoio e ajuda em todos os momentos que precisei.

À profa. Dra. Anna Lima-Ribeiro, por ceder o laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas da FAMEV (UFU) durante as colheitas de amostras realizadas na região do Triângulo Mineiro (MG).

Aos meus colegas de pós-graduação, pela amizade, ajuda e ensinamentos.

Aos produtores rurais, por permitirem a colheita de amostras em suas propriedades, sem isso seria difícil a realização do experimento.

Ao CNPQ, pela bolsa de pesquisa e à FAPESP, pelo projeto auxílio.

Aos animais, razão de sermos e nos tornamos Médicos Veterinários cada vez mais capacitados.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

SALABERRY, S. R. S. **Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras.** [Virulence factors of *Staphylococcus* spp. and cell viability in subclinical mastitis of goats]. 2014. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A mastite subclínica em caprinos é causada principalmente pelo *Staphylococcus* spp., sendo os estafilococos coagulase negativa (SCN) os patógenos de maior ocorrência e o *S. aureus*, a espécie de estafilococos mais pesquisada. Dessa forma, pouco se conhece sobre a patogenicidade de SCN e outros estafilococos coagulase positiva (SCP), além do *S. aureus*. Também há poucos estudos sobre a variação da viabilidade celular na mastite subclínica de cabras. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar os fatores de virulência de adesão e produção de biofilme de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de cabras, verificando possíveis associações com a viabilidade celular. Para realizar a colheita das amostras, primeiramente, foi efetuada um exame físico da glândula mamária, com posterior realização dos testes da caneca de fundo preto e *California mastitis test* (CMT). A colheita do leite foi efetuada em três alíquotas: análises microbiológicas, contagem de células somáticas (CCS) e viabilidade celular. Realizou-se a identificação, teste de antibiograma e PCR (Reação em cadeia polimerase) dos *Staphylococcus* spp. isolados nas amostras de leite. Os genes de virulência pesquisados no PCR foram: *cna*, *eno*, *ebpS*, *fnbA*, *fnbB*, *fib* e *bap*. Avaliou-se a quantidade de CCS, em equipamento de citometria de fluxo, e a viabilidade celular, após centrifugações das amostras de leite e visualização das células em microscópio, utilizando o corante azul de *Trypan*. Os resultados foram: 122 amostras com crescimento bacteriano e dessas, 110 (90,2%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp., sendo 90 (73,8%) de SCN e 12 (16,4%) de SCP. As espécies mais isoladas de estafilococos foram: *S. epidermidis* (24,55%), *S. lugdunensis* (15,40%) e *S. intermedius* (13,64%). As amostras apresentaram maior resistência aos antimicrobianos: penicilina (81,8%), oxacilina (60,0%) e ampicilina (55,5%). Observou-se maior sensibilidade para: enrofloxacina (99,1%), eritromicina (98,2%), gentamicina (98,2%) e vancomicina (98,2%). Com relação aos fatores de virulência pesquisados, foram encontradas amostras positivas para todos os genes, com exceção do gene *fnbB*: *eno* (53,6%), *bap* (43,7%), *ebpS* (19,1%), *fnbA* (18,2%) e *fib* (16,4%). Mais de um gene foi detectado em algumas estirpes, sendo que as associações de maior ocorrência foram: *bap/eno* em SCN e *ebpS/eno/fib/fnbA* em SCP. Os valores da CCS das

amostras de leite com isolamento de *Staphylococcus* spp., SCN e SCP foram maiores do que nas amostras sem isolamento bacteriano e as estirpes com presença da associação de genes *ebpS/eno/fib/fnbA* apresentaram maior CCS do que *bap/eno*. Com relação à viabilidade celular, as amostras com isolamento de *Staphylococcus* spp. apresentaram maior viabilidade celular do que as amostras sem isolamento bacteriano e não houve associação dos genes identificados nas estirpes com a viabilidade celular. Concluiu-se que os genes *eno* e *bap* apresentaram maior ocorrência nas estirpes de *Staphylococcus* spp., sendo os mais encontrados nos isolados de SCN e os genes *ebpS*, *fib* e *fnbA* foram os mais detectados nos SCP. A viabilidade celular foi maior nas amostras com isolamento de *Staphylococcus* spp. em relação as sem isolamento bacteriano e não houve associação entre os fatores de virulência das estirpes de *Staphylococcus* spp. e a viabilidade celular.

Palavras-chave: Adesina. Biofilme. Contagem de Células Somáticas. *California Mastitis Test*. Leite.

ABSTRACT

SALABERRY, S. R. S. **Virulence factors of *Staphylococcus* spp. and cell viability in subclinical mastitis of goats.** [Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras]. 2014. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Subclinical mastitis in goats is mainly caused by *Staphylococcus* spp., coagulase-negative staphylococci (CNS) is the most frequent pathogens and *S. aureus*, the most researched specie of staphylococci. Thus, little is known about the pathogenicity of SCN and other coagulase-positive staphylococci (CPS), beyond the *S. aureus*. There are few studies on the variation of cell viability in subclinical mastitis of goats. The aim of the present study was to determine the virulence factors of adhesion and biofilm production of *Staphylococcus* spp. strains isolated from milk samples of goats, verifying for possible associations with cell viability. To collect samples, firstly, was performed a physical examination of the mammary gland, with subsequent tests for mug of black background and California mastitis test (CMT). Three aliquots of milk were collected: microbiological analysis, somatic cell count (SCC) and cell viability. Identification, antibiotic susceptibility testing and PCR (polymerase chain reaction) were performed of *Staphylococcus* spp. isolated from milk samples. Virulence genes researched in PCR were: *cna*, *eno*, *ebpS*, *fnbA*, *fnbB*, *fib* and *bap*. Evaluation of CCS, using flow cytometry equipment, and cell viability, after centrifugation of milk samples and visualization the cells in the microscope using Trypan blue dye, were performed. The results were: from 122 samples with bacterial growth, 110 (90.2%) were identified as *Staphylococcus* spp., 90 (73.8%) of CNS and 12 (16.4%) of the CPS. The most isolated staphylococci species were: *S. epidermidis* (24.55%), *S. lugdunensis* (15.40%) and *S. intermedius* (13.64%). Samples showed higher resistance to antimicrobials: penicillin (81.8%), oxacillin (60.0%) and ampicillin (55.5%). We observed higher sensitivity to: enrofloxacin (99.1%), erythromycin (98.2%), gentamicin (98.2%) and vancomycin (98.2%). Regarding virulence factors researched, positive samples were found for all genes, except *fnbB* gene: *eno* (53.6%), *bap* (43.7%), *ebpS* (19.1%), *fnbA* (18.2%) and *fib* (16.4%). More than one gene were detected in some strains, with the most frequent associations were *bap/eno* in CNS and *ebpS/eno/fib/fnbA* in CPS. The values of SCC of milk samples with isolation of *Staphylococcus* spp., CNS and CPS were higher than samples without bacterial isolation and the isolation of strains with combination of *ebpS/eno/fib/fnbA* genes showed higher SCC than *bap/eno*. Regarding cell

viability, samples with isolation of *Staphylococcus* spp. showed higher cell viability than samples without bacterial isolation and there was no association of the genes identified in strains with cell viability. In conclusion, *eno* and *bap* genes were more frequent in *Staphylococcus* spp. strains, *eno* and *bap* genes were mostly found in isolated CNS and *ebpS*, *fib* and *fnbA* genes were more detected in CNP. Cell viability was higher in samples with isolation of *Staphylococcus* spp. compared those without bacterial isolation and there was no association between the virulence factors of *Staphylococcus* spp. strains and cell viability.

Key-words: Adhesin. Biofilm. Somatic Cell Count. California Mastitis Test. Milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de adesinas e biofilme - São Paulo - 2014.....	32
Figura 1 - Fluxograma sequencial das etapas desenvolvidas na análise das amostras de leite de cabras com mastite subclínica – São Paulo - 2014	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de animais e amostras colhidas por propriedade, e avaliações realizadas – São Paulo - 2014	37
Tabela 2 - Números total e percentual das estirpes isoladas das amostras de mastite subclínica segundo a propriedade e identificação bacteriológica – São Paulo - 2014	38
Tabela 3 - Número total e percentual de espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas segundo a identificação e propriedades – São Paulo - 2014	39
Tabela 4 – Classificação em número absoluto e percentual das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas segundo o perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados – São Paulo - 2014	40
Tabela 5 - Número de estirpes de acordo com as espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de cabras com mastite subclínica, em relação à resistência aos antimicrobianos testados – São Paulo - 2014.....	41
Tabela 6 - Número e percentual de <i>S. epidermidis</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. lugdunensis</i> segundo a resistência aos antimicrobianos e a análise estatística – São Paulo - 2014	42
Tabela 7 - Número total e percentual de resultados positivos das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas segundo os genes codificadores de adesinas e biofilme – São Paulo - 2014.....	43
Tabela 8 - Número de amostras positivas para os genes codificadores de adesinas e biofilme em relação às espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite de cabras com mastite subclínica – São Paulo - 2014.....	44
Tabela 9 - Frequência de ocorrência dos genes codificadores de adesinas e biofilme isoladamente ou associados em estafilococos coagulase negativa e positiva de amostras de leite de cabras com mastite subclínica – São Paulo - 2014.....	45
Tabela 10 - Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas obtidas nas amostras com e sem isolamento bacteriano e análise estatística – São Paulo - 2014.....	46

Tabela 11 - Valores da contagem de células somáticas e análise estatística das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva – São Paulo - 2014	46
Tabela 12 - Valores da contagem de células somáticas das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de espécies de estafilococos e análise – São Paulo - 2014.....	47
Tabela 13 - Valores da contagem de células somáticas das amostras de leite de cabras positivas para os genes isoladamente ou associados e análise estatística – São Paulo - 2014	48
Tabela 14 - Mediana, valores máximo e mínimo da viabilidade celular obtidas nas amostras de leite com e sem isolamento bacteriano e análise estatística – São Paulo - 2014	48
Tabela 15 - Mediana, valores máximo e mínimo de células viáveis obtidas nas amostras de leite de cabras com e sem isolamento bacteriano e análise estatística – São Paulo - 2014	49
Tabela 16 - Valores da viabilidade celular e análise estatística das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva – São Paulo - 2014	49
Tabela 17 - Valores de células viáveis e análise estatística das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva – São Paulo - 2014	50
Tabela 18 - Valores da viabilidade celular das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de espécies de estafilococos e análise estatística – São Paulo - 2014	50
Tabela 19 - Valores das células viáveis das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de espécies de estafilococos e análise estatística – São Paulo - 2014	51
Tabela 20 - Valores da viabilidade celular das amostras de leite de cabras positivas para os genes isoladamente ou associados e análise estatística – São Paulo - 2014	52
Tabela 21 - Valores das células viáveis das amostras de leite de cabras positivas para os genes isoladamente ou associados e análise estatística – São Paulo - 2014	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	MASTITE	16
1.1.1	Etiologia da mastite.....	17
1.1.2	Teste de sensibilidade (antibiograma).....	18
1.2	FATORES DE VIRULÊNCIA DO <i>Staphylococcus</i> spp.....	19
1.2.1	Proteína ligadora de colágeno	20
1.2.2	Proteína ligadora de laminina	20
1.2.3	Proteína ligadora de elastina.....	21
1.2.4	Proteínas ligadoras de fibronectina	21
1.2.5	Proteína ligadora de fibrinogênio	21
1.2.6	Formador de biofilme	22
1.3	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	22
1.4	VIABILIDADE CELULAR	24
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	28
3.2	TESTES UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA MASTITE	29
3.3	COLHEITA DAS AMOSTRAS	29
3.4	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	29
3.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	30
3.5.1	Identificação do microrganismo	30
3.5.2	Perfil de sensibilidade.....	30
3.6	ANÁLISES MOLECULARES	31
3.6.1	Reação em cadeia da polimerase	31
3.6.2	Visualização dos produtos amplificados	33
3.7	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	33
3.8	VIABILIDADE CELULAR	33
3.9	FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES	34
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	38

4.1.1	Identificação do microrganismo	38
4.1.2	Perfil de sensibilidade	39
4.2	ANÁLISES MOLECULARES	43
4.3	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS	45
4.4	VIABILIDADE CELULAR	48
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE	77

1 INTRODUÇÃO

O leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados (BRASIL, 2000). É um alimento que apresenta alto valor nutricional e contêm elevados teores de cálcio, fósforo e potássio. Possui glóbulos de gordura menores que os do leite de vaca, o que resulta em um leite mais suave e de fácil digestibilidade (PAULA et al., 2009; SILANIKOVE et al., 2010).

A composição proteica é similar ao leite bovino, com diferença na proteína caseína-alfa s1, que no leite caprino é praticamente ausente, o que beneficia pessoas que têm alergia ao leite bovino devido a essa proteína. Além disso, contém um arranjo complexo de nucleotídeos, com níveis semelhantes ao leite humano, podendo ser fornecido na alimentação de crianças, sem a necessidade de suplementação adicional de nucleotídeos. Embora o percentual da lactose seja menor no leite caprino do que no bovino, esse não pode ser utilizado na dieta de pessoas que possuem intolerância a lactose (SILANIKOVE et al., 2010; JACOPINI et al., 2011).

No Brasil, há a Instrução Normativa 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) que regulamenta as condições de produção, a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano. São estabelecidos como padrões mínimos das características físico-químicas: 2,8% de proteína bruta, 4,3% de lactose, 8,2% sólidos não gordurosos e 0,7% de cinzas.

A caprinocultura leiteira já pode ser considerada um setor do agronegócio brasileiro, pois existe no país há cerca de 30 anos e apenas no ano de 2007 a indústria brasileira processou e comercializou, oficialmente, mais de 12 milhões de litros de leite de cabra. Além disso, a região Sudeste, apesar de não possuir nenhuma tradição na criação de caprinos, tem produzido e comercializado, anualmente, cerca de dois milhões de litros (FONSECA; BRUSCHI, 2009).

Segundo dados obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011), o rebanho efetivo de caprinos apurado foi de 9,3 milhões de cabeças, registrando uma relativa estabilidade em relação ao quantitativo de 2010. A Região Nordeste do país é mantenedora do maior efetivo de caprinos, acima de 90% do total nacional, tanto para produção de leite como de carne. A produção nacional de leite caprino no ano de 2011 representou um total de 148,1

mil toneladas, ocupando a 20^a posição no *ranking* da produção mundial, de acordo com Food and Agriculture Organization (2011).

O leite caprino vem conquistando crescente mercado no país, tanto na forma de leite pasteurizado congelado ou não, leite em pó e, mais recentemente, em embalagens *tetrapak* tipo longa vida UHT, esterilizado e aromatizado. Outros produtos industrializados como queijos (Frescal, Boursin, Moleson, Chevrotin), iogurtes, sorvetes e cosméticos (sabonetes, xampus e cremes hidratantes) também vêm sendo produzidos (CORDEIRO, 2006). Tal fato é fundamental para que sejam oferecidos produtos diferenciados no comércio, desmistificando o leite de cabra como alimento pouco palatável (COSTA; QUEIROGA; PEREIRA, 2009).

Mas para manter a qualidade do leite caprino e a obtenção de leite e derivados com características físico-químicas ideais para a produção de gêneros alimentícios, é necessário o controle da mastite nos animais (LEITNER; MERIN; SILANIKOVE, 2004; SILANIKOVE et al., 2010).

1.1 MASTITE

A mastite é considerada um grave problema em pequenos ruminantes, principalmente para caprinos leiteiros, pois além de causar prejuízos econômicos, também pode causar riscos à saúde pública (SILVA et al., 2001; MORONI et al., 2005a).

O desencadeamento da mastite está vinculado à complexa tríade: animal (hospedeiro), agente etiológico e meio ambiente. Os fatores determinantes que influenciam na susceptibilidade dessa doença incluem: resistência natural da glândula mamária, estágio da lactação, hereditariedade, idade do animal, infectividade e patogenicidade do agente etiológico, ordenha, manejo, clima e nutrição (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

Mastite é uma inflamação da glândula mamária e frequentemente é causada por um agente infeccioso. É classificada como clínica e subclínica, de acordo com a sua causa e severidade. A clínica é acompanhada por sinais físicos de doença no animal, como febre, edema e consistência firme da glândula mamária, enquanto a subclínica não apresenta estas alterações evidentes, sendo necessário realizar o diagnóstico por meio de testes indiretos que demonstram o aumento da quantidade de células somáticas. A forma subclínica geralmente está associada à diminuição da produção de leite (MARTH; STEELE, 2001; RADOSTITS et al., 2006; SMITH; SHERMAN, 2009).

O diagnóstico da mastite pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos se fundamentam na identificação do agente etiológico mediante a demonstração da presença de microrganismos no leite dos indivíduos. Os exames indiretos se baseiam em critérios de evolução de intensidade da reação inflamatória, como ocorre no teste da caneca de fundo preto, teste do *California mastitis test* (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) (MOTA, 2008). O teste da caneca de fundo preto consiste na retirada dos três ou quatro primeiros jatos de leite em superfície escura, com o objetivo de avaliar a secreção láctea quanto a sua consistência, coloração e presença de grumos ou coágulos. Esse teste detecta a mastite clínica enquanto o teste do CMT e CCS detectam a mastite subclínica (SANTOS; FONSECA, 2007).

1.1.1 Etiologia da mastite

O patógeno bacteriano usualmente relacionado com infecções intramamárias em pequenos ruminantes pertence ao gênero *Staphylococcus* spp. Outros patógenos como *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica* e algumas espécies de fungos podem causar mastites, porém são menos frequentes (BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007).

Staphylococcus spp. são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbicos facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e sem produção de gás. Não fotossintéticos, não esporulados, catalase positivos e capazes de crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento de 7 a 48°C (ideal de 37°C) e pH na faixa de 4 a 10, com ponto ótimo de crescimento entre 6 e 7 (QUINN et al., 2005).

Staphylococcus aureus (*Staphylococcus* coagulase positiva) é um dos principais causadores de mastite clínica, embora algumas cepas possam causar a subclínica. Já os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) são considerados menos patogênicos que *Staphylococcus aureus* e podem causar mastite subclínica persistente, como também a forma clínica (CONTRERAS et al., 2003).

Embora o *S. aureus* seja considerado o mais frequente nos isolados de mastite em caprinos, existem relatos atribuídos a outros *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), como o *S. intermedius*, que já foi isolado em mastite caprina (PEIXOTO et al., 2010; QUINN et al.,

2005). O *S. aureus* é responsável por aumentar consideravelmente a contagem de células somáticas (CCS) do leite; pode causar mastite gangrenosa, que geralmente causa a morte do animal, se um tratamento rápido e eficaz não for implementado ou compromete definitivamente a glândula mamária afetada (CONTRERAS et al., 2003).

No que se refere à mastite subclínica, a importância dos SCN tem aumentado (EL-JAKEE et al., 2013), além de serem os patógenos de maior prevalência, também podem aumentar significativamente a CCS e diminuir a produção de leite (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010). Ressalta-se ainda que os mecanismos de patogenicidade dos SCN em infecções subclínicas ainda são desconhecidos. As espécies mais comumente isoladas compreendem: *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. simulans*, *S. chromogenes* e *S. xylosus*; e as isoladas com menor frequência são: *S. lentus*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. arlettae*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. hyicus*, *S. auricularis* e *S. cohnii* (CONTRERAS et al., 2007). A identificação das espécies dos SCN é essencial para determinar sua patogenicidade e desenvolver práticas de manejo para a prevenção de mastite (CHU et al., 2012).

1.1.2 Teste de sensibilidade (antibiograma)

O antibiograma é um meio de quantificar a interação entre os microrganismos e os medicamentos antimicrobianos no laboratório. Embora alguns antimicrobianos que apresentam sensibilidade no resultado *in vitro*, tenham desempenho fraco nas condições em que são utilizados, quando o teste é realizado sob condições padronizadas, há grande chance de eficácia do antimicrobiano para o qual o patógeno testado mostrou sensibilidade *in vitro*, como também o emprego de antimicrobiano para o qual se constatou resistência é acompanhado de baixa resposta clínica (GIGUÈRE et al., 2010).

A realização de teste de sensibilidade para as estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de cabras com mastite subclínica é relevante para decidir qual antimicrobiano deve ser administrado, bem como para monitorar a quantidade de estirpes que apresentam multirresistência e sua disseminação pelo rebanho (VIRDIS et al., 2010).

A crescente resistência de microrganismos isolados de infecções intramamárias aos antimicrobianos é preocupante. Os SCN tendem a ser mais resistentes do que o *S. aureus* e podem apresentar resistência a diversos antimicrobianos utilizados na medicina veterinária

(LUCHEIS, 2011). Existem relatos de estirpes SCN resistentes isoladas de bovinos submetidos a tratamentos inadequados com antimicrobianos (MACHADO; CORREA; MARIN, 2008). Entretanto, para caprinos, estudos traçando o perfil de sensibilidade dos SCN isolados de mastite (MORONI et al., 2005a; NEVES et al., 2010) não fazem relação da resistência entre essas estirpes e SCP.

Diferentes antimicrobianos têm sido recomendados na terapia intramamária de mastite em pequenos ruminantes, entretanto, formulações específicas para essas espécies não estão disponíveis comercialmente (COUTINHO et al., 2006), restando como alternativa para o profissional a utilização de anti-mastíticos idealizados para a espécie bovina.

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DO *Staphylococcus* spp.

O estabelecimento da infecção e da sobrevivência da bactéria no hospedeiro depende da habilidade de invadir o tecido do hospedeiro e evadir do sistema imune do hospedeiro, respectivamente (EIFF; PETTERS; HEILMANN, 2002).

As bactérias patogênicas interagem com as células do hospedeiro, expressando em sua superfície adesinas para promover a interação com os receptores do hospedeiro ou macromoléculas solúveis (KLINE et al., 2009). A adesão a células epiteliais é geralmente a primeira e crucial fase no processo da infecção, prevenindo a bactéria de ser eliminada da glândula durante a ordenha (LAMMERS; NUIJTEN; SMITH, 1999).

Entre os fatores de virulência *Staphylococcus aureus*, destacam-se a cápsula, o ácido teicóico e a proteína A que interferem na opsonização e consequente fagocitose. A produção de coagulase pelos estafilococos é um importante indicador da patogenicidade (QUINN et al., 2005). Já a patogenicidade dos *Staphylococcus* coagulase negativa está associada ao fenômeno de aderência, pois estes microrganismos têm grande poder de adesão, produção de enzimas extracelulares e toxinas capazes de provocar níveis elevados de lesão tecidual (MOTA, 2008).

Os *Staphylococcus* spp. têm inúmeras proteínas de superfícies (adesinas) conhecidas como *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). Os MSCRAMMs possuem moléculas como colágeno, fibronectina e fibrinogênio e se aderem aos mesmos componentes do tecido do hospedeiro (SEO et al., 2008; PROIETTI et al., 2010).

Conforme Tristan et al. (2003), entre as MSCRAMMs dos *Staphylococcus* spp. estão: proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*), proteína ligadora de elastina (*ebpS*), proteína A ligadora de fibronectina (*fnba*), proteína B ligadora de fibronectina (*fnbb*) e proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*). O biofilme (*bap*) também é um importante fator de virulência que exerce um papel fundamental na proteção da bactéria contra as células de defesa do hospedeiro (SIMOJOKI et al., 2012).

1.2.1 Proteína ligadora de colágeno

A proteína de ligação de colágeno (*cna*) é produzida por algumas cepas de *S. aureus*, sendo codificada pelo gene *cna*. A presença dessa proteína permite a aderência da bactéria a tecidos constituídos de colágeno. Em um modelo de ceratite em coelhos e de artrite séptica em camundongos, a produção do gene *cna* mostrou-se importante na patogênese da infecção do *S. aureus* (HÖÖK; FOSTER, 2000; RHEM et al., 2000), embora foi ausente em cepas de *S. aureus* de alta virulência isoladas de coelhos (VANCRAEYNEST et al., 2004).

Este gene não foi encontrado em mastite bovina causada por SCN e sua importância na ocorrência da mastite ainda não está bem estabelecida (SIMOJOKI et al., 2012).

1.2.2 Proteínas ligadora de laminina

O gene *eno* foi identificado como uma proteína de superfície celular com alta afinidade pela laminina. Dessa forma, a expressão da proteína de superfície provavelmente contribui para a colonização de *S. aureus* através da ligação à laminina presente na matriz extracelular, ativação do plasminogênio e degradação da laminina em áreas restritas, favorecendo a invasão e a disseminação do microrganismo (CARNEIRO et al., 2004). O gene *eno* foi um dos mais detectados em mastites por *S. aureus* e por SCN (KUMAR et al., 2011b; SIMOJOKI et al., 2012).

1.2.3 Proteína ligadora de elastina

A proteína ligadora de elastina (*ebpS*) é uma molécula que media a ligação de *S. aureus* à elastina presente na matriz extracelular das células do hospedeiro. A elastina é um componente da matriz extracelular da maioria dos tecidos de mamíferos e pode auxiliar na colonização bacteriana (PARK et al., 1996). Esse gene já foi detectado em infecções intramamárias bovina e bubalina por *S. aureus* e SCN (KUMAR et al., 2011a,b; SIMOJOKI et al., 2012).

1.2.4 Proteínas ligadoras de fibronectina

As proteínas ligadoras de fibronectina, codificadas pelos genes *fnbA* e *fnbB*, mediam a aderência bacteriana a células do hospedeiro através da ligação com a fibronectina presente na matriz extracelular. A fibronectina está presente tanto na matriz extracelular da maioria dos tecidos quanto em vários fluidos corporais na forma solúvel, permitindo a aderência do microrganismo (HÖÖK; FOSTER, 2000).

Estudos relataram a importância dos genes *fnbA* e *fnbB* no processo de adesão e colonização do *S. aureus* durante a infecção intramamária bovina. Em cultura de células de glândulas mamárias de bovinos, várias cepas se aderiram às células, as quais produziam eficientemente a fibronectina (LAMMERS et al., 2001).

Brouillete, Talbot e Malouin (2003) observaram *in vivo* um aumento da capacidade de *S. aureus* de colonizar a glândula mamária quando comparada com a de uma cepa mutante deficiente de proteínas ligadora de fibronectina. A aderência conferida por essas proteínas evitou a eliminação do microrganismo durante a lactação.

1.2.5 Proteína ligadora de fibrinogênio

É uma proteína com capacidade de ligação ao fibrinogênio, codificada pelo gene *fib* e é secretada no meio extracelular e não exposta na superfície celular como muitas outras

adesinas. Embora alguns autores relataram que a ocorrência desse gene é somente em *S. aureus*, pesquisas sobre mastite em bovinos já detectaram o gene *fib* em SCN (WÄSTFELT; FLOCK, 1995; SIMOJOKI et al., 2012).

1.2.6 Formador de biofilme

A habilidade do *Staphylococcus* spp. para formar biofilme *in vivo* é considerada o principal fator de virulência, influenciando na sua patogênese sobre a mastite. A formação do biofilme é considerada a segunda fase do processo, sendo que a bactéria, primeiramente, se adere à superfície celular e, posteriormente, se multiplica para a formação de multicamadas do biofilme (VASUDEVAN et al., 2003). A formação do biofilme protege contra a resposta imune do hospedeiro e o tratamento antimicrobiano (SIMOJOKI et al., 2012).

A formação de biofilme ocorre por meio de sucessivas etapas. Inicialmente, a bactéria se fixa a uma superfície sólida, se multiplica e promove o acúmulo de grupos de células em multicamadas, resultando na formação final de uma comunidade bacteriana. A composição da matriz extracelular é complexa podendo variar entre diferentes espécies bacterianas e condições ambientais (LASA; PENADÉS, 2006).

O gene *bap* foi isolado de mastite bovina por *S. aureus* e identificado como uma proteína que é essencial para a formação do biofilme. A presença do gene *bap* não é restrita ao *S. aureus*, isolados de SCN também podem apresentar este gene, como: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hyicus* (LASA; PENADÉS, 2006).

1.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A glândula mamária dos caprinos possui secreção láctea do tipo apócrina, que ocorre o desprendimento da porção distal das células epiteliais alveolares no lúmen sob a forma de partículas citoplasmáticas de tamanhos variáveis e com morfologia semelhante aos leucócitos. Isso pode induzir a erros de interpretação durante a realização de técnicas de avaliação da celularidade do leite de animais desta espécie (PAAPE et al., 2001; PARK; GUO, 2006; MADUREIRA et al., 2010). Além disso, a quantidade de neutrófilos corresponde de 50 a

70% do total da CCS no leite caprino sem infecção intramamária, sendo considerado bem mais elevado do que o número encontrado em bovinos, que varia de 5 a 20% (PAAPE; CAPULCO, 1997). Como os neutrófilos atuam na primeira linha de defesa do sistema imunológico contra infecções, a elevada quantidade de neutrófilos em cabras poderia explicar o motivo de essa espécie ser mais resistente à mastite (TIAN et al., 2005).

Em caprinos, existem outros fatores, além da mastite, que podem aumentar a CCS do leite, como fase de lactação, número de partos e raça. Nas fases finais da lactação e nas fêmeas com maior número de parições, a CCS apresenta-se mais elevada (PAAPE et al., 2007; SOUZA et al., 2009; KOOP et al., 2011).

A infecção intramamária é o fator que mais afeta a contagem de células somáticas (CCS) do leite. Quando os microrganismos invadem a glândula mamária e começam a se multiplicar, ou quando o número de microrganismos aumenta significativamente em uma glândula já infectada, o organismo direciona os leucócitos do sangue para a região afetada, com intuito de combater a agressão tecidual e isso, conseqüentemente, aumenta a quantidade de células somáticas no leite (PALES et al., 2005). A proteção somente é efetiva se ocorrer um rápido influxo das células de defesa da circulação sanguínea para a glândula, com subsequente fagocitose e destruição do microrganismo invasor (PAAPE et al., 2002).

Entre os métodos indiretos para diagnosticar a mastite subclínica, estão o *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS), que detectam a quantidade de células somáticas no leite (RADOSTITS et al., 2006).

O teste do CMT é baseado no princípio da adição de um detergente, que lisa as células do leite e, se houver alta contagem de células somáticas, forma uma viscosidade devido à presença de elevada quantidade de ácido nucleico e outros constituintes. A interpretação é realizada a partir da observação do escore da geleificação formado, quantificando indiretamente a CCS (VIGUIER et al., 2009). É a prova de eleição para diagnóstico das mastites subclínicas por ser de fácil execução, econômico e sugerir uma ideia muito aproximada da situação do rebanho (MOTA, 2008).

Devido à fisiologia da glândula mamária da espécie caprina e para evitar resultados falsos positivos, o teste do CMT deve ser utilizado como teste de triagem. Dessa forma, outros testes de diagnóstico, como o exame microbiológico, devem estar associados com o CMT para avaliar a saúde da glândula mamária (SILVA et al., 2001; BEZERRA et al., 2006).

As reações negativas e de 3 + do teste do CMT são facilmente interpretadas, mas as reações intermediárias apresentam algumas discrepâncias, que podem divergir a interpretação dos resultados. São considerados como negativo os três primeiros níveis: negativo (-);

duvidoso (+/-) e fracamente positivos (MOTA, 2008). De acordo com Tonin e Nader Filho (2005), o CMT seria mais eficiente para detectar glândulas mamárias negativas do que positivas para mastite subclínica caprina.

A CCS é realizada em equipamentos de citometria de fluxo e baseia-se no princípio da contagem de DNA do núcleo de células coradas, refletindo fluorescência em exposição a um raio laser (VIGUIER et al., 2009). De acordo com Gonzalo et al. (2006), a padronização da CCS para pequenos ruminantes é essencial nos laboratórios e equipamentos de CCS para garantir a acurácia e reprodutibilidade dos resultados. Quando o equipamento é calibrado para bovinos, como acontece na maioria dos laboratórios, há um aumento de 24-34% no número de células somáticas dos caprinos (SOUZA et al., 2012).

O equipamento Fossomatic utiliza a técnica de fluorescência que cora especificamente as bandas de DNA da célula. Os leucócitos e as células epiteliais são contados por este aparelho, mas os corpúsculos citoplasmáticos não são contados. Quando o Fossomatic é calibrado para bovinos, aumenta em 27% a CCS do leite caprino (HANLEIN, 2002; SMITH; SHERMAN, 2009).

1.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular é o percentual de células disponíveis para manifestação de suas atividades e quanto maior o número de células somáticas na amostra de leite, maior a concentração de células viáveis (DELLA LIBERA et al., 2005). Assim, durante a fase inicial da mastite, as células polimorfonucleares migram do sangue para as glândulas infectadas, aumentando consideravelmente a viabilidade celular (PAAPE; CAPULCO, 1997).

Uma pesquisa realizada com oitos cabras híbridas objetivando comparar os neutrófilos do sangue e leite durante o pico da lactação demonstrou que os neutrófilos do leite apresentaram menor viabilidade celular do que os neutrófilos do sangue, com percentual de viabilidade no sangue e leite de 91,8% e 70,3%, respectivamente (TIAN et al., 2005), o que foi semelhante aos valores já encontrados em bovinos (VAN OOSTVELDT et al., 2001).

Um estudo realizado com vacas de leite verificou que as células que estão no leite são menos viáveis e possuem menor capacidade de responder a estímulos imunológicos do que as células que são recrutadas e que migram do sangue para o leite. Assim, as células que já estavam presentes no leite são menos relevantes em respostas imunológicas efetivas e a

melhor proteção da glândula mamária contra a infecção é o rápido recrutamento de novas células de defesa vindas do sangue, o que irá causar um aumento na CCS (BAUMERT; BRUCKMAIER; WELLNITZ, 2009).

Blagitz et al. (2011), ao pesquisar 28 cabras híbridas sem infecção intramamária, observaram que amostras de leite com CCS menor de 5×10^5 células/mL apresentaram viabilidade menor do que amostras de leite com CCS maior de $1,5 \times 10^6$ células/mL, sugerindo que um aumento na migração dos leucócitos do sangue para a glândula mamária seja responsável pelo aumento da viabilidade celular.

Um experimento realizado por Mehrzad, Duchateau e Burvenich (2004), ao pesquisar a viabilidade celular e a severidade da mastite por coliformes em 105 vacas, verificaram que após a infecção intramamária por *E. coli*, os neutrófilos polimorfonucleares aumentaram rapidamente em comparação com as glândulas não infectadas e observaram que a maioria dos neutrófilos recrutados no leite eram relativamente jovens. Os neutrófilos jovens sobrevivem por tempo maior e a apoptose ocorre mais lentamente do que nos neutrófilos velhos, que não são muito eficientes devido à depleção do glicogênio intracelular e apoptose (BURVENICH et al., 2003). Além disso, houve um aumento significativo na viabilidade após a infecção das glândulas e concluiu que se a viabilidade celular estiver baixa na glândula mamária infectada, há uma grande chance de se desenvolver uma mastite severa por coliformes. Assim, as variações na viabilidade das células polimorfonucleares do leite explicam diferenças na resolução de alguns casos com mastite e na resistência de outros (PIEPERS et al., 2009).

Piccinini et al. (1999), ao corar células pelo método de exclusão do azul de *Trypan*, encontraram uma associação entre bovinos com mastite por *Staphylococcus aureus* e viabilidade celular, sugerindo que a viabilidade celular fosse considerada como um fator de defesa da glândula mamária. Comparando a viabilidade celular em grupo de vacas com e sem mastite, Merle, Schroder e Hamann (2007) observaram uma viabilidade celular maior no grupo em que os animais apresentavam mastite.

O método de exclusão do azul de *Trypan* se baseia no fato de que esse corante, não sendo lipofílico, normalmente não penetra nas células, somente quando há ruptura da membrana plasmática, indicando a morte celular (MORI; MORI; FERNANDES, 2001; BASTOS et al., 2007).

Boulaaba, Grabowski e Klein (2011) avaliaram a quantidade de neutrófilos viáveis e não viáveis e concluíram que a elaboração da contagem diferencial de células do leite de cabra, com capacidade adicional de diferenciar neutrófilos viáveis e não viáveis pode permitir novas possibilidades para avaliar a saúde da glândula mamárias das cabras.

Até o momento, não há registros na literatura pesquisada sobre os fatores de virulência de adesinas e biofilme de *Staphylococcus* coagulase negativa e outros *Staphylococcus* coagulase positiva, além do *S. aureus*, em amostras de leite oriundas de cabras com mastite subclínica. Também pouco se conhece sobre a variação da viabilidade celular em relação às espécies de *Staphylococcus* spp. Dessa forma, justifica-se o presente estudo que pretende determinar os fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica de cabras, verificando possíveis associações com a viabilidade celular.

2 OBJETIVOS

Utilizando leite de cabras com mastite subclínica, foi delineado o presente estudo com o objetivo de determinar os fatores de virulência relacionados à adesão e produção de biofilme das estirpes de *Staphylococcus* spp., verificando também a relação desses com a viabilidade celular.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as estirpes isoladas nas amostras;
- Identificar as espécies dos *Staphylococcus* spp.;
- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos *Staphylococcus* spp.;
- Determinar os fatores de virulência de adesão e biofilme das estirpes de estafilococos coagulase negativa e positiva;
- Efetuar contagem de células somáticas, viabilidade celular e cálculo de células viáveis das amostras;
- Determinar a ocorrência ou não de associação entre as espécies de *Staphylococcus* spp. e genes com a contagem de células somáticas, viabilidade celular e cálculo de células viáveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A colheita das amostras foi realizada em seis propriedades leiteiras, sendo três localizadas no Estado de São Paulo (duas no Município de Ibiúna e uma em Jacareí) e as demais em Minas Gerais (Municípios de Ouro Fino, São Gotardo e Patos de Minas).

As análises celulares, microbiológicas e moleculares foram realizadas no laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). A análise de CCS foi efetuada no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Para garantir a realização do exame em curto período de tempo, algumas etapas (viabilidade celular e semeadura) da análise do leite colhida nas propriedades localizadas no Estado de Minas Gerais (Municípios de São Gotardo e Patos de Minas) foram processadas no laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV/UFU).

3.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram selecionadas cabras que estavam entre o terceiro e sétimo mês de lactação. Realizou-se um exame físico da glândula mamária com inspeção e palpação do úbere e tetos, identificando a presença ou não de sinais de inflamação: aumento da temperatura, presença de sensibilidade e aumento de volume da glândula, bem como alterações nos linfonodos supramamários (PUGH, 2004).

3.2 TESTES UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA MASTITE

Para identificar os animais com mastite clínica efetuou-se o teste da caneca de fundo preto segundo recomendações feitas por Santos e Fonseca (2007).

A identificação da mastite subclínica foi feita com a utilização do teste de CMT segundo metodologia estabelecida por Schalm et al. (1971). As glândulas mamárias que apresentaram alterações nesse teste foram classificadas como casos de mastite subclínica e foram colhidas amostras de leite individuais de cada glândula reagente.

3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras de leite foi realizada assepticamente, utilizando álcool iodado 2% para a higienização das estruturas mamárias.

As amostras de leite foram colhidas em três alíquotas: a primeira para a viabilidade celular, em tubos Falcons contendo 25 mL de tampão fosfato salina (PBS) e completados com mais 25 mL de leite; a segunda para o exame microbiológico, em tubos estéreis; a terceira para a contagem de células somáticas (CCS), 40 mL de leite em frascos contendo o conservante bronopol.

O transporte das amostras para o laboratório foi realizado sob refrigeração, em caixas isotérmicas com gelo reciclável, com exceção da terceira alíquota que já possuía o conservante e que, posteriormente, foi encaminhada para a ESALQ/USP.

3.4 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram selecionadas para este experimento, as amostras que apresentaram crescimento de *Staphylococcus* spp., bem como as que não apresentaram isolamento bacteriano. Desta forma, outros isolamentos bacterianos, que não foram identificados como *Staphylococcus* spp., foram descartados, como os isolados de *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp.

3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.5.1 Identificação do microrganismo

As amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-sangue de carneiro (5%) e incubadas a 37°C por 72 horas (BAUER, 1966), sendo realizada a leitura das placas em 24, 48 e 72 horas de incubação. A identificação das cepas isoladas de *Staphylococcus* spp. foi realizada por meio de provas bioquímicas (LENNETTE et al., 1985), seguida da classificação estabelecida por Murray et al. (1999).

Após a coloração pelo método de coloração de Gram e prova da catalase, realizou-se a prova da coagulase, para diferenciar *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e positiva (SCP). O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado do *Micrococcus* pela sensibilidade à bacitracina, sendo o *Staphylococcus* spp. resistente. As outras provas bioquímicas realizadas foram: fermentação da lactose, maltose, manitol, sacarose e trealose, urease, produção de acetoina, resistência à novobiocina e polimixina B (MURRAY et al., 1999; KONEMAN et al., 2001).

As cepas em que não foi possível fazer a identificação da espécie de *Staphylococcus* spp. pelas provas bioquímicas, foi utilizado o kit *Rapid Staph*¹.

3.5.2 Perfil de sensibilidade

Para avaliação do perfil de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas neste experimento, foi empregado o método descrito por Bauer et al. (1966), difusão em placas de ágar Mueller Hinton, com os seguintes discos antimicrobianos²: amoxicilina (10 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefalexina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftiofur (30 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), norfloxacina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 un), sulfametoxazol-trimetropim (25 µg), tetraciclina (30 µg),

¹ Thermo Fisher Scientific, Lenexa, Estados Unidos da América.

² Laborclin, Pinhais, PR, Brasil.

vancomicina (30 µg). A interpretação dos halos de inibição foi de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).

3.6 ANÁLISES MOLECULARES

A obtenção do DNA cromossômico das cepas de *Staphylococcus* spp. seguiu as recomendações do protocolo de extração de Boom et al. (1990), com o acréscimo da metodologia de utilização da proteinase K³ (20 mg/mL) e lisozima⁴ (100 mg/mL) referidas em Coutinho et al. (2011). O sobrenadante obtido foi armazenado a 20°C negativos até ser utilizado.

3.6.1 Reação em cadeia da polimerase

Foram utilizados sete pares de iniciadores⁵ para amplificação dos genes codificadores de adesinas e relacionados à produção de biofilme, conforme descritos por Booth et al. (2001), Tristan et al. (2003) e Vancraeynest et al. (2004), respectivamente, e demonstrados no quadro 1.

As cepas padrão utilizadas foram cedidas ao laboratório pelo Dr. Franklin Gerônimo Bispo Santos, professor da Universidade Federal do Piauí, com exceção do gene *bap*, que foi usado cepa de campo da coleção do laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da FMVZ/USP.

³ LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ US Biological, Swampscott, Estados Unidos da América.

⁵ Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

Quadro 1 - Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de adesinas e biofilmes – São Paulo – 2014

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
Proteína Ligadora de Colágeno	<i>cna-1</i> <i>cna-2</i>	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	423
Proteína Ligadora de Laminina	<i>eno-1</i> <i>eno-2</i>	ACGTGCAGCAGCTGACT CAACAGCATCTTCAGTACCTTC	302
Proteína Ligadora de Elastina	<i>ebpS-1</i> <i>ebpS-2</i>	CATCCAGAACCAATCGAAGAC CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG	186
Proteína A Ligadora de Fibronectina	<i>fnbA-1</i> <i>fnbA-2</i>	GCGGAGATCAAAGACAA CCATCTATAGCTGTGTGG	1280
Proteína B ligadora de Fibronectina	<i>fnbB-1</i> <i>fnbB-2</i>	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524
Proteína ligadora de fibrinogênio	<i>fib-1</i> <i>fib-2</i>	CTACAACTACAATTGCCGTCAACAG GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC	404
Proteína associada à formação do biofilme	<i>bap-1</i> <i>bap-2</i>	CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971

Foram realizadas três reações em cadeia da polimerase (PCR) para cada cepa isolada, denominadas PCR-1, PCR-2 e PCR-3. No PCR-1 foram amplificados os genes *cna*, *eno* e *ebpS* e no PCR-2, os genes *fnbB* e *fib*, ambos de acordo com o protocolo de Tristan et al. (2003). A amplificação dos genes *fnbA* (PCR-3) e *bap* (PCR-4) foi realizada conforme os protocolos de Booth et al. (2001) e Vancraeynest et al. (2004), respectivamente.

3.6.2 Visualização dos produtos amplificados

A detecção do produto amplificado foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado com tampão de tampão tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X e corado com 0,05 µg/mL de brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta para identificar os fragmentos de interesse, utilizando-se marcadores de peso molecular⁶ de 100 bp.

3.7 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

As amostras de leite contidas em frascos com o conservante bronopol foram encaminhadas para a ESALQ/USP. A leitura da CCS foi realizada por citometria de fluxo no equipamento Fossomatic⁷, de acordo com a International Dairy Federation (2006).

3.8 VIABILIDADE CELULAR

Os tubos Falcons com 25 mL de leite e 25 mL de PBS foram submetidos à centrifugação de 1000 g, durante 15 minutos à temperatura de 4°C, de acordo com Koess e Hamann (2008). Após, retirou-se o sobrenadante e o botão formado foi desprendido e ressuspensionado em 1 mL de PBS e transferido para microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, outra centrifugação de 400 g foi realizada, por 10 minutos a mesma temperatura. Ao término da segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o botão novamente foi ressuspensionado em PBS. Uma terceira centrifugação foi realizada, semelhante à segunda.

Para a leitura da viabilidade celular, adicionou-se em um microtubo de 1,5 mL, 10 µL da suspensão celular e 90 µL de azul de *Trypan*⁸ 0,4% e, em seguida, 10 µL desta suspensão foi colocada em câmara de Neubauer para a realização da contagem celular no microscópio.

⁶ Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

⁷ FOSS, Hillerød, Dinamarca.

⁸ Merck, Darmstadt, Alemanha.

Foram contadas 100 células por amostra de leite para que o valor da contagem da viabilidade celular fosse convertido em percentual. Para calcular o número de células viáveis, foi verificado o número de CCS de cada amostra e aplicado o percentual da viabilidade celular, obtendo-se o número de células viáveis.

3.9 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES

A sequência das etapas desenvolvidas estão detalhadas no fluxograma (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma sequencial das etapas desenvolvidas na análise das amostras de leite de cabras com mastite subclínica – São Paulo - 2014

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A verificação das espécies de *Staphylococcus* spp. e dos genes de adesinas e biofilme de maior ocorrência e a associação desses genes com as espécies estafilocócicas foram realizadas pelo teste de comparação múltipla entre proporções, utilizando o programa *R*⁹ e de acordo com Biase e Ferreira (2009). A comparação dos genes em relação aos SCP e SCN foi realizada pelo teste binomial de duas proporções através do programa *Action*¹⁰. Para associar os antimicrobianos com SCN e SCP e espécies de estafilococos utilizou-se o Teste de Fisher e ao comparar a CCS, viabilidade celular e células viáveis com a presença ou ausência de *Staphylococcus* spp., SCN e SCP, espécies de estafilococos e genes utilizou-se o teste de Mann-Whitney, através do programa *Instat*¹¹. Na análise estatística adotou-se a significância de referência de 5%.

⁹ R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria.

¹⁰ Estatcamp, São Carlos, SP, Brasil.

¹¹ Graphpad, Califórnia, Estados Unidos da América.

4 RESULTADOS

Não foi encontrada alteração nas glândulas mamárias durante o exame físico, como também não foi identificado animal positivo no teste da caneca de fundo preto durante a ordenha. Dois animais com mastite clínica foram encontrados, em diferentes propriedades. Foram colhidas amostras de leite, mas como estavam em tratamento, não foi possível isolar o microrganismo.

Colheram-se 226 amostras de leite de glândulas mamárias reagentes ao CMT (Apêndice A), de um total de 164 animais. Dessas amostras, 98 (Propriedades A, B e C) foram procedentes do Estado de São Paulo e 128 (Propriedades D, E, F e G), do Estado de Minas Gerais (Tabela 1).

Tabela 1 - Número animais testados e amostras colhidas por propriedade, e avaliações realizadas - São Paulo - 2014

Propriedades		Teste do CMT				Isolamento de microrganismo	
Identificação	Total de animais	Número de animais		Número de glândulas		Número	%
		Testados	Amostras colhidas	Testadas	Amostras colhidas		
A	6	6	5	12	10	3	30
B	45	36	22	72	41	11	26,8
C	65	42	24	84	47	14	29,8
D	250	51	39	102	39	37	94,9
E	50	32	28	64	34	15	44,1
F	15	7	4	14	7	3	42,9
G	190	56	42	112	48	39	81,2
Total	621	230	164	460	226	122	54,0

CMT- *California Mastitis Test*

% - Percentual

4.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.1.1 Identificação do microrganismo

Das 226 amostras colhidas e semeadas, 122 tiveram crescimento bacteriano e dessas, 110 (90,2%) foram identificadas como *Staphylococcus* spp., sendo 90 (73,8%) *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e 20 (16,4%) *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), nove (7,4%) *Corynebacterium* spp. e três (2,5%) *Streptococcus* spp. (Tabela 2).

Tabela 2 - Número total e percentual das estirpes isoladas das amostras de mastite subclínica segundo a propriedade e identificação bacteriológica - São Paulo - 2014

Propriedades	Mastite subclínica				Total
	<i>Corynebacterium</i> spp.	SCN*	SCP**	<i>Streptococcus</i> spp.	
A	-	3 (100%)	-	-	3
B	7 (63,6%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	11
C	-	11 (78,6%)	1 (7,1%)	2 (14,3%)	14
D	-	35 (94,6%)	2 (5,4%)	-	37
E	2 (13,3%)	5 (33,3%)	8 (53,3%)	-	15
F	-	3 (100%)	-	-	3
G	-	31 (79,5%)	8 (20,5%)	-	39
Total	9 (7,3%)	90 (73,8%)	20 (16,4%)	3 (2,5%)	122

**Staphylococcus* coagulase negativa

***Staphylococcus* coagulase positiva

% - percentual

Verificou-se que a maior frequência de SCN foi *S. epidermidis* (24,55%), *S. lugdunensis* (15,40%), *S. capitis* ss *capitis* (8,18%), *S. chromogenes* (7,27%), *S. hominis* ss *hominis* (7,27%) e *S. auricularis* (6,36%). As vinte amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva foram identificadas como *S. intermedius* e *S. aureus*, correspondendo, respectivamente, a 13,64% e 4,55% do total de *Staphylococcus* spp. isoladas (Tabela 3). A ocorrência do *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *S. intermedius* foi maior que todas as outras espécies ($p < 0,05$), não havendo diferença entre essas.

Tabela 3 - Número total e percentual de espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas segundo a identificação e propriedades – São Paulo – 2014

Espécies	Propriedades							Total	%
	A	B	C	D	E	F	G		
SCN*									
<i>S. auricularis</i>	-	1	3	2	1	-	-	7	6,36
<i>S. capitis ss capitis</i>	2	-	1	2	-	-	4	9	8,18
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	2	-	-	6	8	7,27
<i>S. cohnii ss cohnii</i>	1	-	-	1	-	-	1	3	2,73
<i>S. epidermidis</i>	-	-	1	13	1	3	9	27	24,55
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	1	-	-	-	-	1	0,91
<i>S. hominis ss hominis</i>	-	1	-	4	-	-	3	8	7,27
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	1	7	2	-	7	17	15,45
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	1	3	-	-	-	4	3,64
<i>S. schleiferi</i>	-	-	1	-	-	-	-	1	0,91
<i>S. warneri</i>	-	-	-	1	-	-	-	1	0,91
<i>S. xylosus</i>	-	-	2	-	1	-	1	4	3,64
SCP**									
<i>S. aureus</i>	-	1	1	1	1	-	1	5	4,55
<i>S. intermedius</i>	-	-	-	1	7	-	7	15	13,64
Total	3	3	12	37	13	3	39	110	100,00

Staphylococcus* coagulase negativa*Staphylococcus* coagulase positiva

% - percentual

4.1.2 Perfil de sensibilidade

Avaliou-se perfil de sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas aos diferentes antimicrobianos (Tabela 4). Observou-se maior sensibilidade (acima de 95%) das estirpes de *Staphylococcus* spp. para os seguintes antimicrobianos: enrofloxacina (99,1%), eritomicina (98,2%), gentamicina (98,2%), vancomicina (98,2%), amicacina (97,3%), ceftiofur (97,3%), norfloxacina (96,4%) e neomicina (95,5%). Por outro lado, as estirpes apresentaram maior resistência (acima de 50%) frente à penicilina (81,8%), oxacilina (60,0%) e ampicilina (55,5%).

Tabela 4 – Classificação em número absoluto e percentual das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas segundo o perfil de suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados – São Paulo - 2014

Antibiótico	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amoxicilina	78	70,9	5	4,5	27	24,5
Amicacina	107	97,3	3	2,7	-	-
Ampicilina	45	40,9	4	3,6	61	55,5
Cefalotina	82	74,5	11	10,0	17	15,5
Cefalexina	83	75,5	-	-	27	24,5
Cefoxitina	58	52,7	5	4,5	47	42,7
Ceftiofur	107	97,3	1	0,9	2	1,8
Clindamicina	97	88,2	11	10	2	1,8
Cloranfenicol	84	76,3	18	16,4	8	7,3
Enrofloxacina	109	99,1	-	-	1	0,9
Eritromicina	108	98,2	2	1,8	-	-
Gentamicina	108	98,2	1	0,9	1	0,9
Neomicina	105	95,5	5	4,5	-	-
Norfloxacina	106	96,4	2	1,8	2	1,8
Oxacilina	39	35,5	5	4,5	66	60,0
Penicilina	20	18,2	-	-	90	81,8
Sulfametoxazol+ trimetoprim	103	93,6	4	3,6	3	2,7
Tetraciclina	91	82,7	3	2,7	16	14,5
Vancomicina	108	98,2	1	0,9	1	0,9

% - Percentual

Foi realizada uma comparação entre a suscetibilidade de SCN e SCP aos antimicrobianos testados e verificou-se que não houve diferença nos perfis de resistência e sensibilidade, com exceção para a tetraciclina, frente a qual as cepas de SCP apresentaram sete (35%) estirpes resistentes, sendo a resistência maior ($p < 0,05$) do que SCN, que apresentaram nove (10,3%).

As estirpes, por espécies de estafilococos, resistentes aos antimicrobianos testados estão quantificadas e demonstradas na tabela 5. Ressalta-se que *S. epidermidis* apresentou maior resistência para a amoxicilina e ampicilina, seguida da penicilina e oxacilina, em relação aos demais antimicrobianos ($p < 0,05$). *S. lugdunensis* apresentou resistência semelhante a todos antimicrobianos, com exceção da amoxicilina e penicilina que foram mais resistentes do que norfloxacina ($p < 0,05$). Já com relação ao *S. intermedius*, a resistência da penicilina foi semelhante aos outros antimicrobianos e maior que a vancomicina ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Número de estirpes de acordo com as espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de cabras com mastite subclínica, em relação à resistência aos antimicrobianos testados – São Paulo – 2014

Espécies	Isolados	Antimicrobianos																		
		AMO	AMI	AMP	CFL	CFX	CFO	CFT	CLI	CLO	ENO	ERI	GEN	NEO	NOR	OXA	PEN	SUT	TET	VAN
SCN																				
<i>S. auricularis</i>	7	3	-	2	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	-	-	-
<i>S. capitis ss capitis</i>	9	7	-	5	1	5	4	1	-	1	1	-	1	-	-	5	7	1	-	-
<i>S. chromogenes</i>	8	3	-	4	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	4	7	-	4	-
<i>S. cohnii ss cohnii</i>	3	2	-	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	1	-
<i>S. epidermidis</i>	27	27	-	21	6	5	12	1	1	5	-	-	-	-	-	20	27	1	2	-
<i>S. haemolyticus</i>	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. hominis ss hominis</i>	8	5	-	5	1	-	3	-	-	1	-	-	-	-	-	6	6	-	1	-
<i>S. lugdunensis</i>	17	11	-	7	-	5	9	-	-	-	-	-	-	-	1	9	13	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	4	4	-	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	-	1	-
<i>S. schleiferi</i>	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-
<i>S. xylosus</i>	4	2	-	2	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-
SCP																				
<i>S. aureus</i>	5	2	-	2	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	-	2	-
<i>S. intermedius</i>	15	11	-	8	5	2	9	-	-	-	-	-	-	-	-	9	12	-	5	1
Total	110	79	-	61	17	27	47	2	1	8	1	-	1	-	2	66	91	3	16	1

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativos, SCP – *Staphylococcus* coagulase positivos, AMO – amoxicilina, AMI – amicacina, AMP – ampicilina, CFL – cefalotina, CFX – cefalexina, CFO – cefoxitina, CFT – ceftiofur, CLI – clindamicina, CLO – cloranfenicol, ENO – enrofloxacina, ERI – eritromicina, GEN – gentamicina, NEO – neomicina, NOR – norfloxacina, OXA – oxacilina, PEN – penicilina, SUT - sulfametoxazol-trimetropim, TET – tetraciclina, VAN - vancomicina

Ao associar as espécies de estafilococos (*S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis*) com os antimicrobianos testados, observou-se diferença estatística significativa entre *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* com os antimicrobianos amoxicilina, ampicilina e penicilina ($p < 0,05$), demonstrando que as estirpes de *S. epidermidis* apresentaram maior resistência a esses antimicrobianos do que *S. lugdunensis*. Em relação à associação *S. epidermidis* e *S. intermedius*, observou-se diferença estatística significativa para a amoxicilina e penicilina ($p < 0,05$), sendo as estirpes de *S. epidermidis* mais resistentes a esses antimicrobianos que *S. intermedius*. Não foi verificada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) ao associar *S. lugdunensis* e *S. intermedius* com os antimicrobianos testados (Tabela 6).

Tabela 6 – Número e percentual de *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis* segundo a resistência aos antimicrobianos e a análise estatística – São Paulo - 2014

Espécie de estafilococos	Antimicrobiano			P*		
	AMO	AMP	PEN	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. epidermidis</i>	27 (100%)	21 (77,8%)	27 (100%)	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	11 (73,3%)	8 (53,3%)	12 (80%)	AMO: 0,01 AMP: 0,16 PEN: 0,03	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	11 (64,7%)	7 (41,2%)	13 (76,5%)	AMO: 0,00 AMP: 0,02 PEN: 0,01	AMO: 0,06 AMP: 0,17 PEN: 0,06	-

AMO – amoxicilina, AMP - ampicilina, PEN – penicilina

*Teste de Fisher

Cabe salientar ainda que todas as espécies de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência a um ou mais antimicrobiano, com exceção de uma cepa de *S. haemolyticus*, que apresentou sensibilidade a todos. Dessa forma, oito estirpes de SCN e três de SCP foram resistentes a um antimicrobiano e o restante das estirpes de SCN e SCP mostraram multirresistência. Não houve diferença estatística significativa ao comparar a quantidade de estirpes de SCN e SCP multirresistentes ($p > 0,05$), demonstrando que ambas apresentaram multirresistência de forma semelhante.

4.2 ANÁLISES MOLECULARES

As amostras foram positivas para os seguintes genes pesquisados: *cna*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA* e *bap*, com exceção do gene *fnbB*. Em relação aos 110 isolados de *Staphylococcus* spp., os resultados obtidos para detecção de genes codificadores de adesinas e biofilme foram: 59 (53,6%) amostras positivas para o gene *eno*, 48 (43,7%) para o gene *bap*, 21 (19,1%) para *ebpS*, 20 (18,2%) para *fnbA*, 18 (16,4%) para *fib*. Apenas uma amostra foi positiva para o gene *cna* (0,9%) e não houve amostras positivas para o gene *fnbB*. Vinte e três amostras (20,9%) de *Staphylococcus* spp. não apresentaram nenhum dos genes avaliados. Os genes que apresentaram maior ocorrência ($p < 0,05$) nas estirpes de *Staphylococcus* spp. foram *eno* e *bap*.

Em relação aos resultados obtidos para as estirpes de SCN, verificou-se: 45 (50%) das amostras positivas para o gene *bap*, 44 (48,9%) para o *eno*, 06 (6,7%) para o *ebpS*, 03 (3,3%) para o *fnbA*, 02 (2,2%) para *fib* e 01 (1,1%) para *cna*. Para as estirpes de SCP, observou-se: 17 (85%) positivas para *fnbA*, 16 (80%) para *fib*, 15 (75%) para *ebpS*, 15 (75%) para *eno* e 03 (15%) para *bap*. Os genes *eno* e *bap* foram mais encontrados nos isolados de SCN enquanto os genes *ebpS*, *fib* e *fnbA* foram mais detectados nos SCP ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Número total e percentual de resultados positivos das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas segundo os genes codificadores de adesinas e biofilme – São Paulo – 2014

Genes	SCN		SCP		Total	%	P*
	Número	%	Número	%			
<i>cna</i>	1	100	-	-	1	0,9	-
<i>ebpS</i>	6	28,6	15	71,4	21	19,1	0,00
<i>eno</i>	44	74,6	15	25,4	59	53,6	0,03
<i>fib</i>	2	11,1	16	88,9	18	16,4	0,00
<i>fnbA</i>	3	15	17	85	20	18,2	0,00
<i>fnbB</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>bap</i>	45	93,7	3	6,3	48	43,7	0,00

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP – *Staphylococcus* coagulase positiva

cna - proteína carreadora de colágeno, *ebpS* - proteína ligadora de elastina, *eno* - proteína ligadora de laminina, *fib* - proteína ligadora de fibrinogênio, *fnbA* – proteína A ligadora de fibronectina, *fnbB* - proteína B ligadora de fibronectina, *bap* – proteína associada à formação do biofilme

% - percentual

*Teste binomial de duas proporções

As espécies de *Staphylococcus* apresentaram variação quanto à ocorrência dos genes codificadores de adesinas e biofilme, sendo que *S. epidermidis* mostrou maior positividade para os genes *eno* e *bap* do que para os outros genes ($p<0,05$), *S. lugdunensis* apresentou maior quantidade do gene *bap* do que *eno* ($p<0,05$) e *S. intermedius* apresentou uma menor positividade para o gene *bap* em relação aos outros genes ($p<0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Número de amostras positivas para os genes codificadores de adesinas e biofilme em relação às espécies de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de cabras com mastite subclínica – São Paulo - 2014

Espécies	Total de cepas isoladas	Genes							
		<i>cna</i>	<i>ebpS</i>	<i>eno</i>	<i>fib</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>bap</i>	
SCN*									
<i>S. auricularis</i>	7	-	-	2	-	-	-	2	
<i>S. capitis</i> ss <i>capitis</i>	9	-	-	6	1	-	-	3	
<i>S. chromogenes</i>	8	-	1	2	1	1	-	6	
<i>S. cohnii</i> ss <i>cohnii</i>	3	-	-	1	-	-	-	-	
<i>S. epidermidis</i>	27	-	3	23	-	1	-	15	
<i>S. haemolyticus</i>	1	-	1	1	-	1	-	1	
<i>S. hominis</i> ss <i>hominis</i>	8	1	1	6	-	-	-	2	
<i>S. lugdunensis</i>	17	-	-	1	-	-	-	12	
<i>S. saprophyticus</i>	4	-	-	1	-	-	-	2	
<i>S. schleiferi</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. warneri</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. xylosus</i>	4	-	-	1	-	-	-	2	
SCP**									
<i>S. aureus</i>	5	-	4	4	4	4	-	1	
<i>S. intermedius</i>	15	-	11	11	12	13	-	2	
Total	110	1	21	59	18	20	-	48	

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP – *Staphylococcus* coagulase positiva

cna - proteína carreadora de colágeno, *ebpS* - proteína ligadora de elastina, *eno* - proteína ligadora de laminina, *fib* - proteína ligadora de fibrinogênio, *fnbB* - proteína B ligadora de fibronectina, *bap* - proteína associada à formação do biofilme

No presente estudo, algumas estirpes de *Staphylococcus* spp. apresentaram um gene codificador de adesina ou biofilme, como o gene *bap*, que foi detectado em 20 estirpes de SCN e uma estirpe de SCP. Entretanto, mais de um gene foi encontrado em outras estirpes, sendo a associação de genes *bap/eno* a mais frequente em SCN e *ebpS/eno/fib/fnbA*, em SCP (*S. aureus* e *S. epidermidis*) (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de ocorrência dos genes codificadores de adesinas e biofilme isoladamente ou associados em estafilococos coagulase negativa e positiva de amostras de leite de cabras com mastite subclínica – São Paulo - 2014

Genes		<i>Staphylococcus</i> spp.	
Isolados ou associados	Nº Total	Resultado microbiológico	Espécies
<i>bap</i>	21	20 SCN / 1 SCP	<i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> ss <i>capitis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. intermedius</i>
<i>ebpS</i>	1	SCN	<i>S. hominis</i>
<i>eno</i>	14	SCN	<i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> ss <i>capitis</i> , <i>S. cohnii</i> ss <i>cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i>
<i>fib</i>	1	SCN	<i>S. capitis</i> ss <i>capitis</i>
<i>bap /ebpS</i>	1	SCN	<i>S. epidermidis</i>
<i>bap /eno</i>	26	SCN	<i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> ss <i>capitis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> ss <i>hominis</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. saprophyticus</i>
<i>bap /fnbA</i>	1	SCN	<i>S. saprophyticus</i>
<i>ebpS /eno</i>	1	SCN	<i>S. epidermidis</i>
<i>cna /eno</i>	1	SCN	<i>S. hominis</i> ss <i>hominis</i>
<i>fib /fnbA</i>	1	SCP	<i>S. intermedius</i>
<i>bap /ebpS /eno</i>	1	SCN	<i>S. haemolyticus</i>
<i>ebpS /fib /fnbA</i>	1	SCN	<i>S. chromogenes</i>
<i>bap /ebpS /eno /fnbA</i>	1	SCN	<i>S. haemolyticus</i>
<i>ebpS /eno /fib /fnbA</i>	14	SCP	<i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i>
<i>bap /ebpS /eno /fib /fnbA</i>	2	SCP	<i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i>
Total	87		

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP – *Staphylococcus* coagulase positiva

cna - proteína carreadora de colágeno, *ebpS* - proteína ligadora de elastina, *eno* - proteína ligadora de laminina, *fib* - proteína ligadora de fibrinogênio, *fnbB* - proteína B ligadora de fibronectina, *bap* - proteína associada à formação do biofilme

A análise da associação entre a presença de gene codificador de adesina ou biofilme e a ocorrência de resistência antimicrobiana revelou que não houve diferença estatística significativa ao associar os genes identificados com os antimicrobianos testados ($p > 0,05$).

4.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Observou-se diferença estatisticamente significante entre a CCS das amostras nas quais houve isolamento de *Staphylococcus* spp. e as amostras sem crescimento bacteriano (Tabela 10). Assim, animais com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* spp.

apresentaram CCS maior ($p < 0,05$) do que os animais que não tiveram isolamento de microrganismo em amostras de leite.

Tabela 10 - Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas obtidas nas amostras com e sem isolamento bacteriano e análise estatística – São Paulo - 2014

Resultado microbiológico	CCS ($\times 10^3/\text{mL}$)			P*
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	
<i>Staphylococcus</i> spp.	1763,5	9999	171	0,00
Sem isolamento bacteriano	996	9999	88	

CCS – Contagem de células somáticas

*Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a CCS das amostras com isolados de SCN e SCP, mas ao comparar SCN e SCP com as amostras de leite sem isolamento bacteriano, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Esses resultados demonstraram que, embora não tenha sido diferente a CCS dos caprinos que apresentaram mastite subclínica por SCN e SCP, os valores de CCS apresentaram-se mais elevado em relação às amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores da contagem de células somáticas e análise estatística das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva – São Paulo - 2014

Resultado microbiológico	CCS ($\times 10^3/\text{mL}$)			P*		
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	SCN	SCP	Sem isolamento bacteriano
SCN	1695	9999	204	-	-	-
SCP	3201	9999	171	0,08	-	-
Sem isolamento bacteriano	996	9999	88	0,01	0,00	-

CCS – Contagem de células somáticas

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva

*Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença estatística significativa entre os valores de CCS dos microrganismos *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis* ($p > 0,05$), embora o *S.*

intermedius tenha apresentado o valor de mediana da CCS maior do que o *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*. Foi observada diferença estatística significativa ao associar a CCS das amostras sem isolamento bacteriano com o *S. epidermidis* e *S. intermedius* ($p < 0,05$), os quais apresentaram maior valor de CCS em relação às amostras sem isolamento bacteriano; já as estirpes de *S. lugdunensis* não apresentaram diferença estatística significativa ao associá-la com as amostras sem isolamento bacteriano ($p > 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores da contagem de células somáticas das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de espécies de estafilococos e análise estatística – São Paulo – 2014

Isolados	CCS ($\times 10^3/\text{mL}$)			P*			
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. lugdunensis</i>	Sem isolamento bacteriano
<i>S. epidermidis</i>	2157	9999	204	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	2966	9999	171	0,42	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	1608	7807	204	0,11	0,16	-	-
Sem isolamento bacteriano	996	9999	88	0,01	0,01	0,74	-

CCS – Contagem de células somáticas

*Teste de Mann-Whitney

Ao relacionar os valores da CCS com os genes identificados isoladamente ou em associação das estirpes de estafilococos, observou-se diferença estatística significativa entre as associações de genes *bap/eno* e *ebpS/eno/fib/fnbA*, demonstrando que *bap/eno* apresentaram valores de CCS menor que *ebpS/eno/fib/fnbA* (Tabela 13).

Tabela 13 – Valores da contagem de células somáticas das amostras de leite de cabras positivas para os genes isoladamente ou associados e análise estatística – São Paulo – 2014

Genes	CCS (x 10 ³ /mL)			P*			
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	<i>eno</i>	<i>bap</i>	<i>bap/eno</i>	<i>ebpS/eno/fib/fnbA</i>
<i>eno</i>	3140	9999	519	-	-	-	-
<i>bap</i>	1760	9999	171	0,21	-	-	-
<i>bap/eno</i>	1482	8311	361	0,06	0,44	-	-
<i>ebpS/eno/fib/fnbA</i>	3201	9999	1054	0,99	0,37	0,01	-

CCS – Contagem de células somáticas

ebpS - proteína ligadora de elastina, *eno* - proteína ligadora de laminina, *fib* - proteína ligadora de fibrinogênio, *fnbA* - proteína A ligadora de fibronectina, *bap* – proteína associada à formação do biofilme

*Teste de Mann-Whitney

4.4 VIABILIDADE CELULAR

As medianas da viabilidade celular para as amostras de leite com ou sem isolamento de *Staphylococcus* spp. foram, respectivamente, 87,28% e 85,15%, tendo sido observada diferença estatística significativa entre estes valores ($p < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Mediana, valores máximo e mínimo da viabilidade celular obtidas nas amostras com e sem isolamento bacteriano e análise estatística – São Paulo – 2014

Resultado Microbiológico	Viabilidade celular			
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	P*
<i>Staphylococcus</i> spp.	87,28	98,63	55,56	0,01
Sem isolamento bacteriano	85,15	98,67	40,00	

*Teste de Mann-Whitney

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de células viáveis em amostras de leite com isolamento de *Staphylococcus* spp. e sem isolamento

bacteriano, ou seja, as amostras de leite de cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp. apresentaram maior ($p < 0,05$) quantidade de células viáveis (Tabela 15).

Tabela 15 - Mediana, valores máximo e mínimo de células viáveis obtidas nas amostras de leite de cabras com e sem isolamento bacteriano e análise estatística – São Paulo - 2014

Resultado microbiológico	Células viáveis ($\times 10^3/\text{mL}$)			P*
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	
<i>Staphylococcus</i> spp.	1549,24	9499,05	142,49	0,00
Sem isolamento bacteriano	816,67	9122,09	74,10	

*Teste de Mann-Whitney

Embora tenha sido observada uma diferença nos valores da mediana, não houve diferença estatística significativa na viabilidade celular ($p > 0,05$) ao associá-la com SCN, SCP e amostras sem isolamento bacteriano, que apresentaram os valores de mediana de 87,28, 88,05 e 85,15, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16 – Valores da viabilidade celular e análise estatística das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva – São Paulo - 2014

Resultado microbiológico	Viabilidade celular			P*		
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	SCN	SCP	Sem isolamento bacteriano
SCN	87,28	98,60	55,56	-	-	-
SCP	88,05	98,63	75,00	0,29	-	-
Sem isolamento bacteriano	85,15	98,67	40,00	0,07	0,10	-

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva

*Teste de Mann-Whitney

Embora a mediana das células viáveis de SCP tenha sido maior do que as de SCN, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os dois grupos. Em contrapartida, ao associar SCN e SCP com as amostras de leite sem isolamento bacteriano foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0,05$), demonstrando que a quantidade de células viáveis de SCN e SCP foi maior do que nas amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 17).

Tabela 17 – Valores da células viáveis e análise estatística das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva – São Paulo - 2014

Resultado microbiológico	Células viáveis (x 10 ³ /mL)			P*		
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	SCN	SCP	Sem isolamento bacteriano
SCN	1450,86	8717,13	142,80	-	-	-
SCP	2750,38	9499,05	142,49	0,08	-	-
Sem isolamento bacteriano	816,67	9122,10	74,10	0,00	0,00	-

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa
 SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva
 *Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença estatística significativa ao associar as espécies de estafilococos *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis* e amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 18) com a viabilidade celular ($p>0,05$).

Tabela 18 – Valores da viabilidade celular das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de espécies de estafilococos e análise estatística – São Paulo – 2014

Resultado microbiológico	Viabilidade celular			P*			
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. lugdunensis</i>	Sem isolamento bacteriano
<i>S. epidermidis</i>	86,71	97,26	70,00	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	86,67	98,63	75,00	0,89	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	85,26	97,56	55,56	0,53	0,79	-	-
Sem isolamento bacteriano	85,15	98,67	40,00	0,10	0,29	0,52	-

*Teste de Mann-Whitney

Ao associar as espécies de estafilococos *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis* com a quantidade de células viáveis não foi verificada diferença estatística significativa ($p>0,05$). Entretanto, houve diferença estatística significativa na associação das células viáveis de *S. epidermidis* e *S. intermedius* com as amostras sem isolamento bacteriano,

demonstrando que o número de células viáveis dessas espécies de estafilococos foi maior do que nas amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 19).

Tabela 19 – Valores das células viáveis das amostras de leite de cabras com e sem isolamento de espécies de estafilococos e análise estatística – São Paulo – 2014

Resultado microbiológico	Células viáveis			P*			
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. lugdunensis</i>	Sem isolamento bacteriano
<i>S. epidermidis</i>	1776,3	8312,2	142,8	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	2522,9	9499,1	142,5	0,46	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	1361,7	7122,3	167,9	0,12	0,14	-	-
Sem isolamento bacteriano	816,6	9122,1	74,1	0,00	0,00	0,74	-

*Teste de Mann-Whitney

Não foi verificada diferença estatística significativa ao associar a viabilidade celular com os genes isolados ou associados a outros genes identificados nas estirpes de estafilococos ($p>0,05$) (Tabela 20).

Tabela 20 – Valores da viabilidade celular das amostras de leite de cabras positivas para os genes isoladamente ou associados e análise estatística – São Paulo – 2014

Genes	Viabilidade celular			P*			
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	<i>eno</i>	<i>bap</i>	<i>bap/eno</i>	<i>ebpS/eno/fib/fnbA</i>
<i>eno</i>	89,40	97,22	65,62	-	-	-	-
<i>bap</i>	87,05	97,56	55,56	0,43	-	-	-
<i>bap/eno</i>	86,88	93,68	61,54	0,26	0,96	-	-
<i>ebpS/eno/fib/fnbA</i>	88,05	96,77	75,00	0,70	0,67	0,47	-

ebpS - proteína ligadora de elastina, *eno* - proteína ligadora de laminina, *fib* - proteína ligadora de fibrinogênio, *fnbA*- proteína A ligadora de fibronectina, *bap* – proteína associada à formação do biofilme

*Teste de Mann-Whitney

Ao associar o número de células viáveis com os genes isolados ou associados identificados nas estirpes de estafilococos, encontrou-se diferença estatística significativa para *bap/eno* e *ebpS/eno/fib/fnbA* ($p < 0,05$), demonstrando que a associação de genes *ebpS/eno/fib/fnbA* apresentou maior quantidade de células viáveis que *bap/eno* (Tabela 21).

Tabela 21 – Valores das células viáveis das amostras de leite de cabras positivas para os genes isoladamente ou associados e análise estatística – São Paulo – 2014

Genes	Células viáveis (x 10 ³ /mL)			P*			
	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	<i>eno</i>	<i>bap</i>	<i>bap/eno</i>	<i>ebpS/eno/fib/fnbA</i>
<i>eno</i>	2849,3	8312,2	477,22	-	-	-	-
<i>bap</i>	1558,5	8717,1	142,49	0,45	-	-	-
<i>bap/eno</i>	1379,2	7184	274,7	0,06	0,46	-	-
<i>ebpS/eno/fib/fnbA</i>	2750,4	9499,1	790,5	0,99	0,41	0,02	-

ebpS - proteína ligadora de elastina, *eno* - proteína ligadora de laminina, *fib* - proteína ligadora de fibrinogênio, *fnbA*- proteína A ligadora de fibronectina, *bap* – proteína associada à formação do biofilme

*Teste de Mann-Whitney

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos exames microbiológicos corroboram com outros autores, que também encontraram uma maior frequência de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) em mastite subclínica, Moroni et al. (2005a) relataram que 80,7% de um total de 156 cabras de dois rebanhos localizados na Itália apresentaram mastite subclínica por SCN e McDougall et al. (2002) identificaram 87,5% de SCN em 40 amostras de leite de cabras com mastite subclínica nos Estados Unidos da América. Já no Brasil, Neves et al. (2010) detectaram que 83,3% de cabras com mastite subclínica por SCN, ao avaliar um total de 30 cabras e Silva et al. (2005) encontraram 58,3% de SCN ao isolar 223 amostras de mastite subclínica.

S. epidermidis é considerado o principal agente causador de mastite subclínica em caprinos (CONTRERAS et al., 2007; PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010). Langoni, Domingues e Baldini (2006) identificaram 55% de *S. epidermidis* de um total 109 amostras que apresentaram crescimento bacteriano e Contreras, Paape e Miller (1999) isolaram, de 121 amostras de mastite subclínica de cabras, 66,7% de *S. epidermidis*, sendo a espécie mais frequentemente encontrada. Neste estudo, *S. epidermidis* foi uma das espécies de estafilococos mais detectadas, juntamente com *S. lugdunensis* e *S. intermedius*.

Além do *S. epidermidis*, outras espécies de maior ocorrência em mastite subclínica caprina são *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* (CONTRERAS et al., 2007). Observou-se, neste estudo, uma menor ocorrência de *S. chromogenes* (7,27%) e *S. xylosus* (3,64%) em relação à *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *S. intermedius* e não foi isolado *S. caprae* e *S. simulans* nas amostras de leite de cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp.

Não são frequentes os relatos de identificação de *S. lugdunensis* em mastite subclínica caprina e, quando detectados, a ocorrência é baixa; Contreras, Paape e Miller (1999) encontraram 3,3% de *S. lugdunensis*, juntamente com *S. hominis* e *S. aureus* e Deinhofer e Pernthaner (1995) identificaram 2,3% de *S. lugdunensis* em 303 isolados de *Staphylococcus* spp. Em contrapartida, nesse estudo *S. lugdunensis* foi uma das espécies mais encontradas, concordando com o relato de El-Jakee et al. (2013) que identificou a bactéria em 33% dos isolados de um total de 36 amostras de leite de cabras com mastite subclínica.

Silva et al. (2005) relataram 28% de identificação *S. capitis* de um total de 223 amostras com mastite subclínica em cabras. Neste estudo, a espécie não foi uma das mais identificadas e apresentou percentual de 8,18%, sendo a quantidade de isolamentos de *S.*

capitis semelhante à de *S. chromogenes* e *S. hominis*. O percentual de *S. chromogenes* e *S. hominis* na presente pesquisa foi de 7,27%, e diferentemente desses resultados, El-Jakee et al. (2013) encontraram 11,1% de *S. hominis*, mas não isolaram *S. chromogenes*.

São escassos os relatos que tratam do isolamento de *S. intermedius* em casos de mastite subclínica caprina (CONTRERAS et al., 2003). Peixoto et al. (2010) encontraram 7,1% de um total de 154 isolados de mastite caprina e, diferentemente desses, no presente estudo, a espécie foi uma das mais detectadas. *S. aureus*, que é responsável por causar tanto mastite clínica como subclínica, é um patógeno de prevalência baixa em caprinos (CONTRERAS et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007), o que pode justificar a baixa ocorrência do mesmo neste trabalho. De acordo com Bergonier et al. (2003), a ocorrência de infecções intramamárias em caprinos por *S. aureus* representa em torno de 4%, concordando com o que foi verificado nesta pesquisa (4,55%).

Essas variações na ocorrência de mastite subclínica em caprinos e nas diferentes espécies de estafilococos isoladas do leite podem ser justificadas pelas práticas de manejo utilizadas durante a ordenha, já que variam entre as propriedades, sendo que práticas de manejo não adequadas aumentam a incidência de mastites. Assim, o manejo higiênico-sanitário durante a ordenha é fundamental para a prevenção de mastites, como a realização do pré e pós-*dipping*, utilizando desinfetantes apropriados, desinfecção e revisão periódica dos equipamentos de ordenha, higiene do ordenhador e limpeza do ambiente. Esses procedimentos irão promover a redução de microrganismos já existentes e a prevenção de uma nova infecção intramamária por estafilococos, principalmente por SCN (CONTRERAS et al., 2003; MOTA, 2008; PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010).

Quanto a sensibilidade antimicrobiana apresentada pelas estirpes isoladas, a maior resistência à penicilina e ampicilina, também foi observada por Neves et al. (2010) ao relatarem maior resistência para a penicilina (66,67%) e ampicilina (63,89%) em 36 estirpes de SCN isoladas de cabras com mastite subclínica no Estado da Paraíba. Também foi coincidente as estirpes com alta sensibilidade (acima de 90%) à gentamicina e enrofloxacina, diferindo, entretanto, para a oxacilina que, no presente estudo, apresentou maior resistência (66%). A oxacilina é derivada da penicilina, sendo considerada um beta-lactâmico semi-sintético e a resistência desse antimicrobiano às estirpes de estafilococos tem sido relatada como um problema de saúde pública, prejudicando o tratamento em pacientes com infecções hospitalares (ATIQUE et al., 2012). Essa resistência também tem sido encontrada nos isolados de mastite dos animais (ZAFALON et al., 2012), por isso é importante o isolamento, identificação dos microrganismos e a realização de teste de sensibilidade para o conhecimento

do perfil de sensibilidade das estirpes de campo, bem como para a obtenção de um tratamento com resultado satisfatório. Além disso, a utilização de uma terapia adequada, evita o uso indiscriminado de antibióticos, que pode favorecer a seleção de microrganismos resistentes e causar prejuízos para a saúde pública.

Ao se comparar perfil de sensibilidade das espécies de SCN e SCP, observou-se semelhança para todos os antimicrobianos, exceto para a tetraciclina. Essa semelhança de sensibilidade difere da relatada por Silva et al. (2005), que sugeriram uma maior resistência do SCN em relação ao SCP para a penicilina e que os SCN têm alta capacidade de desenvolver resistência para a oxacilina. Nesse estudo, a resistência à penicilina e oxacilina foi semelhante para os SCN e SCP, embora se possa ressaltar a capacidade dos SCN em também desenvolver resistência e não deve, portanto, ser um fato negligenciado. Em bovinos, Machado, Correa e Marin (2008) já demonstraram que os SCN isolados de mastite apresentavam alta resistência para todos os antimicrobianos testados (amoxicilina, ampicilina, penicilina, oxacilina, cefalexina, eritromicina, gentamicina, neomicina, tetraciclina e sulfametoxazol com trimetopim).

A tetraciclina apresentou maior resistência para os SCP (35%) do que para os SCN (10,3%). A resistência à tetraciclina encontra-se disseminada entre as bactérias, que podem transportar até 36 genes de resistência ao antimicrobiano. Essa resistência pode ser adquirida e é mediada principalmente por plasmídeos, que inibem a captação do antimicrobiano pelas bactérias, mas pode ocorrer que alguns dos microrganismos sejam induzidos a sintetizar enzimas capazes de inativar a tetraciclina (GIGUÉRE et al., 2010), tornando possível a resistência dos SCN.

As estirpes de *S. epidermidis* apresentaram maior resistência para a amoxicilina, ampicilina, penicilina e oxacilina. Ao associar o *S. epidermidis* com *S. lugdunensis*, o primeiro foi mais resistente à amoxicilina, ampicilina e penicilina e quando associado ao *S. intermedius*, o *S. epidermidis* apresentou maior resistência para amoxicilina e penicilina. Moroni et al. (2005a), ao avaliar a suscetibilidade antimicrobiana de cabras com mastite subclínica por *S. epidermidis*, verificaram que a amoxicilina obteve menor eficácia para essa espécie de estafilococos, o que concorda com o resultado encontrado neste estudo, já que a amoxicilina foi um dos antimicrobianos ao qual o *S. epidermidis* apresentou resistência. Vale ressaltar que, neste estudo, essa espécie de estafilococos apresentou alta resistência para amoxicilina e penicilina, com todas as estirpes resistentes (100%).

A multirresistência a antimicrobianos das estirpes estudadas ocorreu de forma semelhante, independente de ser SCN ou SCP. Mais uma vez, se cogita a possibilidade do uso

abusivo de antimicrobianos na terapêutica animal, fato que já vem sendo descrito em pesquisas sobre mastite subclínica em cabras e outras espécies animais (MACHADO; CORREA; MARIN, 2008; PEIXOTO et al., 2010; VIRDIS et al., 2010, LUCHEIS, 2011).

Com relação à pesquisa dos genes de adesão e biofilme nos isolados, gene *eno* foi um dos mais detectados, juntamente com o *bap*, sendo mais predominante nas estirpes de SCN do que nas de SCP, corroborando com Simojoki et al. (2012), que também identificaram com mais frequência o *eno* nas estirpes de SCN.

Há relatos da presença do gene *eno* em isolados de *Staphylococcus* spp., Simojoki et al. (2012) verificaram que 75% das 84 estirpes de SCN isoladas de bovinos com infecções intramamárias, apresentavam o gene *eno*; Kumar et al. (2011b) detectaram o gene *eno* em 100% dos isolados de *S. aureus* oriundos de 128 amostras de bovinos com mastite clínica e subclínica. Em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de animais (cães e suínos) e meio ambiente da Coreia, foram detectados 56% e 83% do gene *eno* de um total de 36 e 35 amostras analisadas, respectivamente, demonstrando uma maior quantidade desse gene no material proveniente do meio ambiente (SEO et al., 2008).

O biofilme consiste num fator de virulência que permite a fixação das bactérias em uma superfície, protegendo-as das defesas do organismo (STOODLEY et al., 2002). No presente estudo, o gene biofilme (*bap*) apresentou uma elevada ocorrência, diferindo de Seo et al. (2008) e Almeida et al. (2013) que não encontraram esse gene. Ao estudar 62 cepas de baixa e alta virulência de *Staphylococcus aureus* em coelhos, Vancraynest et al. (2004) também não detectaram o gene *bap*. Cucarella et al. (2001) identificaram a presença do gene *bap* em 5% de 350 estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite de bovinos com mastite, sugerindo que a presença do gene poderia estar relacionada a uma maior capacidade de aderência da bactéria à glândula mamária.

A presença do gene *bap* não está restrita ao *S. aureus*, podendo ser identificado também SCN (LASA; PENADÉS, 2006). No presente estudo, observou-se uma maior ocorrência do gene *bap* nas estirpes de SCN (93,7%) quando comparada ao SCP que foi de 6,3%.

A semelhança de outros relatos, o gene *ebpS* foi um dos mais identificados nas estirpes de SCP. Kumar et al. (2011a,b) detectaram 43,2% e 60,1% de gene *ebpS* em 111 e 128 *S. aureus* isolados de mastite em bubalinos e bovinos, respectivamente, demonstrando a participação do gene na patogenicidade da mastite. Entretanto, Simojoki et al. (2012), em seus estudos com estirpes de SCN isoladas de mastite em bovinos, verificaram uma menor ocorrência de 4,8% (4/84) do gene *ebpS*. Essa informação coincide com as do presente

trabalho, onde se detectou uma menor quantidade do *ebpS* em SCN do que em SCP, ou seja, seis genes (28,6%) em SCN e 15 genes (71,4%) em SCP.

As proteínas ligadoras de fibronectina (*fnbA* e *fnbB*), além de contribuírem para a adesão, favorecem a invasão do *S. aureus* nas células da glândula mamária (LAMMERS et al., 1999; PROIETTI et al., 2010). Nesse estudo, não houve amostras positivas para *fnbB*, apenas para *fnbA*, que foi uma das mais detectadas em SCP, o que concorda com os resultados obtidos por Lammers et al. (1999), que essas proteínas são relevantes para *S. aureus*. Salasia et al. (2004) e Kumar et al. (2011b) relataram a presença dos genes *fnbA* em 100% dos isolados e *fnbB* em, respectivamente, 21,9% e 3,5% de um total de 128 e 35 amostras dos isolados de *S. aureus* de mastites bovinas. Em contrapartida, a ocorrência desses genes em SCN é baixa quando comparada ao SCP, Simojoki et al. (2012) detectaram 3,6% de *fnbA* e 2,4% de *fnbB* em um total de 84 isolados e, no presente estudo, identificou-se três genes de *fnbA* (15%).

A ocorrência do gene *fib* foi menor que a do *eno* e *bap* e maior em SCP do que SCN. Ao avaliar mastite bovina causada por SCN, Simojoki et al. (2012) também identificaram uma baixa frequência do gene. Alguns autores descreveram que a ligação entre *S. aureus* com fibroblastos e células epiteliais aumenta muito com a expressão do gene *fib* (KUMAR et al., 2011b), o que poderia justificar uma maior frequência desse gene nos SCP do que SCN.

O gene *cna* foi identificado em apenas um isolado identificado como *S. hominis*. Outras pesquisas realizadas que analisaram mastite por *S. aureus* em ovinos, SCN em bovinos e *S. aureus* em búfalos não identificaram o gene (KUMAR et al., 2011a; SIMOJOKI et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013). Em contrapartida, Ikawaty et al. (2010) e Kumar et al. (2011b) encontraram esse gene em 49% e 6,3% de um total de 76 e 128 isolados de *S. aureus*, respectivamente. Embora esse gene exerça um relevante papel em processos infecciosos ósseos, a sua presença em infecções da glândula mamária pode não ser tão importante (ELASRI et al., 2002; KLEIN et al., 2012), fato que pode justificar a menor ocorrência do *cna* em casos de mastite.

S. epidermidis apresentou uma positividade maior para os genes *bap* e *eno*, confirmando o que já foi descrito por Eiff, Peters e Heilmann (2002), que essa espécie de estafilococos possui habilidade de formar biofilme. Também relataram que pouco se conhece sobre os fatores de ligação das proteínas do *S. epidermidis*, como do *eno*, já que a maioria das pesquisas é realizada com o *S. aureus*. Semelhante ao presente trabalho, uma pesquisa sobre mastite bovina identificou o gene *eno* em 100% dos *S. epidermidis* de um total de 10 isolados

(SIMOJOKI et al., 2012), o que pode sugerir que ambos os genes podem atuar na patogenicidade dessa espécie de estafilococos.

Pouco se conhece sobre os mecanismos de patogenicidade do *S. lugdunensis*, embora se saiba que essa espécie de estafilococos possua habilidade de ligação ao colágeno e fibrinogênio, bem como à fibronectina e laminina (EIFF; PETERS, HEILMANN, 2002). Diferentemente disso, no presente estudo, o gene *bap* foi o mais detectado nas estirpes de *S. lugdunensis*, o que pode sugerir que possua também capacidade de formar biofilme.

Em contrapartida, o gene *bap* foi o menos detectado no *S. intermedius*, em relação aos outros genes. Poucos estudos isolaram o *S. intermedius* de mastite em caprinos (LAS HERAS; DOMÍNGUEZ; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, 1999; CONTRERAS et al., 2003; PEIXOTO et al., 2010) e também não foi realizada pesquisas sobre os genes de fatores de virulência que podem acometer essa espécie de estafilococos. Entre os SCP, o *S. aureus* é a espécie mais pesquisada e estudos têm identificado os genes de fatores de virulência que acometem essa espécie, sendo que o gene *bap* apresentou pouco isolamento (CUCARELLA et al., 2001; KUMAR et al., 2011a,b). A baixa ocorrência de gene *bap* nos SCP, em relação aos SCN, pode ser um indicativo de que os SCN tenham mais capacidade de formar biofilme enquanto os SCP possuam outras características de virulência, o que justifica os genes *ebpS*, *fib* e *fnbA* terem sido mais detectados nos SCP e o *bap* e *eno* serem mais detectados nos SCN. Mas os estudos sobre isso ainda são escassos e, portanto, mais pesquisas devem ser realizadas sobre os genes de fatores de virulência e as espécies de estafilococos.

Adicionando-se ao que foi descrito anteriormente, pôde-se observar que as associações que mais ocorreram em SCN e SCP foram, respectivamente, *bap/eno* e *ebpS/eno/fib/fnbA*. Kumar et al. (2011b) encontraram muitas associações em *S. aureus*, já nos SCN, não há informações na literatura. A associação desses genes pode caracterizar a forma de atuação do *Staphylococcus* spp. na patogenicidade da mastite subclínica.

Dessa forma, observa-se que há variedade entre os fatores de virulência e as estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas; a determinação dos fatores de virulência permite mecanismos diferentes para a invasão e manutenção da bactéria na glândula mamária do hospedeiro. Pesquisas de epidemiologia molecular são necessárias para que os genes de virulência dos estafilococos possam ser caracterizados por região e propriedades, definindo a prevalência de determinadas espécies de estafilococos nesses locais e auxiliando os órgãos de Vigilância a atuarem no controle e prevenção da mastite subclínica de caprinos. Com isso, os programas realizados pela Vigilância serão mais direcionados por regiões, como na utilização de métodos de higienização durante a ordenha específicos para o microrganismo da

localidade, o que irá atribuir um leite de cabra de melhor qualidade para o consumidor, com menos prejuízos econômicos para o criador e sem causar riscos à saúde pública, ou seja, viabilizando a cadeia produtiva do leite caprino.

Estudos com caprinos demonstraram que a CCS é maior em glândulas mamárias infectadas do que nas híginas (HAENLEIN, 2002; MORONI et al., 2005b; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007), conforme também foi detectado na presente pesquisa. Luengo et al. (2004), ao avaliar 1.304 cabras com o objetivo de identificar fatores que afetam a CCS em infecções intramamárias, verificaram que cabras sem infecção bacteriana apresentaram CCS menor do que as cabras que com infecção na glândula mamária por menores patógenos (SCN, *Corynebacterium* spp. e *Micrococcus* spp.) e maiores patógenos (*Staphylococcus aureus*, enterobactéria, não-enterobactérias, *Streptococcus* spp. e *Mycoplasma* spp.). Uma pesquisa realizada com 25 animais em Israel, em que todas as cabras apresentavam uma glândula mamária infectada naturalmente por *Staphylococcus* spp. e a outra, sem isolamento de microrganismo, demonstrou que as glândulas mamárias infectadas tiveram maior CCS em relação às glândulas mamárias sem isolamento bacteriano (LEITNER et al., 2004).

Embora a mediana da CCS das glândulas mamárias com isolamento de SCP ($3.201 \times 10^3/\text{mL}$) tenha sido maior do que a mediana de SCN ($1.695 \times 10^3/\text{mL}$), esses resultados não foram diferentes. Em contrapartida, outros experimentos detectaram maior quantidade de CCS nos SCP do que SCN (HAENLEIN, 2002; LUENGO et al., 2004; MORONI et al., 2005b; LEITNER et al., 2011). Os SCN podem desenvolver mastites subclínicas persistentes, as quais também estão relacionadas a aumentos significativos da CCS e podem apresentar variações nos níveis da CCS entre 300×10^3 e 1.600×10^3 células/mL (LEITNER et al., 2004; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007), sendo que a mediana de CCS para os SCN encontrada no presente estudo teve valor aproximado ao nível de células/mL que foi verificado pelos autores.

Também se verificou que o SCN e o SCP apresentaram maior quantidade de CCS em relação às amostras de leite de cabra que não tiveram isolamento bacteriano, corroborando com os resultados encontrados pelos autores (LUENGO et al., 2004; MORONI et al., 2005b; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007; LEITNER et al., 2011).

Nesse estudo, não foi observado diferença nos valores de CCS das espécies de estafilococos mais detectadas (*S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis*), coincidindo com Moroni et al. (2005a), que também não encontraram diferença da CCS entre o *S. epidermidis* e outros SCN.

S. epidermidis e *S. intermedius* apresentaram maior número de CCS em relação às amostras de leite de cabra que não tiveram isolamento bacteriano, o mesmo não ocorreu para o *S. lugdunensis*. Diferentemente disso, Deinhofer e Pernthaner (1995) encontraram elevado valor de CCS para *S. lugdunensis* isolados de cabras com mastite clínica e essa diferença observada pode ter ocorrido, pois, neste estudo, foram avaliadas somente cabras com mastite subclínica, enquanto naquele avaliaram-se cabras com mastite clínica.

A diferença nos valores de CCS de uma infecção na glândula mamária por SCN em pequenos ruminantes e em bovinos é que neste o aumento da CCS é leve ou moderado e naquele o aumento da CCS é elevado. Isso sugere que a glândula de pequenos ruminantes tenha um aumento na resposta imunológica contra o SCN (CONTRERAS et al., 2007; SOUZA et al., 2012), o que pode justificar o aumento de CCS nos isolados de *S. epidermidis*. Leitner et al. (2011), ao realizarem pesquisa em 103 cabras para avaliar a imunidade da glândula mamária com infecção por espécies de estafilococos, constataram que as espécies de SCN (*S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. simulans*) apresentaram elevados valores de CCS ao comparar com as cabras que não tinham infecção na glândula mamária.

Pesquisas sobre o *S. intermedius* e a variação da CCS são escassas, em contrapartida, muitas informações há na literatura sobre o *S. aureus*, que também é SCP, e é responsável por causar um elevado aumento na CCS de caprinos com infecção intramamária (HAENLEIN, 2002; CONTRERAS et al., 2003; LUENGO et al., 2004; CONTRERAS et al., 2007; LEITNER et al., 2011). Bagnicka et al. (2011) classificaram as bactérias responsáveis por causar infecção intramamária caprina em grupos de maiores patógenos e menores patógenos, sendo que no primeiro grupo estavam inclusas *S. aureus* e *S. intermedius* e no segundo, SCN, e observou-se um elevado aumento da CCS no grupo de maiores patógenos e menores patógenos em relação ao grupo sem infecção intramamária, conforme também foi constatado no presente trabalho.

Pesquisas relataram que espécies de SCN sensíveis ao antimicrobiano novobiocina são mais patogênicas e apresentam CCS mais elevada do que as que são resistentes a esse antimicrobiano e o *S. epidermidis* e *S. intermedius* são sensíveis a novobiocina (CONTRERAS et al., 2003; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007), o que poderia justificar a elevada CCS detectada.

A associação de genes *ebpS/eno/fib/fnbA* apresentou maiores valores de CCS em relação à associação *bap/eno*, sendo que primeira associação ocorreu somente em SCP e a segunda, em SCN. Os genes *ebpS*, *fib* e *fnbA* foram mais encontrados em SCP do que SCN e, dessa forma, *S. aureus* e *S. intermedius* podem ter favorecido um aumento no valor de CCS.

Resultados obtidos em pesquisas já demonstraram que a CCS é mais elevada em SCP (LUENGO et al., 2004; LEITNER et al., 2011), o que pode explicar a maior CCS encontrada na associação *ebpS/eno/fib/fnbA*. Vale ressaltar que a presença dos genes *ebpS*, *fib* e *fnbA* pode exercer papel relevante na patogenicidade dos SCP e, conseqüentemente, no aumento na CCS, mas são necessárias mais pesquisas sobre a interferência destes genes sobre a CCS.

Destaca-se que não foi possível fazer associação da CCS com os demais genes detectados neste estudo, devido ao pequeno número de genes identificados isoladamente por estirpe, já que a maioria das estirpes apresentava mais de um gene; fato que também ocorreu com a viabilidade celular.

A viabilidade e a quantidade de células viáveis foram maiores nas amostras de leite que tiveram isolamento de *Staphylococcus* spp. do que nas amostras sem isolamento bacteriano. Os resultados observados corroboram com o que foi descrito por Mehrzad, Duchateau e Burvenich (2004), que durante a fase inicial da mastite, as células polimorfonucleares migram do sangue para as glândulas infectadas, aumentando consideravelmente a viabilidade celular, o que justifica uma maior viabilidade celular nas amostras com isolamento de *Staphylococcus* spp. do que nas amostras sem isolamento bacteriano.

Outras pesquisas encontraram resultados semelhantes ao detectado neste estudo, Piccinini et al. (1990) avaliaram a viabilidade celular em 80 vacas e encontraram uma média de viabilidade maior no grupo de animais que apresentavam mastite subclínica por *S. aureus* ($59,69 \pm 19,60\%$) do que no grupo sem isolamento bacteriano ($49,79 \pm 19,21\%$).

Merle, Schroder e Hamann (2007) avaliaram a viabilidade celular no leite de vacas com e sem mastite e observaram viabilidade celular maior (84%) no grupo de animais com mastite severa – animais que apresentavam CCS maior que 400.000 células/mL - do que nos animais hígidos (72,6%) - com CCS menor que 100.000 células/mL. Na pesquisa, porém, não foi avaliado o tipo de microrganismo isolado, tendo sido considerado apenas o valor da CCS para divisão dos grupos, diferindo do presente estudo, no qual a separação dos grupos foi de acordo com a presença de *Staphylococcus* spp. e sem isolamento bacteriano.

Boulaaba, Grabowski e Klein (2011) analisaram a quantidade de neutrófilos polimorfonucleares viáveis por citometria de fluxo em amostras de leite de 25 cabras e detectaram que a média da quantidade de neutrófilos polimorfonucleares viáveis em amostras com isolamento de SCN ($73,2 \pm 12,6\%$) foi maior do que nas amostras sem isolamento bacteriano ($65,4 \pm 13,6\%$). Nesse estudo, não foi verificada diferença entre as amostras de leite de SCN, SCP e sem isolamento bacteriano, mas, diferentemente da pesquisa de

Boulaaba, Grabowski e Klein (2011), avaliou-se a viabilidade celular com o total de células, não somente com os neutrófilos polimorfonucleares, bem como se utilizou técnica diferente. Ressalta-se também que, no presente estudo, apesar de não ter se observado diferença estatística, a mediana da viabilidade celular foi maior para SCP e SCN do que para as amostras sem isolamento bacteriano.

Não foi observada diferença na viabilidade celular associada com as espécies de estafilococos *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis* e amostras sem isolamento bacteriano, embora a mediana da viabilidade celular do *S. epidermidis* (86,71%) e *S. intermedius* (86,67%) tenha sido maior do que a do *S. lugdunensis* (85,26%) e amostras sem isolamento bacteriano (85,15%). Estes resultados coincidiram com os resultados obtidos pela CCS, na qual a mediana de *S. epidermidis* ($2.157 \times 10^3/\text{mL}$) e *S. intermedius* ($2.966 \times 10^3/\text{mL}$) também foram maiores do que *S. lugdunensis* ($1.608 \times 10^3/\text{mL}$) e amostras sem isolamento bacteriano ($996 \times 10^3/\text{mL}$).

Não foi encontrada diferença ao associar a viabilidade celular com os genes isolados *eno* e *bap* e associados *bap/eno* e *ebpS/eno/fib/fnbA*, entretanto as medianas apresentaram valores diferentes. Vale ressaltar que o valor da viabilidade celular, por ser em percentual, apresentou valores próximos, o que poder ter influenciado no resultado da análise estatística. Quando foram utilizados os resultados das células viáveis, que são números com grandeza maior, observou-se diferença estatística significativa entre os genes associados *bap/eno* e *ebpS/eno/fib/fnbA*, sendo que este apresentou quantidade maior de células viáveis do que aquele.

Esse fato também pode ter ocorrido com a tabela de SCN, SCP e amostras sem isolamento bacteriano, bem como com a das espécies de estafilococos (*S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis*) e amostras sem isolamento bacteriano, visto que, conforme já discutido anteriormente, as medianas apresentaram valores diferentes.

Assim, os resultados encontrados para as células viáveis foram coincidentes com os da CCS, concordando com os resultados já apresentados por outros autores, que a quantidade de células viáveis pode ser maior quando há um aumento no número de CCS na glândula mamária (BLAGITZ et al., 2011). A quantificação de células viáveis pode permitir a avaliação da saúde da glândula mamária, mas para isso, mais pesquisas devem ser realizadas.

A literatura é escassa sobre a associação da viabilidade celular com as espécies de estafilococos e os genes de virulência e, consequentemente, muitos dos mecanismos da interação do *Staphylococcus* spp. com as células do hospedeiro ainda permanecem desconhecidos e, portanto, mais estudos sobre a atuação dos genes de adesão e biofilme da

bactéria, bem como a relação entre esses genes e as respostas imunológicas do hospedeiro devem ser realizados.

Vale salientar que, na presente pesquisa, todas as cabras selecionadas para o experimento foram reagentes ao CMT, ou seja, apresentavam mastite subclínica de origem infecciosa ou não infecciosa ou tinham uma celularidade maior devido às características fisiológicas da espécie animal. Dessa forma, o grupo sem isolamento bacteriano pode ter incluído animais com mastite subclínica de origem não infecciosa e sem mastite subclínica, mas com maior celularidade e, mesmo diante desses fatos, foram encontrados valores de viabilidade celular diferente entre os dois grupos (cabras com e sem isolamento bacteriano). A partir da literatura consultada, há poucos registros de pesquisas sobre viabilidade celular em caprinos, portanto, mais estudos devem ser realizados, incluindo também animais não reagentes ao teste do CMT.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, foram obtidas as seguintes conclusões:

- *Staphylococcus* spp. foi o microrganismo mais isolado, com a predominância de estirpes coagulase negativa;
- Das espécies de estafilococos isoladas, predominaram: *S. epidermis*, *S. lugdunensis* e *S. intermedius*;
- As estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas nas amostras de leite apresentaram maior resistência para a penicilina, oxacilina e ampicilina;
- A maioria das estirpes apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados;
- O *S. epidermidis* apresentou maior resistência antimicrobiana para a amoxicilina e penicilina do que o *S. lugdunensis* e *S. intermedius*;
- Os genes que apresentaram maior ocorrência nas estirpes de *Staphylococcus* spp. foram *eno* e *bap*;
- Os genes *eno* e *bap* foram mais isolados nas estirpes de SCN e os genes *ebpS*, *fib* e *fnbA* nas estirpes SCP;
- Os *S. epidermidis* mostraram maior positividade para os genes *eno* e *bap*, os *S. lugdunensis* apresentaram maior quantidade de gene *bap* do que *eno* e os *S. intermedius* apresentaram uma menor positividade para o gene *bap* em relação aos demais genes;
- A CCS, viabilidade celular e células viáveis apresentaram nas amostras com isolamento de *Staphylococcus* spp. valores maiores em relação as sem isolamento bacteriano;
- Os *S. epidermidis* e *S. intermedius* apresentaram maior número de CCS e células viáveis em relação às amostras de leite que não tiveram isolamento bacteriano;
- A associação de genes *ebpS/eno/fib/fnbA* detectadas nas estirpes de *Staphylococcus* spp. apresentaram valores de CCS e células viáveis maior do que *bap/eno*;
- As células viáveis apresentaram resultados mais satisfatórios do que a viabilidade celular;
- Não houve associação entre os fatores de virulência das estirpes de *Staphylococcus* spp. e a viabilidade celular.

REFERÊNCIAS¹

ALMEIDA, L. M.; ALMEIDA, M. Z. P. R. B.; MENDONÇA, C. L.; MAMIZUKA, E. M. Comparative analyses of *agr* groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 493-498, 2013.

ATIQUE, T. S. C.; LIMA, T. A. M.; SOUZA, V. A.; PACHECO, P. F. C.; FURINI, A. A. C. Sensibilidade à metilicina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 3, 347-352, 2012.

BAGNICKA, E.; WINNICKAB, A.; JÓZWIK, A.; RZEWUSKA, M.; STRZAŁKOWSKA, N.; KOSCIUCZU, E.; PRUSAK, B.; KABA, J.; HORBANCZUK, J.; KRZYZEWSKI, J. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 100, p. 72– 77, 2011.

BASTOS, C. V.; VASCONCELOS, M. M. C.; RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F. Manutenção in vitro de células IDE8 em dois tipos de soro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 543-546, 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAUMERT, A.; BRUCKMAIER, R. M.; WELLNITZ, O. Cell population, viability, and some key immunomodulatory molecules in different milk somatic cell samples in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 76, p. 356-364, 2009.

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

BEZERRA, A. C. A.; FEIJÓ, F. M. C.; SILVA, J. S.; AVELINO, D. B. Relação entre o “California Mastitis Test” e os agentes microbianos de mastites em caprinos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 160-165, 2006.

¹ Segundo as Normas da ABNT NBR 6023.

BIASE, N. G.; FERREIRA, D. F. Comparações múltiplas e testes simultâneos para parâmetros binomiais de k populações independentes. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 27, p. 301-323, 2009.

BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; GOMES, V.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear leukocytes in goat milk with high and low somatic cell counts. **Small Ruminant Research**, v. 100, p. 67-71, 2011.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BOOTH, M. C.; PENCE L. M.; MARASRESHTI, P.; CALLEGAN, M. C.; GILMORE, M. S. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 345-352, 2001.

BOULAABA, A.; GRABOWSKI, N.; KLEIN, G. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. **Small Ruminant Research**, v. 97, p. 117-123, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra sob Instrução Normativa SDA nº 37 de 31 de outubro de 2000**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

BROUILLETE, E.; TALBOT, B. G.; MALOUIN, F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2292-2295, 2003.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, A.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v. 34, p. 521-562, 2003.

CARNEIRO, C. R. W.; POSTOL, E.; NOMIZO, R.; REIS, L. F. L.; BRENTANI, R. R. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 604-608, 2004.

CHU, CHISHIH; YU, CHANGYOU; LEE, YANHAUI; SU, YAOCHI. Genetically divergent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and sec-dependent mastitis of dairy goats in Taiwan. **BCM Veterinary Research**, v. 8, p. 39-50, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal**: approved standard M31-A3. 3. ed. v. 28, 2008.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, v. 79, p. 273-283, 2003.

CONTRERAS, A.; PAAPE, M. J.; MILLER, R. H. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. **Small Ruminant Research**, v. 31, p. 203-208, 1999.

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

CORDEIRO, P. R. C. **Mercado do leite de cabra e de seus derivados**. 2006. Disponível em: <http://www.caprileite.com.br/arquivos/_MercadodeLeitedeCabraedeseusDerivadosPauloCordeiro_pdf_30082012_163841.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2014.

COSTA, R. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; PEREIRA, R. A. G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 307-321, 2009.

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

COUTINHO, T. A.; IMADA, Y.; BARCELLOS, D. E. S. N.; OLIVEIRA, S. J.; MORENO, A. M. Genotyping of Brazilian *Erysipelothrix* spp. strains by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 27-32, 2011.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. *Bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2888-2896, 2001.

DEINHOFER, M.; PERNTHANER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis – related pathogens in goat milk. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 161-166, 1995.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; BIRGEL, E. H.; MORI, E.; KITAMURA, S. S.; MIRANDOLA, R. M. S.; ARAUJO, W. P. Isolamento de fagócitos viáveis do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) hígidas, sem elicitacão, criadas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 114-117, 2005.

EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 677-685, 2002.

ELASRI, M. O.; THOMAS, J. R.; SKINNER, R. A.; BLEVINS, J. S.; BEENKEN, K. E.; NELSON, C. L.; SMELTER, M. S. *Staphylococcus aureus* collagen adhesion contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. **Bone**, v. 30, p. 275-280, 2002.

EL-JAKEE, J. K.; AREF, N. E.; GOMAA, A.; EL-HARIRI, M. D.; GALAL, H. M.; OMAR, S. A.; SAMIR, A. Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: an environmental hazard. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, n. 2, p. 74-78, 2013.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H. **A caprinocultura leiteira no Brasil: uma visão histórica**. 2009. Disponível em: <http://www.caprileite.com.br/conteudo.php?id_conteudo=172&id_links=4&id_sub_links=26>. Acesso em: 13 jan. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO. FAOSTAT – **Countries by commodity**, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 2010, p. 11-42.

GONZALO, C.; LINAGE, B.; CARRIEDO, J. A.; FUENTE, L. F.; SAN PRIMITIVO, F. Evaluation of the overall accuracy of DeLavall cell counter for somatic cell counts in ovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4613-4619, 2006.

HAENLEIN, G. F. W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 163-178, 2002.

HÖÖK, M.; FOSTER, T. J. Staphylococcal surface proteins. In: FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P.; FERRETI, J. J.; PORTNOY, D. A.; ROOD, J. I. **Gram-positive pathogens**. Washington: ASM Press, 2000, p. 386-391.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Produção pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. v. 39, 63 p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF. **Milk**: enumeration of somatic cells - Part 2: guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Geneva: ISO and IDF, 2006. 13 p.

IKAWATY, R.; BROUWER, E. C.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. **International Journal of Dairy Science**, v. 5, p. 60–70, 2010.

JACOPINI, L. A.; MARTINS, E. N.; LOURENÇO, D. A. L.; DERÓIDE, C. A. S. Leite de cabra: características e qualidades. **Revista ACTA Tecnológica**, v. 6, n. 1, p. 168-180, 2011.

KLEIN, R. C.; FABRES-KLEIN, M. H.; BRITO, M. A. V. P.; FIETTO, L. G.; RIBON, A. O. B. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology**, v. 160, p. 183-188, 2012.

KLINE, K. A.; FALKER, S.; DAHLBERG, S.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell Host & Microbe**, v. 18, p. 580-592, 2009.

KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 225-232, 2008.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 551-588.

KOOP, G.; WERVEN, T.; TOFT, N.; NIELEN, M. Estimating test characteristics of somatic cell count to detect *Staphylococcus aureus* - infected dairy goats using latent class analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2902-2911, 2011.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; ANAND, S. K.; SINGH, R. S. Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, p. 31-38, 2011a.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; ANAND, S. K.; SINGH, R. S. Prevalence of adhesion and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 513-521, 2011b.

LAMMERS, A.; NUITJEN, P. J. M.; SMITH, H. E. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 103-109, 1999.

LAMMERS, A.; VAN VORSTENBOSCH, C. J.; ERKENS, J. H. F.; SMITH, H. E. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. **Veterinary Microbiology**, v. 80, p. 255-265, 2001.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2006.

LAS HERAS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. **Small Ruminant Research**, v. 32, p. 21-29, 1999.

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

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1719-1726, 2004.

LEITNER, G.; SAPEIRO, S.; KRIFUCKS, L.; WEISBLIT, L.; LAVI, Y.; HELLER, E. D. Systemic and local mammary gland immunity to udder infection in goats by various *Staphylococcus* species. **Small Ruminant Research**, v. 95, p. 160-167, 2011.

LENNETTE, E. M.; BALOWS, A.; HANSLER JR., W. J. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. 254 p.

LUCHEIS, S. B. A importância dos estafilococos coagulase negativos na mastite bovina subclínica e resistência antimicrobiana. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 22, 2011. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

LUENGO, C.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; FERNÁNDEZ, C.; CONTRERAS, A. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 169-174, 2004.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 278-282, 2008.

MADUREIRA, K. M.; GOMES, V.; CASTRO, R. S.; KITAMURA, S. S.; ARAÚJO, W. P. Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híidas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 311-316, 2010.

MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied dairy microbiology**. 2. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001. p. 38-41.

MCDUGALL, S.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; MURDOUGH, P. A.; SCRUTON, D. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 115-121, 2002.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4150-4162, 2004.

MERLE, R.; SCHRODER, A.; HAMANN, J. Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 174-179, 2007.

MORI, E.; MORI, C. M. C.; FERNANDES, W. R. Avaliação da função de macrófagos alveolares em cavalos clinicamente sadios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 1-7, 2001.

MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; RUFFO, G.; CARLI, S.; VARISCO, G.; BOETTCHER, P. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 1694-1704, 2005a.

MORONI, P.; PISONI, G.; RUFFO, G.; BOETTCHER, P. J. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cells counts in Italian dairy goats. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, p. 163-173, 2005b.

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

MURRAY, P. R.; BARON, E.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: Asm Press, 1999. p. 262-282.

NEVES, P. B.; MEDEIROS, E. S.; SÁ, V. V.; CAMBOIM, E. K. A.; GARINO JR, F.; MOTA, R. A.; AZEVEDO, S. S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 379-384, 2010.

PAAPE, M. J.; CAPUCO, A. V. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 556-565, 1997.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, 2002.

PAAPE, M. J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A.; MARCO, J. C.; CAPUCO, A. V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E237-E244, 2001. Suplemento E.

PAAPE, M. J.; WIGGANS, G. R.; BANNERMAN, D. D.; THOMAS, D. L.; SANDERS, A. H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R. H. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 114-125, 2007.

PALES, A. P.; SANTOS, K. J. G.; FIGUEIRAS, E. A.; MELO, C. S. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 2, p. 162-173, 2005.

PARK, Y. W.; GUO, M. Goat milk. In: PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. **Handbook of milk of non-bovine mammals**. Blackwell Publishing: Iowa, 2006. p. 11-121.

PARK, P. W.; ROSENBLOOM, J.; ABRAMS, W. R.; ROSENBLOOM, J.; MECHAM, R. P. Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 15803-15809, 1996.

PAULA, J. T.; RODRIGUES, J. B. L.; MESQUITA, E. P.; SOUZA, W. M. A.; COELHO, M. C. O. C. Qualidade do leite caprino: um desafio atual. **Medicina Veterinária**, v. 3, n. 4, p. 33-38, 2009.

PEIXOTO, R. M.; FRANÇA, C. A.; JÚNIOR, A. F. S.; VESCHI, J. L. A.; COSTA, M. M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 735-740, 2010.

PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 754-762, 2010.

PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 4, p. 501-510, 1999.

PIEPERS, S.; VLIEGHER, S.; DEMEYERE, K.; LAMBRECHT, B. N.; KRUIF, A.; MEYER, E.; OPSOMER, G. Technical note: flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 626-631, 2009.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 9, n. 1, p. 118-132, 2002.

PROIETTI, P. C.; COPPOLA, G.; BIETTA, A.; MARENZONI, M. L.; HYATT, D. R.; COLETTI, M.; PASSAMONTI, F. Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in Central Italy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 11, p. 1443-1448, 2010.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 513 p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine**. 10. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. p. 673-726.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PIRISI, A.; CRÉMOUX, R.; GONZALO, C. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 126-144, 2007.

RHEM, M. N.; LECH, E. M.; PATTI, J. M.; MCDEVITT, D.; HÖÖK, M.; JONES, D. B.; WILHELMUS, K. R. The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3776-3779, 2000.

SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; CHRISTOPH LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, p. 103-109, 2004.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971. 360 p.

SEO, Y. S.; LEE, D. Y.; RAYAMAHJI, N.; KANG, M. L.; YOO, H. S. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 433-438, 2008.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 110-124, 2010.

SILVA, E. R.; ARAÚJO, A. M.; ALVES, F. S. F. A.; PINHEIRO, R. R.; SAUKAS, T. N. Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 46-48, 2001.

SILVA, E. R.; DIAS, J. U.; BOECHAT, J. C. D. M.; FERREIRA, W. P. B.; SIQUEIRA, A. P.; SILVA, N. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 271-275, 2005.

SIMOJOKI, H.; HYVONEN, P.; FERRER, C. P.; TAPONEN, S.; PYORALA, S. Is the biofilm formation and smile production ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 344-352, 2012.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Goat medicine**. 2. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. p. 647-689.

SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; PENNA, C. F. A. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Somatic cell count in small ruminants: friend or foe? **Small Ruminant Research**, v. 107, p. 65-75, 2012.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D.; FONSECA, R. G.; SILVA, Y. A. Composition and bulk tank somatic cell counts of milk from dairy goat herds in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 19-24, 2009.

STOODLEY, P.; CARGO, R.; RUPP, C. J.; WILSON, S.; KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear induced deformation and detachment phenonema. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 361-367, 2002.

TIAN, S. Z.; CHANG, C. J.; CHIANG, C. C.; PEH, H. C.; HUANG, M. C.; LEE, J. W.; ZHAO X. Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 39-45, 2005.

TONIN, F. B.; NADER FILHO, A. Correlação entre o california mastitis test e o exame bacteriológico no leite de cabras. **Ars Veterinária**, v. 21, p. 155-159, 2005.

TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Use of Multiplex PCR To Identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4465–4467, 2003.

VAN OOSTVELDT, K.; VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; BURVENUCH, C. Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactation healthy cows. **Veterinary Research**, v. 32, p. 617-622, 2001.

VANCRAEYNEST, V.; HERMANS, K.; HAESBROUCK, F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. **Veterinary Microbiology**, v. 103, p. 241–247, 2004.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'JENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-493, 2009.

VIRDIS, S.; SCARANO, C.; COSSU, F.; SPANU, V.; SPANU, A.; SANTIS, E. P. L. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. **Veterinary Medicine International**, p. 1-6, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4061/2010/517060>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

WÄSTFELT, M. K. B.; FLOCK, J. Incidence of the highly conserved *fib* gene and expression of the fibrinogen-binding (Fib) protein among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, p. 2347-2352, 1995.

ZAFALON, L. F.; VERISSIMO, C. J.; MAMIZUKA, E. M.; MARTINS, K. B.; ALMEIDA, L. M.; VESCHI, J. L. A. Estafilococos resistentes à oxacilina isolados em casos de mastite subclínica em ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 1-7, 2012.

APÊNDICE – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE UTILIZADAS NO EXPERIMENTO

Fazenda A	Animal	Raça	CMT	CCS x 1000/mL	Isolamento bacteriano	Coagulase	Identificação bacteriana
	1	Saanen	2	1116	-	-	-
	2	Saanen	2	1970	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. cohnii ss cohnii</i>
	3	Saanen	3	3581	-	-	-
	4	Saanen	2	2703	-	-	-
	5	Saanen	3	3000	-	-	-
	6	Saanen	2	2578	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>
	7	Saanen	3	7851	-	-	-
	8	Saanen	4	6367	-	-	-
	9	Saanen	3	6584	-	-	-
	10	Saanen	3	6844	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>

Fazenda B	1	Saanen	3	998	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	2	Saanen	2	4218	-	-	-
	3	Saanen	2	434	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	4	Saanen	2	371	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	5	Saanen	3	5393	-	-	-
	6	Saanen	3	9999	-	-	-
	7	Saanen	2	635	-	-	-
	8	Saanen	3	213	-	-	-
	9	Saanen	2	835	-	-	-
	10	Saanen	2	551	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	11	Saanen	3	2538	-	-	-
	12	Saanen	4	3044	-	-	-
	13	Saanen	3	3100	-	-	-
	14	Saanen	2	1538	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. auricularis</i>
	15	Saanen	2	543	-	-	-
	16	Saanen	3	3273	-	-	-
	17	Saanen	3	4364	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. aureus</i>
	18	Saanen	2	2672	<i>Streptococcus</i> spp.	-	-
	19	Saanen	1	3150	-	-	-
	20	Saanen	2	1169	-	-	-
	21	Saanen	2	904	-	-	-
	22	Saanen	2	1371	-	-	-
	23	Saanen	1	268	-	-	-
	24	Saanen	2	732	-	-	-
	25	Saanen	2	1468	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	26	Saanen	3	1040	-	-	-
	27	Saanen	2	964	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	28	Saanen	3	6539	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	29	Saanen	2	839	-	-	-
	30	Saanen		394	-	-	-
	31	Saanen	2	5217	-	-	-
	32	Saanen	4	6662	-	-	-
	33	Saanen	4	5174	-	-	-
	34	Saanen	2	1111	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>

Fazenda B	Animal	Raça	CMT	CCS x 1000/mL	Isolamento bacteriano	Coagulase	Identificação bacteriana
	35	Saanen	1	520	-	-	-
	36	Saanen	1	647	-	-	-
	37	Saanen	1	618	-	-	-
	38	Saanen	2	2281	-	-	-
	39	Saanen	2	326	-	-	-
	40	Saanen	3	843	-	-	-
	41	Saanen	2	1754	-	-	-

Fazenda C	1	Pardo Alpina	2	811	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. saprophyticus</i>
	2	Pardo Alpina	2	428	<i>Streptococcus</i> spp.	-	-
	3	Saanen	2	1272	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. xylosus</i>
	4	Saanen	2	975	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. xylosus</i>
	5	Saanen	3	1995	<i>Streptococcus</i> spp.	-	-
	6	Saanen	3	1809	-	-	-
	7	Saanen	2	258	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	8	Saanen	3	1028	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. auricularis</i>
	9	Saanen	2	729	-	-	-
	10	Saanen	2	607	-	-	-
	11	Pardo Alpina	3	1687	-	-	-
	12	Pardo Alpina	3	1198	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. schleiferi</i>
	13	Saanen	2	349	-	-	-
	14	Pardo Alpina	1	996	-	-	-
	15	Pardo Alpina	1	1049	-	-	-
	16	Anglo Nubiana	2	559	-	-	-
	17	Anglo Nubiana	2	408	-	-	-
	18	Toggenburg	2	418	-	-	-
	19	Toggenburg	2	748	-	-	-
	20	Pardo Alpina	2	710	-	-	-
	21	Pardo Alpina	2	624	-	-	-
	22	Saanen	2	690	-	-	-
	23	Saanen	2	1199	-	-	-
	24	Saanen	2	1129	-	-	-
	25	Saanen	3	1043	-	-	-
	26	Pardo Alpina	2	559	-	-	-
	27	Pardo Alpina	2	514	-	-	-
	28	Pardo Alpina	4	2132	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. aureus</i>
	29	Pardo Alpina	2	277	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. haemolyticus</i>
	30	Pardo Alpina	3	3019	-	-	-
	31	Pardo Alpina	3	2416	-	-	-
	32	Saanen	2	303	-	-	-
	33	Saanen	2	311	-	-	-
	34	Saanen	2	501	-	-	-
	35	Saanen	1	447	-	-	-
	36	Saanen	3	548	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>
	37	Saanen	3	1171	-	-	-
	38	Saanen	2	383	-	-	-
	39	Saanen	2	729	-	-	-
	40	Saanen	4	5396	-	-	-

Fazenda C	Animal	Raça	CMT	CCS x 1000/mL	Isolamento bacteriano	Coagulase	Identificação bacteriana
	41	Saanen	4	4718	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	42	Saanen	3	1840	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. auricularis</i>
	43	Saanen	3	1198	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. auricularis</i>
	44	Saanen	2	458	-	-	-
	45	Saanen	2	463	-	-	-
	46	Toggenburg	4	6962	-	-	-
	47	Toggenburg	4	6176	-	-	-

Fazenda D	1	Saanen	2	779	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	2	Saanen	3	1008	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	3	Saanen	3	1374	-	-	-
	4	Saanen	3	975	-	-	-
	5	Saanen	3	887	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>
	6	Saanen	2	772	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>
	7	Saanen	4	7220	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	8	Saanen	3	1249	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	9	Saanen	3	1740	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	10	Saanen	4	7151	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	11	Saanen	2	2003	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	12	Saanen	2	2157	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	13	Saanen	3	2917	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	14	Saanen	3	7807	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	15	Saanen	2	5202	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. cohnii ss cohnii</i>
	16	Saanen	3	5012	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	17	Saanen	4	7350	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. aureus</i>
	18	Saanen	2	951	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	19	Saanen	4	8311	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	20	Saanen	2	5154	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. saprophyticus</i>
	21	Saanen	3	4817	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>
	22	Saanen	2	6192	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	23	Saanen	2	2291	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. warneri</i>
	24	Saanen	4	6861	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. saprophyticus</i>
	25	Saanen	3	2397	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. auricularis</i>
	26	Saanen	4	7891	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. auricularis</i>
	27	Saanen	4	4560	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. saprophyticus</i>
	28	Saanen	1	832	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>
	29	Saanen	1	1650	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	30	Saanen	3	2710	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	31	Saanen	1	993	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	32	Saanen	1	732	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>
	33	Saanen	3	6874	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>
	34	Saanen	1	8163	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	35	Saanen	4	7900	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	36	Saanen	4	1837	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	37	Saanen	4	6044	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	38	Saanen	2	2424	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	39	Saanen	4	3702	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>

Fazenda E	Animal	Raça	CMT	CCS x 1000/mL	Isolamento bacteriano	Coagulase	Identificação bacteriana
	1	Saanen	3	2636	-	-	-
	2	Saanen	3	8129	-	-	-
	3	Saanen	3	9999	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. xylosus</i>
	4	Saanen	1	1490	-	-	-
	5	Saanen	2	88	-	-	-
	6	Saanen	2	3952	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	7	Saanen	3	2405	-	-	-
	8	Saanen	2	1075	-	-	-
	9	Saanen	4	6271	-	-	-
	10	Saanen	3	3661	-	-	-
	11	Saanen	1	1054	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	12	Saanen	1	1445	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	13	Saanen	1	877	-	-	-
	14	Saanen	3	2426	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	15	Saanen	3	1467	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. aureus</i>
	16	Saanen	4	9999	-	-	-
	17	Saanen	4	453	-	-	-
	18	Saanen	4	207	-	-	-
	19	Saanen	4	5138	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	20	Saanen	4	9999	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	21	Saanen	2	464	-	-	-
	22	Saanen	4	9999	-	-	-
	23	Saanen	3	9999	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	24	Saanen	1	520	-	-	-
	25	Saanen	4	9999	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. auricularis</i>
	26	Saanen	3	1760	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	27	Saanen	4	5338	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	28	Saanen	4	4948	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
	29	Saanen	2	2313	-	-	-
	30	Saanen	4	1535	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	31	Saanen	4	5956	-	-	-
	32	Saanen	4	9999	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	33	Saanen	4	2492	-	-	-
	34	Saanen	2	332	-	-	-

Fazenda F	Animal	Raça	CMT	CCS x 1000/mL	Isolamento bacteriano	Coagulase	Identificação bacteriana
	1	Mestiça	3	6900	-	-	-
	2	Mestiça	3	2622	-	-	-
	3	Mestiça	3	1632	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	4	Mestiça	3	8746	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	5	Mestiça	3	2148	-	-	-
	6	Mestiça	2	2412	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	7	Mestiça	2	211	-	-	-

Fazenda G	Animal	Raça	CMT	CCS x 1000/mL	Isolamento bacteriano	Coagulase	Identificação bacteriana
	1	Saanen	3	3998	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. aureus</i>
	2	Saanen	3	2630	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	3	Saanen	3	230	-	-	-
	4	Saanen	3	204	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	5	Saanen	3	204	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	6	Saanen	3	369	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	7	Saanen	3	412	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. xylosus</i>
	8	Saanen	3	780	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	9	Saanen	3	475	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	10	Saanen	3	654	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	11	Saanen	3	916	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	12	Saanen	3	268	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	13	Saanen	3	768	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. cohnii ss cohnii</i>
	14	Saanen	3	171	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	15	Saanen	3	784	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	16	Saanen	3	352	-	-	-
	17	Saanen	3	3436	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	18	Saanen	3	1186	-	-	-
	19	Saanen	3	4250	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	20	Saanen	3	5755	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	21	Saanen	3	177	-	-	-
	22	Saanen	3	1262	-	-	-
	23	Saanen	3	1098	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	24	Saanen	3	594	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	25	Saanen	2	433	-	-	-
	26	Saanen	3	1965	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	27	Saanen	3	1740	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	28	Saanen	3	445	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>
	29	Saanen	3	781	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>
	30	Saanen	3	2966	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	31	Saanen	3	2476	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	32	Saanen	2	863	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	33	Saanen	2	361	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>
	34	Saanen	2	931	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>
	35	Saanen	3	1445	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	36	Saanen	2	1453	<i>Staphylococcus</i> spp.	positiva	<i>S. intermedius</i>
	37	Saanen	1	432	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	38	Saanen	3	759	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	39	Saanen	3	5748	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. chromogenes</i>
	40	Saanen	1	412	-	-	-
	41	Saanen	3	1608	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	42	Saanen	3	1767	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. lugdunensis</i>
	43	Saanen	3	2240	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. hominis ss hominis</i>
	44	Saanen	3	1056	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. epidermidis</i>
	45	Saanen	3	518	-	-	-
	46	Saanen	3	1565	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>
	47	Saanen	2	905	-	-	-
	48	Saanen	2	519	<i>Staphylococcus</i> spp.	negativa	<i>S. capitis ss capitis</i>