GRAZIELLA ULBRICHT BENVENGA

**Avaliação da expressão do gene *bap* como fator de virulência de
Staphylococcus spp. isolados de mastite bovina**

São Paulo

2019

GRAZIELLA ULBRICHT BENVENGA

**Avaliação da expressão do gene *bap* como fator de virulência de
Staphylococcus spp. isolados de mastite bovina**

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 a 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

De acordo:

Orientador

São Paulo

2019

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. 3748
FMVZ

Benvenga, Graziella Ulbricht
Avaliação da expressão do gene *bap* como fator de virulência de *Staphylococcus* spp.
isolados de mastite bovina / Graziella Ulbricht Benvenga. – 2019.
62 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2019.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Expressão. 2. Gene *bap*. 3. Virulência. 4. *Staphylococcus*. 5. Mastite. I. Título.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 24 de janeiro de 2019
CEUA N 8515270415

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Nilson Roberti Benites
Área: Laboratório De Bacteriologia E Micologia

Título da proposta: "Avaliação da expressão do gene BAP como fator de virulência de *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite bovina".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004254)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 17/dezembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitamos a mudança de Título para: Avaliação da expressão do gene BAP como fator de virulência de *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite bovina. Tal solicitação se deve ao fato, de que para depósito da tese de doutorado de uma das orientadas participantes desse projeto, é necessário que conste no Certificado CEUA o mesmo título que está na Tese."

Comentário da CEUA: "Foi solicitada apenas a alteração do título do estudo, portanto, consideramos aprovado."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BENVENGA, Graziella Ulbricht

Título: **Avaliação da expressão do gene *bap* como fator de virulência de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina**

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: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe **Marisa**, pelo apoio em todos os momentos, pelo amor incondicional, por ser minha amiga, tão especial e presente, sempre cheia de otimismo e alegria, a quem eu devo minha vida e meu amor verdadeiro.

Ao meu pai **Carlos**, por seu amor, apoio, compreensão, meu amigo e companheiro, exemplo de determinação que sempre tenta clarear meus caminhos, a quem devo muito do que sou e do que sei.

Aos meus irmãos **Daniel** e **Fabiane** pela amizade, amor, e apoio em todos os momentos, que sempre tornam minha vida muito mais completa e divertida.

À **Deus**, pela vida e saúde, pela força de nunca desistir durante as dificuldades, por permitir que eu tornasse esse sonho realidade e chegasse até aqui.

À todos os animais que passaram pela minha vida, e que me deram a honra de poder cuidar deles. A cada dia vocês me ensinam mais sobre a vida, amor verdadeiro, sinceridade e pureza de sentimentos. Em especial às minhas cachorrinhas **Babi**, **Belle** e **Mel**, por tornarem a minha passagem por esta vida muito mais feliz e completa.

Aos meus avós **Amélia** e **Giuseppe**, **Josefina** e **Orlando**, por todo amor e por me ensinarem desde pequena a amar e respeitar as pessoas, a natureza e os animais. Mesmo não estando mais aqui lembro-me sempre de vocês com muito carinho e saudades de tudo de bom que vivemos juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, pela confiança, apoio, carinho, paciência e valiosos conselhos e ensinamentos, que fizeram com que eu enxergasse a vida e a homeopatia de uma forma totalmente diferente.

À amiga Priscila Mellvile pelo carinho, acolhimento e ajuda,

À amiga Eveline Zuniga pelo carinho, e ajuda que nunca terei como agradecer.

Ao amigo e eterno professor, Celso Martins Pinto pelo carinho, atenção e por sempre acreditar em mim, me ajudando a chegar até aqui.

À minha amiga, Renata Savarino Levenhagen pela amizade sincera e pelo apoio em todos os momentos.

À minha prima Viviane Benvenga Gallo, pela amizade, carinho e apoio.

À querida amiga Tamara Lebedev Francischelli pela amizade, carinho e apoio, mesmo estando tão longe.

À querida amiga Bianca Munaro pela amizade, carinho e apoio.

À amiga Tatiana Otília dos Santos pela amizade, pelo apoio e por me aguentar nos momentos de estresse, fazendo até eles se tornarem divertidos.

À amiga Claudia Fullmann pela amizade, apoio e carinho em todos os momentos.

À minha querida tia Rosa Maria Benvenga, pelo amor, cuidado e apoio.

À amiga Patrícia Fillipsen pelo carinho e apoio.

Ao querido Danival do VPS de São Paulo, exemplo de educação e gentileza, pelo carinho apoio e ajuda em todos os momentos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro, Processo nº 140096/2017-5.

À todos os Professores do VPS por todo apoio e aprendizado.

Aos funcionários do VPS de São Paulo.

À todos os animais que tornaram este trabalho possível.

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente.

Henfil

RESUMO

BENVENGA, G.U. **Avaliação da expressão do gene *bap* como fator de virulência de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.** 2019. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A mastite bovina é inquestionavelmente, uma das patologias que causa maior impacto financeiro na cadeia produtiva do leite, através dos prejuízos gerados em suas diferentes etapas. As perdas se iniciam na propriedade, com o descarte precoce de animais, a diminuição de seu potencial produtivo e os onerosos tratamentos veterinários, e tem continuidade na indústria de beneficiamento, onde o leite tem seu rendimento e qualidade diminuídos, que faz com que em seu destino final, o consumidor tenha o mais importante de todos os prejuízos, os danos causados à sua saúde, pela ingestão de alimentos de baixa qualidade, com potencial de risco à saúde humana, devido à presença de microrganismos patogênicos e resíduos de antibióticos. As mastites podem ser causadas por diferentes tipos de microorganismos, sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus*, um dos mais comuns agentes etiológicos, também envolvidas em uma ampla variedade de doenças em humanos e animais e têm sua patogenicidade relacionada principalmente aos seus fatores de virulência, sendo motivo de preocupação para a saúde pública e animal. Entre os diversos fatores de virulência conhecidos, a produção de biofilme, tem grande importância, sendo uma das maneiras encontradas pelos microrganismos para dificultar o tratamento das infecções e driblar o sistema imune do hospedeiro. A formação do biofilme é mediada por vários genes, entre eles, o gene *bap* que codifica a proteína BAP, porém apenas a presença dos genes não garante que suas funções estão sendo executadas, sendo necessária a expressão destes, para que assim atuem como um fator de virulência e desempenhem seu importante papel no que tange a resistência bacteriana aos antibióticos. Face a importância deste assunto, os *Staphylococcus* devem ser amplamente estudados para compreender quais são as melhores formas de controle e tratamento das infecções por eles causadas e principalmente quais são os mecanismos e fatores de virulência envolvidos na sua resistência frente aos antimicrobianos, em humanos e em animais. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo detectar a expressão do gene *bap*, como fator de virulência, em

amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. Foram utilizadas 283 amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite bovina, previamente submetidas ao sequenciamento genético *rpob* e à detecção do gene *bap*, sendo positivas para ele. Para a avaliação da expressão do gene *bap* foram realizadas, a extração de DNA, o processo de obtenção do DNA complementar (cDNA), e a detecção da expressão, através de reação de PCR. Os resultados obtidos mostram que 35,7% das amostras expressaram o gene *bap*, enquanto que em 64,3% das amostras não houve a expressão do mesmo gene.

Palavras-chave: Expressão. Gene *bap*. Virulência. *Staphylococcus*. Mastite.

ABSTRACT

BENVENGA, G.U. **Evaluation of *bap* gene expression as a virulence factor of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis.** 2019. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bovine mastitis is unquestionably one of the pathologies that causes the highest financial impact on the milk production chain, through the losses generated in its different stages. Losses begin on the property, with the early disposal of animals, the reduction of their productive potential, and the expensive veterinary treatments, and it continues in the processing industry, where the milk has its yield and quality diminished, which causes that in its final destination, the consumer has the most important of all damages, the damages caused to his health, the ingestion of low quality food with potential risk to human health due to the presence of pathogenic microorganisms and antibiotic residues. Mastitis can be caused by different types of microorganisms, and bacteria of the genus *Staphylococcus*, one of the most common etiological agents, are also involved in a wide variety of diseases in humans and animals and have their pathogenicity mainly related to their virulence factors - cause of public and animal health concern. Among the several known virulence factors, biofilm production is of great importance, as it is one of the ways found by microorganisms to make it difficult to treat infections and to dribble the immune system of the host. The formation of the biofilm is mediated by several genes, including the *bap* gene encoding the BAP protein, but only the presence of the genes does not guarantee that their functions are being performed, and their expression is necessary to act as a factor of virulence and play important role in what tang expresses and bacterial resistance to antibiotics. In view of the importance of this subject, *Staphylococcus* should be extensively studied to understand the best way of controlling and treating the infections it causes, and especially the mechanisms and virulence factors involved in its resistance to antimicrobials in humans and in animals. Thus, the present study aimed to detect the expression of the *bap* gene as a virulence factor in samples of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. A total of 283 samples of *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis, previously submitted to genetic rpoB sequencing and to the detection of the *bap* gene were used, being positive for it. For the evaluation of the expression of the *bap* gene, the

extractions of DNA, the process of obtaining complementary DNA (cDNA), and the detection of the expression, through PCR reaction, were performed. The results obtained show that 35.7% of the samples expressed the *bap* gene, where as 64.3% showed no samples of the same gene.

Keywords: Expression. Gene *bap*. Virulence. *Staphylococcus*. Mastitis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Porcentagem de proteína dietética, derivada de alimentos de origem animal (leite, manteiga, ghee e queijos), em países desenvolvidos e em desenvolvimento, no período de 1961 a 2007. FAO, 2013.....5
- Figura 2- Porcentagem de proteína dietética, derivada de alimentos de origem animal (leite, manteiga, ghee e queijos) em diferentes regiões, no período de 1961 a 2007. FAO, 2013.....5
- Figura 3- Produção Mundial de Leite (em mil de toneladas) nos diferentes países, no período de 2015 a 2017.....9
- Figura 4- Eletroforese para a avaliação da expressão do gene *bap* em estirpes de *Staphylococcus* spp, em Gel de agarose 1%, corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies®), com visualização de banda de 971pb.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagem de valores absolutos de <i>Staphylococcus</i> isolados de 50 amostras de mastite clínica. 2018.....	39
Tabela 2- Porcentagem de valores absolutos de <i>Staphylococcus</i> isolados de amostras de mastite subclínica. 2018.....	41
Tabela 3- Porcentagem de valores absolutos de <i>Staphylococcus</i> isolados de amostras de mastite (clínica e subclínica), 2018.....	44
Tabela 4- Porcentagem de valores absolutos de <i>Staphylococcus</i> Coagulase positivos isolados de amostras de mastite, 2018.....	46
Tabela 5- Porcentagem de valores absolutos de <i>Staphylococcus</i> Coagulase negativos isolados de amostras de mastite, 2018.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de amostras de leite de animais com mastite clínica, 2018.....	40
Gráfico 2- Expressão do gene <i>bap</i> , nas diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> , isolados de amostras de leite de animais portadores de mastite clínica, 2018.....	40
Gráfico 3- Espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de amostras de leite de animais com mastite subclínica, 2018.....	42
Gráfico 4- Expressão do gene <i>bap</i> , nas diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> , isolados de amostras de leite de animais portadores de mastite subclínica, 2018.....	43
Gráfico 5- Porcentagem de valores absolutos de <i>Staphylococcus</i> isolados de amostras de mastite subclínica, 2018.....	45
Gráfico 6- <i>Staphylococcus</i> Coagulase positivos isolados de amostras de mastite, clínicas e subclínicas, 2018.....	46
Gráfico 7- <i>Staphylococcus</i> Coagulase negativos isolados de amostras de mastite, 2018.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E SIGLAS

BAP- proteína associada ao biofilme

bap – gene *bap*

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

FAO- Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação

WHO- World Health Organization

MSCRAMM- componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

TSST- toxina da síndrome do choque tóxico

PIA- polissacarídeos de adesão intercelular

IS- Sequência de inserção

AAP- Proteína associada à acumulação

ClfA- Fator aglutinante A

SSP1- Proteína de superfície estafilocócica

®- Marca registrada

%- Porcento

°C- Graus Celsius

Min- Minuto

Seg- Segundo

µl- Microlitro

µm- Micrometro

DNA- Ácido desoxirribonucleico

RNA- Ácido ribonucleico

cDNA- DNA complementar

EDTA- Ácido etileno-diamino-tetracético

TE- Tampão de eluição

PBS- Tampão fosfato salino

DNTP- Desoxirribonucleotideo trifosfato

MgCl₂- Cloreto de Magnésio

pb- Pares de bases

PCR- Reação em Cadeia pela polimerase

pH- Concentração hidrogeniônica

et al e colaboradores

CCS- Contagem de células somáticas

CMT- California Mastitis Test

S. agnetis- *Staphylococcus agnetis*

S. aureus- *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis- *Staphylococcus epidermidis*

S. equorum- *Staphylococcus equorum*

S. haemolyticus- *Staphylococcus haemolyticus*

S. hyicus- *Staphylococcus hyicus*

S. xylosus- *Staphylococcus xylosus*

S. chromogenes- *Staphylococcus chromogenes*

S. saprophyticus- *Staphylococcus saprophyticus*

S. sciuri- *Staphylococcus sciuri*

S. simulans- *Staphylococcus simulans*

Exp (+) %- Porcentagem de expressão positiva

Exp (-) %- Porcentagem de expressão negativa

ng- nanograma

DTT- Dithiothreitol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Leite	4
2.1.1 História do leite	6
2.1.2 Importância econômica	7
2.2 Mastites.....	9
2.2.1 Definição	9
2.2.2 Etiologia	10
2.2.3 Mastites Clínicas e Subclínicas.....	11
2.2.4 Patogenia.....	12
2.2.5 Importância em saúde pública	14
2.2.6 Importância econômica	15
2.2.7 Resíduos de antimicrobianos no leite	16
2.3 <i>Staphylococcus</i> spp	19
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.3.1.1 Importância do <i>Staphylococcus aureus</i> como causador de mastites.....	20
2.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos	21
2.3.1.2 Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp	23
2.3.2 Biofilmes	27
2.3.3 Proteína Bap e Gene <i>bap</i>	31
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Delineamento experimental.....	36
4.1.1 Amostras de <i>Staphylococcus</i> spp.....	36
4.1.2 Avaliação da expressão do gene <i>bap</i>	36
4.1.2.1. Extração de RNA	36
4.1.2.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA)	37
4.1.2.3 Detecção da Expressão Gênica.....	37
4.2 Análise Estatística.....	38
5 RESULTADOS	39

6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros dados da produção de leite no Brasil foram registrados pela FAO em 1961, quando o País produziu 5,2 milhões de toneladas (FAO, 2016). O crescimento da produção de leite no Brasil de 1961 a 1973, foi de 50%. No período de 1961 a 2015, o crescimento da produção foi linear, com acréscimo de 30 milhões de toneladas em 54 anos, sendo o ganho médio anual de 555 mil toneladas (VILELA et al., 2017). Estima-se que em 2025 serão produzidos pelo Brasil, 47,5 milhões de toneladas de leite (VILELA, 2015).

Entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, está o leite, considerado essencial no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (EMBRAPA, 2018).

O leite é um dos produtos mais versáteis da agroindústria de alimentos, pois além de consumido na forma original, pode ser transformado em derivados, que variam desde opções salgadas, como queijos e manteiga, até alimentos considerados sobremesas, como iogurte, leite condensado, leite fermentado e doce de leite, razão pela qual sua aplicação é constante e diversificada na agroindústria de alimentos, assim como na culinária industrial ou doméstica. Devido à sua versatilidade e às exigências do consumidor moderno, em 2017, foi gerado um faturamento de R\$ 70,2 bilhões para a indústria de laticínios no país, demonstrando um crescimento de 4% em relação ao ano anterior e colocando o setor atrás apenas do faturamento obtido com derivados da carne (EMBRAPA, 2018).

Estima-se que o consumo aparente *per capita* no Brasil em 2017 foi de 173 litros/habitante, volume que ainda se encontra abaixo de indicadores verificados em outros países desenvolvidos (na faixa de 250-300 litros), mas bem acima do total consumido há uma década, onde o consumo de lácteos aumentou 33% entre os anos de 2008 e 2017 (EMBRAPA, 2018).

A média da produção mundial de leite entre 2006 e 2009 foi de 723 milhões de toneladas, sendo que desse volume, 83% foram de leite de vaca, 12,8% de búfala, 2,4% de cabra, 1,4% de ovelha e de camela e 0,3% do total (FAO, 2013).

O leite é considerado uma das mais completas fontes de nutrientes para os seres humanos, por apresentar diversos componentes como proteínas, vitaminas e sais minerais, importantes na nutrição humana (PONTES NETO et al., 2005). Além

da indiscutível importância nutricional ainda existe a questão econômica que o envolve, já que é fonte de renda para os diferentes segmentos da cadeia produtiva do leite (RIBEIRO, 2008).

Segundo Pontes Neto et al. (2005), o leite é um alimento extremamente perecível, que pode ter suas características físico-químicas e microbiológicas, alteradas facilmente, tornando-se impróprio para consumo. Cabe lembrar que a qualidade do leite produzido, está diretamente relacionada às condições sanitárias dos animais do rebanho e ao manejo nutricional e de ordenha dos mesmos.

Nas últimas décadas é visível a preocupação da população com a qualidade e segurança dos produtos e subprodutos de origem animal consumidos. (COMERÓN e ANDREO, 2000). Neste panorama, o leite e seus derivados ocupam posição de destaque, despertando em seus consumidores questionamentos sobre a qualidade do leite consumido e até mesmo em relação às condições de produção e de bem-estar dos animais produtores e aumentando o interesse e o consumo de produtos e subprodutos de origem animal produzidos no sistema orgânico (RIBEIRO et al., 2009).

A mastite é considerada a principal patologia dos animais produtores de leite, devido à elevada frequência, prejuízos econômicos, diminuição da produção, do rendimento dos subprodutos lácteos na indústria e ainda pelo aspecto relacionado à saúde pública, já que o leite pode ser um importante veículo de microorganismos aos humanos, podendo causar infecções e toxinfecções (LANGONI, 2007). Quando comparada à infertilidade e à doenças reprodutivas, a mastite causa o dobro de perdas econômicas (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Blood & Radostits (1991), definem mastite como um processo inflamatório da glândula mamária que resulta na diminuição da qualidade e da quantidade do leite produzidos pelos animais portadores. Entre as mais importantes mudanças causadas no leite, estão a alteração de cor, a formação de coágulos e a presença de elevados níveis de leucócitos (BLOOD et al., 1979).

Mais de 140 diferentes tipos de microrganismos podem causar mastite (PHILPOT e NICKERSON, 2002). Embora exista uma ampla variedade de agentes infecciosos que possam ser isolados na glândula mamária, os estafilococos e estreptococos podem ser predominantes (ZAFALON, 2005). Sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus* um dos agentes etiológicos mais importantes da mastite, e

motivo de preocupação para os humanos e para a pecuária (CAPURRO et al., 2010).

O leite proveniente de vacas portadoras de mastite, pela contaminação bacteriana, pode tornar-se inadequado para o consumo humano, interferir no processo de fabricação de produtos lácteos e ainda disseminar doenças para seres humanos (BLOODY et al., 1979)

Oliver e Murinda (2012), relatam que os antibióticos são utilizados extensivamente visando combater doenças e aumentar a performance dos animais. A presença de resíduos desses medicamentos no leite interfere na fabricação de alguns produtos lácteos, e pode ocasionar reações alérgicas e resistência à antibioticoterapia em humanos (FONSECA e SANTOS, 2000). O que ocorre quando o período de carência, a dosagem e a via de administração destes antibióticos são desrespeitadas (PONTES NETTO et al., 2005).

O *Staphylococcus aureus* é um dos mais comuns patógenos causadores de mastite bovina subclínica por seus múltiplos fatores de virulência. Entre esses fatores de virulência, está a capacidade de produção de biofilme (CASTILHO et al., 2017). O biofilme é uma matriz exopolissacarídica que auxilia na adesão e colonização ao epitélio da glândula mamária e protege as bactérias do sistema imunológico do hospedeiro e ação antimicrobiana (Pereira et al., 2009).

Segundo Cucarella et al. (2001), para que a formação do biofilme ocorra é necessária a presença do gene *bap*, cuja presença em cepas de *Staphylococcus aureus* envolvidos em mastite subclínica, sugere que a *bap* pode melhorar a adesão intramamária e formação de biofilme, levando à ineficácia do tratamento com antibióticos contra bactérias do biofilme e à cronicidade da infecção.

Pesquisas sobre a capacidade dos *Staphylococcus* formarem biofilme e os mecanismos envolvidos em sua resistência frente aos antimicrobianos, em humanos e em animais, são extremamente necessárias, pois podem fornecer novos protocolos e perspectivas para o controle, prevenção e tratamento adequado da mastite bovina e conseqüentemente podem minimizar os prejuízos à cadeia produtiva de leite. Diante de tal fato, o presente estudo teve como objetivo a detecção da expressão do gene *bap*, como fator de virulência, em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite

O leite pode ser denominado como a secreção da glândula mamária, composta por três diferentes fases, uma de emulsão, onde verifica-se glóbulos de gordura emulsificados, a de dispersão coloidal, composta pelas micelas de caseína dispersas em forma coloidal, e ainda a fase de solução, representada por proteínas, lactose, vitaminas e sais orgânicos e inorgânicos, dissolvidos na água, também conhecida como fase contínua (ANTUNES, 2003). Os leucócitos no leite fazem parte da fase de solução ou suspendida (GONZALEZ et al., 2001).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), (2002), de acordo com a Instrução Normativa 51, sob a óptica legal, o leite é considerado como o produto obtido de ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, sendo o leite de outros animais denominado segundo a espécie de que proceda.

De acordo com Gonzales et al. (2001), o leite bovino é composto por vários nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores procedentes da alimentação e do metabolismo. A composição do leite pode ser variável de acordo com alguns fatores como a raça do animal, o estágio de lactação e também a nutrição do mesmo, tendo como valores médios aceitos, o teor de 4% de gordura, 3,5% de proteína, 4,8% de lactose, 0,7% de sais e o restante, aproximadamente 87% de água (ANTUNES, 2003).

A produção mundial de leite é quase inteiramente derivada de bovinos, búfalos, cabras, ovelhas e camelos, apesar da presença de outras espécies menos comuns, como os iaques, cavalos, renas e burros. A presença e importância de cada espécie varia significativamente entre regiões e países e os principais elementos que determinam as espécies de laticínios são a alimentação, a água e o clima. Outros fatores que podem influenciar a presença de uma espécie leiteira são a demanda de mercado, as tradições alimentares e as características socioeconômicas de cada domicílio (FAO, 2018b).

O leite de vaca é um alimento amplamente consumido pelas populações humanas de todo o mundo há milhares de anos (BENEVIDES e VEIGA, 2014).

Apresentando grande valor econômico e um inestimável valor como alimento na nutrição humana, cuja obtenção, industrialização e comercialização envolve uma sistemática que tem como objetivo fornecer ao consumidor um produto dentro dos melhores padrões físicos, químicos, celulares e microbiológicos (FERREIRO et al., 1980).

Figura 1- Porcentagem de proteína dietética, derivada de alimentos de origem animal (leite, manteiga, ghee e queijos), em países desenvolvidos e em desenvolvimento, no período de 1961 a 2007. FAO, 2013.

Fonte: FAOSTAT (2011).

Figura 2- Porcentagem de proteína dietética, derivada de alimentos de origem animal (leite, manteiga, ghee e queijos) em diferentes regiões, no período de 1961 a 2007. FAO, 2013.

Fonte: FAOSTAT (2011).

2.1.1 História do leite

O termo “leite” provavelmente deriva de “mirjati” que significa “ele acaricia” ou “ele esfrega”, identificando a ação de tirar leite, ou da palavra teutônica *melki* ou *melkan* cujo significado é “ordenhar” (BALLARINI, 1994).

A origem do leite, pode ser encontrada há centenas de milhões de anos e representa talvez, uma das mais importantes oportunidades que permitiram aos mamíferos a sobrevivência à catástrofe ecológica que eliminou os dinossauros e permitiu a presença dos humanos no planeta Terra. (BALLARINI, 1994).

Segundo Mazoyer e Roudart (2010), há aproximadamente 12.000 anos antes desta era, houve o início de desenvolvimento de um novo processo de fabricação de instrumentos, o polimento da pedra. Essa novidade inaugura o último período da Pré-história, o neolítico, que se prolongará até o aparecimento da escrita e da metalurgia. Época marcada por algumas inovações revolucionárias, como a construção de moradias duráveis, a cerâmica de argila cozida e os primeiros desenvolvimentos da agricultura e da criação.

Cerca de 10.000 e 5.000 anos antes desta era, algumas sociedades neolíticas tinham, efetivamente, começado a semear plantas e manter animais em cativeiro, com vistas a multiplicá-los e utilizar-se de seus produtos. Na mesma época, porém após algum tempo, tais plantas e animais especialmente selecionados e explorados foram domesticados e, dessa forma, essas sociedades de predadores aos poucos, se transformaram por si mesmas, em sociedades de cultivadores (MAZOYER e ROUDART, 2010).

Considera-se que o homem, ou provavelmente a mulher, tenha começado a domesticar animais leiteiros entre os anos de 8.000 e 5.000 a.C., embora os testemunhos mais antigos dessas primeiras tentativas datam de 3.100 a.C. e possam ser encontrados nas peças achadas nas escavações de Tell Ubaid, no “Friso dos ordenhadores”, que se encontra atualmente em Bagdá. Esse friso possui uma cena, representada por um homem sentado enquanto ordenha, outra cena com dois homens vestidos com peles de ovelhas, que vertem leites em recipientes, depois de tê-lo filtrado por um prato com furos, e ainda uma terceira cena sucessiva em que outros homens recolhem em jarras o leite filtrado (BALLARINI, 1994).

O uso do leite de mamíferos na alimentação humana parece retroceder aos primórdios da humanidade, mais precisamente, no período mesolítico, há cerca de dez mil anos, quando houve o surgimento das primeiras comunidades não nômades, do domínio do fogo, do cultivo da terra e ainda da domesticação de animais. Há registros na história do uso de leite de animais de outras espécies. Além do uso do leite de vaca, a história registra o uso do leite de jumentas, camelas, cabras, ovelhas, éguas, renas, lhamas, iaques e búfalas (CASCUDO, (2004); RIVERO, (2007)).

Por volta do ano mil d.C., o leite, principalmente o de origem bovina, ainda era considerado um produto secundário da agricultura e utilizado, principalmente para consumo das famílias, sendo o excedente utilizado para a fabricação, geralmente doméstica de manteiga e queijo. No começo desse milênio, sobretudo por obra dos monges, na Planície Padana, muitos bosques e terrenos incultos transformaram em terrenos cultivados com cereais, onde os trabalhos para a lavoura eram feitos utilizando o gado. Os partos eram programados para o começo da primavera e em meados da primavera e, durante o verão, as vacas e os vitelos eram levados às pastagens alpinas e pré-alpinas, onde se começava a desmama dos bezerros e a recuperação do leite, que era transformado em manteiga e principalmente em queijo (BALLARINI, 1994).

A fermentação é uma forma de prolongar a conservação do leite, tal procedimento foi inventado há aproximadamente dez mil anos atrás, pouco tempo depois da domesticação de cabras e ovelhas na área do Crescente Fértil, devido às condições favoráveis, como o clima quente que favorece alguns tipos de fermentação, a utilização de recipientes para armazenar o leite feitos à partir de peles, principalmente de estômagos que possuíam em seu interior bactérias lácticas e ainda à facilidade de transporte do leite azedo entre as pastagens e os vilarejos e cidades próximas (BALLARINI, 1994).

2.1.2 Importância econômica

A cadeia produtiva do leite é considerada uma das mais complexas e representativas do agronegócio brasileiro devido ao importante papel que representa, principalmente no suprimento de alimentos e na geração de emprego e

renda. Tal fato faz com que o segmento lácteo brasileiro tenha grande importância no desenvolvimento socioeconômico do País (CARVALHO, 2011).

Em 2016, o leite, foi o sexto colocado entre os produtos agropecuários nacionais, deixando o faturamento da indústria de laticínios com cerca de R\$ 67,5 bilhões, sendo apenas ultrapassado pelo setor de derivados de carne e de beneficiados de café, chá e cereais (ABIA, 2017).

A partir da década de 1990, com o fim do tabelamento dos preços do leite, esta atividade apresentou desenvolvimento tecnológico mais acentuado, onde anteriormente, a produção nacional era originada de fazendas com modelos extensivos de exploração, que apresentavam como principais características, a baixa produtividade, principalmente da terra e da mão de obra. O período que sucedeu a liberação de preços, teve como característica a modernização da atividade e o aumento substancial da oferta nacional de leite, tornando possível a consolidação do Brasil entre os quatro maiores produtores de lácteos do mundo (ROCHA et al., 2018).

Segundo a FAO (2016), aproximadamente 150 milhões de lares em todo o mundo estão envolvidos na produção leiteira, sendo característica da maioria dos países em desenvolvimento a produção a partir de pequenos agricultores, pois fornece retorno rápido aos produtores de pequena escala.

Segundo dados da FAO (2018b), no ano de 2017 a produção mundial de leite atingiu 811 milhões de toneladas 1,4 por cento maior do que em 2016. No mesmo período, o leite teve sua produção expandida na Ásia, nas Américas e na Europa, estagnada na África e declinou na Oceania.

Na América do Sul, em 2017, a produção de leite aumentou 2,7%, em relação à 2016, sendo que a maioria dos principais produtores de leite de países como Brasil, Colômbia e Peru, relataram um maior volume de leite consumido. No Brasil, a responsabilidade pelo acréscimo no volume de leite produzido, deve-se ao aumento de produtividade do leite, enquanto que o rebanho leiteiro teve sua população estabilizada em cerca de 40 milhões de animais (FAO, 2018b).

Figura 3- Produção Mundial de Leite (em mil toneladas) nos diferentes países, no período de 2015 a 2017.

PRODUCTION: TOTAL MILK				
<i>thousand tonnes</i>				
	2015	2016	2017	Change 2017 over 2016 (%)
			<i>prelim.</i>	
World	801 316	799 097	810 652	1.4
India ¹	155 693	159 396	165 612	3.9
EU	162 900	163 000	165 400	1.5
United States	94 619	96 343	97 735	1.4
China	42 666	41 952	41 289	-1.6
Pakistan	41 592	39 652	40 167	1.3
Brazil	34 860	33 878	35 233	4.0
Russian Fed.	30 791	30 752	30 990	0.8
New Zealand ²	21 909	21 568	21 341	-1.1

1/ Dairy years starting April of the year stated (production only).

2/ Dairy years ending May of the year stated (production only).

Fonte: FAO (2018b).

2.2 Mastites

2.2.1 Definição

A palavra mastite deriva-se da palavra grega *mastos*, que significa “mama” e *itis*, que significa “inflamação de”, sendo, portanto, definida como a inflamação da glândula mamária. Tal inflamação pode ter diversas causas, como trauma ou lesão do úbere, irritação química e principalmente pela infecção por microrganismos, em especial as bactérias (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

O termo mastite refere-se à inflamação da glândula mamária, que independente da causa é caracterizada por alterações físicas, químicas e usualmente bacteriológicas no leite e alterações patológicas no tecido glandular. No leite, as principais alterações causadas pela mastite são a descoloração, presença de coágulos e de grande quantidade de leucócitos (BLOODY et al., 1979).

Apesar da mastite ocorrer esporadicamente em todas as espécies, assume maior importância econômica no gado leiteiro, e em relação às perdas econômicas,

é sem dúvida a mais importante doença contra qual a indústria leiteira tem que lutar (BLOODY et al., 1979).

2.2.2 Etiologia

Segundo Junqueira e Langoni (2016) a mastite bovina está associada à infecções bacterianas em 90% dos casos, tendo descrição em literatura de 137 espécies de microrganismos de 35 diferentes gêneros causadores.

De acordo com Blowey e Edmonson (2010), os microrganismos causadores de mastite podem ser divididos em ambientais e contagiosos. Os patógenos ambientais encontram-se principalmente no ambiente em que os animais produtores de leite vivem, e de maneira oportunista invadem a glândulas desses animais, causando resposta inflamatória imediata, o que pode causar um aumento no potencial de ocorrência de casos de mastite clínica (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Os microrganismos de origem ambiental podem ser classificados em três grupos, os coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.), os estreptococos ambientais (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus disgalactiae*, são os mais relevantes) e os enterococos (*Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*) (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Segundo Bradley (2002), os patógenos contagiosos da mastite, podem ser considerados microrganismos adaptados ao hospedeiro, pois podem sobreviver e multiplicarem-se na glândula mamária. A transmissão geralmente acontece de animal para animal ou de um teto com ferimento para uma vaca sadia, através das mãos dos ordenadores ou por equipamentos de ordenha e de uso comum. Segundo Watts (1998), os principais patógenos causadores de mastite infecciosa são, o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae*, classificados como patógenos primários e o *Corynebacterium* spp. e determinadas espécies de estafilococos coagulase negativos, que são classificados como patógenos secundários.

Segundo Costa (1998), a mastite infecciosa é considerada a mais importante devido a seu caráter não auto limitante, podendo evoluir eventualmente para um quadro de septicemia.

2.2.3 Mastites Clínicas e Subclínicas

A reação inflamatória é um mecanismo de defesa que o organismo do animal desenvolve para eliminar o microrganismo patogênico, neutralizar as toxinas dos mesmos e auxiliar os tecidos secretores de leite em sua recuperação para que estes consigam voltar a sua função. O grau de inflamação depende da reação inflamatória contra o agente infeccioso, podendo ter característica clínica ou subclínica (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Segundo Benites (2006), a mastite pode ser classificada em clínica quando apresenta alterações visíveis da composição e aspecto físico do leite, tais como a presença de grumos de fibrina ou pus, que podem ser detectadas através da prova de Tamis ou caneca telada ou “*strip cup*”, podendo ocorrer também variações de tamanho, consistência e temperatura da glândula mamária. As mastites podem ainda ser classificadas ainda como subclínicas, quando não há alterações macroscópicas da glândula mamária e do leite produzido e também, quando o processo inflamatório for diagnosticado pela quantidade de células somáticas presentes no leite através de provas diretas ou indiretas.

As mastites podem se apresentar sob a forma clínica ou subclínica. A mastite clínica pode ser caracterizada pelo aparecimento de edemas, aumento de temperatura e vermelhidão local, consistência enrijecida da glândula mamária e dor. No leite são verificadas algumas alterações, como o aparecimento de grumos, de pus ou quaisquer alterações das características do leite. Esse tipo de mastite, causa prejuízos importantes por descarte do leite, gastos com tratamento, perda funcional de glândulas e até mesmo pela morte do animal (FONSECA e SANTOS, 2001). A síndrome clínica, é variável, ocorrendo de uma inflamação intensa à uma fibrose, desenvolvida de maneira tão gradual que passa despercebida à observação, até que a maior parte do tecido secretor seja destruída (BLOODY et al., 1979).

Segundo Costa (1998), a mastite clínica é caracterizada por alterações visíveis da glândula e/ou do leite, podendo ser aguda, com sintomatologia evidente de processo inflamatório (edema, dor, calor, rubor) com ou sem alterações da característica de leite. Na mastite crônica observa-se fibrosamento, ausência dos sinais de processo inflamatório e alterações no leite, grumos e coágulos.

Com sintomatologia não tão evidente, a mastite subclínica é caracterizada pela diminuição da produção leiteira, sem que se observem sinais de processo inflamatório ou fibrosamento. Estes diferentes tipos de manifestações clínicas estão na dependência da interação de fatores ligados ao hospedeiro, a vaca leiteira e ao microrganismo (COSTA, 1998).

Segundo Ruegg (2012), a mastite crônica é resultado de uma infecção persistente, de longa duração, onde o animal apresenta episódios clínicos intermitentes e repentinos.

2.2.4 Patogenia

Segundo Costa (1998), o estabelecimento dos microrganismos na glândula mamária e conseqüentemente o desencadeamento do processo inflamatório apresenta uma sequência de eventos, formada por penetração, instalação e multiplicação que por sua vez, depende de vários fatores, entre eles, os ligados ao microrganismo, ao hospedeiro e ao meio ambiente.

Levando em consideração as questões ligadas aos microrganismos, estão os fatores de virulência, e entre eles, se destaca o fato de se multiplicarem bem no leite, que indica o uso de lactose como fonte de carbono e/ou capacidade proteolítica, o que garante uma suplementação adequada de nitrogênio através da hidrólise de caseína. Existe também a habilidade de adesão ao epitélio, que possibilita a não eliminação dos microrganismos pelos jatos de leite, que facilita a colonização. Existem outros fatores de virulência que têm sua importância ajudando o estabelecimento da infecção, como por exemplo, a presença de cápsula para dificultar a fagocitose, a presença de sideróforos na superfície das *Echerichia coli* para quelar o ferro necessário para o seu metabolismo, e portanto permitindo a sua competição com mecanismos de defesa inespecífica do hospedeiro, a lactoferrina (COSTA, 1998).

Em relação às condições ligadas ao hospedeiro, tem sua importância os mecanismos de defesa, entre os quais se encontram os fatores que impedem a penetração dos microrganismos, que estão principalmente situados no teto, e os fatores que impedem sua instalação. Tais fatores, estão diretamente relacionados à idade, às características do úbere, como tamanho, forma e tamanho dos tetos e tonicidade dos ligamentos, à integridade e perfeita oclusão do canal do teto, e ainda,

à sanidade e ao estado nutricional do animal. Cabe ressaltar que a principal porta de entrada de patógenos é o orifício do teto (COSTA, 1998).

Segundo Costa (1998), entre os fatores ligados ao ambiente, estão as condições ambientais, a nutrição e funcionamento inadequado da ordenhadeira mecânica influenciam o desempenho dos mecanismos naturais de defesa. O estresse térmico compromete a resposta imune e deficiências em alguns minerais e vitaminas, na alimentação, comprometem o desempenho da resposta imune.

Segundo Philpot e Nickerson (2002), a infecção intramamária ocorre quando as bactérias atravessam o canal do teto e se multiplicam dentro do quarto afetado. Os microrganismos podem penetrar no teto de diversas maneiras: entre as ordenhas, quando passam através do canal do teto, através do movimento físico resultante da pressão exercida na extremidade do teto, à medida que a vaca se movimenta, durante a ordenha mecânica, quando os microrganismos podem ser empurrados para o canal do teto, para dentro deste ou para dentro da cisterna, através de impactos provocados por flutuações de vácuo contra o orifício do teto, e ainda podem ser empurrados fisicamente através do canal do teto, durante a inserção de uma cânula com antibiótico para tratamento intramamário.

A habilidade das bactérias em aderir aos tecidos que revestem o interior da glândula mamária, pode afetar as chances de permanência dentro do quarto afetado, tal situação torna-se importante principalmente quando o úbere é periodicamente lavado na hora da ordenha. Estudos demonstram que bactérias como o *Streptococcus agalactiae* e o *Staphylococcus aureus* conseguem aderir bem aos tecidos que revestem o teto e as cisternas da glândula, enquanto que outros, como a *Escherichia coli*, não aderem tão bem, porém multiplicam-se rapidamente nos quartos com baixa contagem de células somáticas (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

A interação entre as bactérias e os leucócitos (células somáticas), também afeta o estabelecimento da infecção, sendo uma das funções dessas células fagocitar e matar bactérias. Se os microrganismos infectantes forem eliminados a infecção é eliminada, porém se qualquer bactéria sobreviver no quarto infectado, uma inflamação crônica com elevada Contagem de Células Somáticas pode persistir durante meses ou anos (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Inicialmente as bactérias afetam os tecidos que revestem os tetos, as cisternas da glândula e os grandes canais, na etapa seguinte os microrganismos entram nos ductos menores e nas áreas produtoras de leite da parte mais baixa da glândula afetada, alcançando assim os alvéolos (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Segundo Raimondo (2006), que em seu estudo avaliou as características físico-químicas e celulares do leite de fêmeas bovinas da raça Jersey no primeiro mês de lactação, as reações orgânicas frente às infecções bacterianas da glândula mamária, possuem uma dinâmica, indiretamente associada à fase de lactação em que a vaca se encontra, onde as reações são pouco intensas tanto na fase colostrar quanto durante todo o primeiro mês de lactação.

Segundo Philpot e Nickerson (2002), as bactérias causam danos pela produção de toxinas que levam à inflamação e à morte das células secretoras de leite, o que provoca a liberação de substâncias que dão início à resposta inflamatória, atraindo leucócitos para a área afetada para que os mesmos possam destruir as bactérias infectantes. Além dos leucócitos, fluidos e fatores coagulantes também chegam à área afetada com a finalidade de diluir as toxinas bacterianas e reparar o tecido lesado, provocando inflamação local.

Segundo Philpot e Nickerson (2002), após fazerem a migração através dos vasos sanguíneos e passarem para a área afetada pelas bactérias através dos tecidos de secreção de leite, os leucócitos, se acumulam ao redor dos alvéolos, ductos e cisternas, antes de chegarem até o leite. Alguns leucócitos se movem, penetrando por entre as células secretoras de leite intactas, e podem durante esta migração, produzir enzimas que destroem ou reduzem a capacidade das células secretoras de sintetizarem o leite, tal fato é a justificativa da diminuição da produção de leite que ocorre durante a mastite.

2.2.5 Importância em saúde pública

Segundo Langoni et al. (2015), a mastite é a principal afecção do gado destinado à produção leiteira, que causa um impacto significativo à cadeia produtiva do leite, com reflexos ainda para a saúde pública. A veiculação de microrganismos causadores de zoonoses, através do leite de animais com mastite, pode representar um risco potencial a saúde do consumidor (DOMINGUES et al., 2001).

O leite proveniente de vacas portadoras de mastite, pela contaminação bacteriana, pode tornar-se inadequado para o consumo humano, interferir no processo de fabricação de produtos lácteos e ainda disseminar doenças para seres humanos (BLOODY et al., 1979).

Segundo Costa (1998), a mastite infecciosa apresenta baixa porcentagem de cura espontânea, além de representar um potencial risco a saúde do consumidor por veicular agentes etiológicos de zoonoses.

Segundo Pontes Netto et al. (2005), muitos medicamentos são utilizados no gado leiteiro com o objetivo profilático, na tentativa de evitar a mastite, tais como antimicrobianos, antiparasitários e anti-inflamatórios não esteroidais. Quando o período de carência, a dosagem e a via de administração dos antimicrobianos são desrespeitados, ocorre a presença de resíduos destes, indesejáveis nos alimentos de origem animal e que acarretam risco à saúde humana.

Como alternativa ao tratamento convencional, e definitivamente representando nenhum risco à saúde humana, seja por resíduos no leite ou pelo desenvolvimento de cepas resistentes, pode-se utilizar o medicamento homeopático, tanto em mastites clínicas quanto em subclínicas, utilizando como parâmetros as contagens de células somáticas, os exames microbiológicos e a produção de leite (BENITES, 2006).

2.2.6 Importância econômica

Uma vaca com mastite tem sua produção leiteira prejudicada tanto em quantidade quanto em qualidade. Observa-se uma diminuição no teor de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo e um aumento de imunoglobulinas, cloretos e lipase, que caracteriza o sabor ranço. O leite torna-se inadequado para o consumo e para produção de seus derivados, podendo ser rejeitado na plataforma de usina (COSTA, 1998).

Segundo Philpot e Nickerson (2002), a mastite é considerada a doença que evolve os maiores custos nos rebanhos leiteiros, sendo suas perdas calculadas em duas vezes maiores que às causadas pela infertilidade e doenças reprodutivas. Tais perdas são notadas pelos produtores através da ocorrência de casos clínicos, descarte de animais, custos com tratamentos veterinários e ainda pela mais

importante de todas, que é a diminuição da produção de leite, provocadas pelas mastites subclínicas.

As mastites são consideradas um dos maiores entraves à exploração leiteira, devido as perdas econômicas provocadas pela redução da produção de leite, as alterações dos principais componentes do leite, e ainda pela diminuição da vida produtiva dos animais, em decorrência do comprometimento dos quartos mamários afetados (DOMINGOS et al., 2001).

A produção de quantidades máximas de leite de alta qualidade é um importante objetivo para todo produtor de leite. Um leite de alta qualidade apresenta um sabor melhor, é mais nutritivo e possui maior tempo de prateleira, ou seja, maior prazo de validade. Em contrapartida, um leite com qualidade reduzida afeta todos os segmentos da indústria leiteira, resultando por fim em um leite com propriedades de fabricação reduzidas e produtos lácteos com curto prazo de validade, sendo à mastite, o fator mais importante a se considerar quando se trata de qualidade reduzida do leite (OLIVER e MURINDA, 2012).

2.2.7 Resíduos de antibióticos no leite

Segundo Fonseca e Santos (2000), a presença de resíduos de antibióticos no leite interfere na fabricação de alguns produtos lácteos e pode ocasionar no homem reações alérgicas, além de resistência à antibioticoterapia.

A avaliação da exposição da população a resíduos de antibióticos é de vital importância para nortear as ações de controle sanitário visando à proteção do consumidor. (MORAIS et al., 2010).

Muitos tipos de medicamentos veterinários são utilizados para o tratamento várias doenças que ocorrem em animais produtores de alimentos, entre eles os antibióticos e os endoparasitocidas e ectoparasitocidas. Para o leite, os medicamentos de maior importância são os antimicrobianos, devido à grande quantidade de tratamento local realizado, ou seja, feito através de infusões intramamárias. A maioria dos antimicrobianos utilizados com frequência para vacas leiteiras, são antibióticos para controlar a mastite e as rickettsioses (FAO, 2013).

A FAO e a WHO (2009) definem mundialmente os princípios e orientações gerais para os governos, sobre a concepção e implementação de políticas nacionais

e ainda, sobre programas de garantia de segurança alimentar, em relação aos resíduos de medicamentos veterinários e sobre a melhor utilização de medicamentos veterinários pelos produtores e processadores de alimentos.

Existem valores estabelecidos como limites máximos admissíveis para resíduos de antibióticos em alimentos, que tem como finalidade assegurar o uso prudente de antimicrobianos e salvaguardar a saúde pública. Resíduos de antimicrobianos no leite em quantidade excessiva, podem também afetar sua industrialização, pois podem inibir parcial ou completamente a produção de ácido, por culturas iniciadoras em iogurte, e comprometer o tempo de cura, a maturação adequada do queijo, o sabor resultante e ainda causar defeitos de textura do mesmo (FAO, 2013).

Cada preparação antimicrobiana registrada tem um tempo de retirada recomendado antes da ordenha, que deve ser respeitado para evitar níveis excessivos de resíduos no leite (FISCHER et al., 2003). A presença de resíduos de medicamentos no leite pode ser minimizada pela adesão à cuidados veterinários adequados e boas práticas de produção (FAO, 2013).

Segundo Zwald et al. (2004) uma das razões de mais citadas, quando se encontram resíduos de medicamentos em níveis acima dos tolerados, em leite comercializado em países temperados, é o não cumprimento dos períodos de carência. Entretanto, segundo dados da FAO (2013) existem outras razões importantes pelas quais os resíduos são verificados em níveis excessivos, entre elas a forma incorreta de administração e dosagem, uso de antimicrobianos não registrados para vacas leiteiras e uso incorreto sem levar em consideração fase da lactação em que os animais se encontram.

Segundo FAO e WHO (2011), os antimicrobianos desempenham um papel crítico na prevenção de doenças, contribuindo para a saúde animal e humana. No entanto, o uso indevido ou inadequado destes para o tratamento e prevenção de doenças em animais produtores de alimentos pode levar à disseminação de microrganismos resistentes a estes medicamentos, levando a uma redução de sua eficácia no tratamento de doenças em humanos e animais.

O risco da resistência à antimicrobianos parece ser maior nos países que não possuem ou possuem de forma ineficiente, políticas nacionais de sistemas regulatórios, de vigilância e de monitoramento de uso de drogas antimicrobianas e

de resistência a eles. Para resolver esta questão a nível mundial, a Comissão do *Codex Alimentarius* adotou diretrizes para a análise de risco de resistência antimicrobiana (FAO e WHO, 2011) e um código de conduta para tentar diminuir e conter esta resistência (FAO e WHO, 2005).

De acordo com FAO (2013), a resistência aos antimicrobianos não é uma grande preocupação em regiões onde leite é rotineiramente pasteurizado ou recebe processamento equivalente, pois tais processos inativam as bactérias. Entretanto pode ser preocupante em algumas situações, quando a pasteurização não é obrigatória em alguns locais ou é obrigatória apenas para leite de vaca, e não para leite de outras espécies, quando ocorre contaminação pós-pasteurização, quando os produtos lácteos são feitos de leite ou creme não pasteurizado, particularmente na fabricação dos queijos, onde o processamento não inativa as bactérias de forma eficiente ou ainda quando os consumidores preferem produtos não pasteurizados.

A presença de resíduos de antibióticos no leite tem sido, nos últimos anos, um dos maiores desafios impostos aos órgãos responsáveis pela saúde pública e à indústria de alimentos mundial. Quando presentes no leite, estes medicamentos, podem causar reações de hipersensibilidade e resistência à antibioticoterapia, são considerados indesejáveis pelos consumidores, e interferem diretamente na manufatura de alguns produtos lácteos, pela inibição de culturas lácticas (FONSECA e SANTOS, 2000).

Minimizar os riscos do leite e produtos lácteos para a saúde humana, requer um sistema contínuo medidas preventivas, que se inicia desde a seleção dos alimentos a serem fornecidos para os animais, aos controles nas fazendas, inclusive em relação ao uso prudente de medicamentos veterinários, e ainda a aplicação de boas práticas de higiene e sistemas de gestão de segurança alimentar em toda a cadeia para os beneficiadores de leite (FAO e WHO, 2005).

Diferentes tipos de antibióticos e suas combinações são utilizados para tratamento e prevenção de doenças em bovinos leiteiros. A permanência de resíduos dependerá do número de doses, do veículo, da via de aplicação, da concentração e do número de animais em tratamento, devendo-se salientar que essas substâncias são resistentes aos tratamentos térmicos de pasteurização do leite (FURTADO, 1999).

A presença de resíduos antimicrobianos no leite é motivo de grande preocupação, pois representam risco à saúde do consumidor, que são representados por reações alérgicas, em grande parte associadas aos antibióticos β lactâmicos (penicilinas), pela ação carcinogênica, associada ao cloranfenicol, à sulfametazina e aos nitrofuranos, e pela seleção de bactérias resistentes da microbiota normal, e pela possível transferência dessa resistência a outras bactérias susceptíveis (COSTA, 2002).

2.3 *Staphylococcus* spp

Os estafilococos pertencem ao gênero *Staphylococcus*, família *Staphylococcaceae*, que são classificados como cocos Gram-positivos, de acordo com suas características morfotintoriais e podem ocorrer sob diversas formas, células isoladas, em pares, tétrades, em cadeias curtas, e predominantemente em forma de cachos de uva. Em relação à motilidade são classificados como imóveis, podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos e todos são catalase-positivos. De acordo com a sua capacidade de produção da coagulase, o gênero *Staphylococcus* spp. é subdividido em dois grupos, *Staphylococcus* coagulase-negativos e *Staphylococcus* coagulase-positivos, do qual o *Staphylococcus aureus* faz parte (KONEMAN et al., 2012).

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo, de aproximadamente 1 μ m de diâmetro, não móvel, não esporulado, positivo para a prova da catalase e geralmente encapsulado. Suas células são dispostas em cachos irregulares, possuem parede celular resistente a lisozima e conseguem crescer em concentrações salinas de até 7,5%. Tem a capacidade de expressar muitas proteínas de superfície e extracelulares e possui ainda potentes fatores de virulência (BROOKS et al., 1998).

O *Staphylococcus aureus* foi uma das primeiras bactérias a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior

importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007). Tem envolvimento em uma ampla variedade de doenças em humanos e animais, sendo a sua patogenicidade relacionada principalmente à combinação de virulência mediada por toxinas, capacidade invasiva e resistência aos antibióticos (ARGUDIN et al., 2010).

2.3.1.1 Importância do *Staphylococcus aureus* como causador de mastites

Na etiologia das mastites, o *Staphylococcus aureus* ocupa um papel de importância, sendo considerado um patógeno primário e o microrganismo mais isolado nas infecções clínicas e subclínicas (BRITO et al., 1999). Causam mais danos aos tecidos secretores de leite do que os *Streptococcus agalactiae*, pois liberam toxinas mais prejudiciais. Inicialmente os microrganismos causam lesão aos tecidos que revestem o teto e as cisternas da glândula, em seguida, passam para o sistema de ductos e formam os “bolsões” profundos, também chamados de focos de infecção, nos tecidos secretores de leite. Tal processo é seguido pela formação de abscesso e envelopamento das bactérias pelo tecido fibroso, cujo fenômeno, é um mecanismo de defesa para isolar as bactérias e mantê-las localizadas, que porém resulta em formação de tecido fibroso, que é responsável pela baixa resposta aos antibióticos. (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

No estudo conduzido por Silva et al. (2014), em 11 propriedades localizadas no estado de São Paulo, a prevalência do gênero *Staphylococcus* spp. nas amostras analisadas foi de 22,5% em vacas sadias e de 27,4% em vacas com mastite, sendo o *Staphylococcus aureus* a única espécie isolada que apresentou significância entre os grupos das vacas sadias e das vacas com mastite, sendo mais prevalente em vacas com mastite (17,5%) do que em vacas sadias (1,6%).

Durante o curso da mastite crônica, causada por *Staphylococcus aureus*, o dano aos tecidos é bem variável e envolve somente pequenas áreas da glândula, porém estas, geralmente se tornam não produtivas ou produzem uma quantidade mínima de leite. As células secretoras podem ainda degenerar-se e em conjunto com os leucócitos, causar uma obstrução dos ductos lactíferos que drenam as áreas glandulares, tal fato leva à involução dos alvéolos que ainda continuam funcionais e à formação de fibrose (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Segundo Philpot e Nickerson (2002), quando ocorre a desobstrução dos ductos, os estafilococos são liberados para outras áreas da glândula mamária e o processo se repete, iniciando um ciclo contínuo de infecção e reinfecção em diferentes regiões do quarto afetado. Nos estágios iniciais da infecção os danos são mínimos e, se adequadamente tratado com antibióticos, o quarto retornará à produção quase normal de leite nas lactações posteriores. Entretanto, se os estafilococos permanecerem dentro das áreas obstruídas, e os leucócitos não tiverem capacidade de impedir a multiplicação das bactérias, a destruição dos tecidos, as tentativas de envelopamento da área afetada e o desenvolvimento do tecido fibroso, continuarão acontecendo, levando à formação de abscessos para confinar os microrganismos que tornarão a área não funcional.

Todavia, as bactérias podem escapar desses abscessos e reinfetar os tecidos subjacentes, levando à formação de mais abscessos e danos irreversíveis. À medida que os “bolsões” profundos ou focos de infecção, aumentam de tamanho e tornam-se numerosos, outras áreas de produção de leite são substituídas por áreas de fibrose e conseqüentemente se tornam não funcionais. Quando os abscessos e as áreas de fibrose se tornam muito grandes, podem desenvolver protuberâncias, que são palpadas no exame do tecido mamário superficial do quarto afetado (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Segundo Philpot e Nickerson (2002), alguns *Staphylococcus aureus* podem produzir uma toxina capaz de provocar a constrição de vasos sanguíneos e a coagulação do sangue em seu interior, impedindo vascularização do quarto afetado, causando a mastite gangrenosa, que na forma hiperaguda pode provocar a perda do quarto ou até mesmo a morte do animal. A mastite gangrenosa, caracteriza-se por uma coloração verde azulada, diminuição da temperatura local no tecido afetado e pelo extravasamento de soro sanguíneo através da pele.

2.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

Mundialmente, os antimicrobianos são usados para tratamento e prevenção de doenças infecciosas em animais de produção, equinos e animais de companhia e também, como promotores de crescimento. Em muitos estudos foi observado que o uso de antimicrobianos em animais contribuiu para o desenvolvimento de resistência

antimicrobiana em humanos, devido à muitas classes de antimicrobianos usadas em animais também serem empregadas em seres humanos para tratar doenças graves, ocorrendo falha terapêutica, devido à transferência de bactérias resistentes pela cadeia alimentar (ARIAS e CARRILHO, 2012).

Em 1960, foi descoberta uma droga do grupo das penicilinas, denominada meticilina, que não era suscetível à ação da betalactamase. Logo em seguida à meticilina vieram as cefalosporinas. Porém, no início da década de 1970, começaram a aparecer, rapidamente, cepas de *S. aureus* com resistência à meticilina identificadas pela sigla MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) e resistentes aos demais betalactâmicos. As cepas MRSA rapidamente se disseminaram em ambientes hospitalares, limitando, assim, a antibioticoterapia de combate infecções por *S. aureus* (SANTOS et al., 2007).

Segundo estudo de Nader filho e colaboradores (2007) onde foi avaliada a sensibilidade antimicrobiana “*in vitro*” de 72 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas em amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, em propriedades do Estado de São Paulo, verificaram que 100% das cepas estudadas apresentaram resistência a pelo menos 2 antibióticos ou quimioterápicos. Tais resultados levaram os autores a concluir que para a escolha do medicamento a ser utilizado no tratamento da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*, torna-se imperiosa a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antibióticos e quimioterápicos das cepas isoladas.

Os *Staphylococcus aureus* estão associados à mastites crônicas em bovinos e geralmente estas, são refratárias ao tratamento com antibióticos. A produção de biofilme é um elemento chave na patogenia dos *Staphylococcus aureus* e pode contribuir para falhas no tratamento relatadas de maneira consistente por veterinários (FABRES-KLEIN et al., 2015).

As penicilinas, cefalosporinas, estreptomicina e tetraciclina são utilizadas como tratamento e prevenção de doenças causadas por bactérias Gram positivas e Gram negativas que afetam os bovinos leiteiros e administrados rotineiramente à rebanhos inteiros para prevenir mastites no período seco (OLIVER e MURINDA, 2012).

Segundo Oliver e Murinda (2012), quando aumenta a incidência de doenças nos rebanhos, geralmente ocorre um aumento no uso de antimicrobianos, que por

sua vez aumenta o potencial de resíduos destes medicamentos no leite e consequentemente a possibilidade de resistência bacteriana a eles.

O desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibióticos demonstrado pelo *S. aureus* está diretamente relacionado com os procedimentos empregados na sua antibioticoterapia. Porém, entender o funcionamento de sua patogenicidade é importante para orientar os clínicos na racionalização de sua antibioticoterapia, diminuindo dessa forma, a possibilidade de seleção de cepas resistentes e multirresistentes aos antimicrobianos (SANTOS et al., 2007).

O uso de antimicrobianos com cautela na indústria leiteira, é importante e necessário, e estratégias envolvendo seu uso de maneira prudente abrangem, a identificação do patógeno causador da infecção, a determinação de susceptibilidade e a resistência do patógeno para avaliar o antibiótico mais indicado para o tratamento e a duração do tratamento suficiente para garantir concentrações efetivas e eliminar os microrganismos (OLIVER e MURINDA, 2012).

2.3.1.2 Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

O termo virulência pode ser denominado como o grau de patogenicidade exibido por cepas de microrganismos (PELCZAR et al., 1996).

Os fatores de virulência bacterianos são moléculas que influenciam as interações entre as bactérias e as células e/ou substâncias, que incluem eventos como a adesão a membranas celulares, a colonização e a invasão de pele e mucosas, a entrada na célula por endocitose ou fagocitose, o crescimento, a replicação e outros processos metabólicos, a disseminação local, regional e sistêmica e a lesão e/ou lise celular. Também inibem respostas imunes inatas e adaptativas e permite que a bactéria escape dos mecanismos de defesa e também se prolifere em ambientes hostis. Os fatores de virulência bacteriana atuam como proteases, lipases, desoxirribonucleases, toxinas, mediadores fisiológicos, agentes líticos, fatores de adesão, biofilmes, cápsulas bacterianas compostas por carboidratos e fatores antifagocíticos (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

A virulência bacteriana é determinada parcialmente pelo tipo e pelo número de fatores expressos pela bactéria para completar seu ciclo de vida em um animal e

de forma geral, os fatores de virulência são codificados por mais de um gene bacteriano (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

A patogenicidade, ou seja, a capacidade de uma bactéria causar doença, é regulada por seus fatores de virulência, que são utilizados pelos microrganismos para matar as células fagocíticas, bloquear a fagocitose, escapar da fusão com lisossomos e da morte microbiana no interior dos fagócitos e aumentar sua replicação nestas células (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

Os fatores de virulência são moléculas, normalmente glicoproteínas ou glicopeptídeos, derivados de genes bacterianos e sua expressão estabelece os processos usados pelas bactérias para colonizar a mucosa, infectar células, crescer, se replicar e provocar a lise celular (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

Para colonizar as células, as bactérias empregam mecanismos como adesão, multiplicação, colonização, invasão tissular e escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

Adesão é a capacidade das bactérias de se fixarem nas células e tecidos do organismo. A adesão se dá pela presença de estruturas da superfície da célula bacteriana, definidas como adesinas, que funcionam quando interagem com os receptores que existem no organismo e se localizam na superfície da célula ou são proteínas da matriz extracelular. Essas adesinas bacterianas incluem fímbrias, componentes da cápsula, ácidos lipoteicóicos das bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, ou outro antígeno de superfície celular (NOGUEIRA e MIGUEL, 2010).

As bactérias podem se aderir, por exemplo, a superfícies de vasos sanguíneos ou a diferentes dispositivos plásticos usados em medicina, onde formam os chamados biofilmes, que são microcolônias ou agregados bacterianos envolvidos por uma película de exopolissacarídeos produzida pela bactéria que se forma na superfície dos dispositivos plásticos, quando colocados no organismo, que funcionam como uma fonte permanente de bactérias que podem causar infecção em órgãos distintos. Nos biofilmes, as bactérias estão bem resguardadas das defesas do organismo e da ação dos antimicrobianos (NOGUEIRA e MIGUEL, 2010).

Além de aderir, as bactérias também podem invadir diferentes células do nosso organismo para causar infecção. Cada bactéria invasora é dotada de diferentes mecanismos próprios de invasão e estes servirão ao propósito de cada uma delas. Com relação as bactérias, o mais importante é a necessidade de regular

a expressão dos seus genes de virulência para se adaptarem aos organismos onde vivem (NOGUEIRA e MIGUEL, 2010).

O crescimento e a multiplicação de células bacterianas podem ocorrer dentro (intracelular) ou fora (extracelular) das células do nosso organismo. Algumas bactérias são classificadas como intracelulares obrigatórias, por precisarem de nutrientes produzidos pela célula hospedeira e esta localização intracelular permite que sejam protegidas de anticorpos, da fagocitose e de alguns antimicrobianos (NOGUEIRA e MIGUEL, 2010).

A produção de sideróforos é uma estratégia bastante interessante para as bactérias presentes em nosso corpo, enquanto as bactérias que não competem eficazmente com o hospedeiro pelo ferro disponível são pouco patogênicas, as que secretam os sideróforos (com ferro ligado) possibilitam sua internalização pela célula bacteriana, após ligarem-se a receptores específicos (NOGUEIRA e MIGUEL, 2010).

Entre os fatores de virulência estão as toxinas, termo usado em Microbiologia para nomear qualquer substância de origem bacteriana capaz de causar danos no organismo animal e que podem ser classificadas, em endotoxinas e exotoxinas (NOGUEIRA e MIGUEL, 2010).

A interação entre o animal e um patógeno bacteriano é bidirecional, onde ambos influenciam as atividades e as funções do outro. O resultado desta interação depende dos fatores de virulência do patógeno e da resistência ou suscetibilidade dos genes do animal (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

Nas últimas décadas, os *Staphylococcus aureus* adquiriram considerável importância relacionada à saúde animal e humana pela elevada patogenicidade, e aumento na prevalência de cepas multirresistentes aos antibióticos. Sua elevada patogenicidade está relacionada com mecanismos multifatoriais e complexos, determinados pela capacidade da bactéria de expressar uma variedade de fatores de virulência que facilitam a ocorrência de doenças (ACOSTA et al., 2017).

Segundo Marques et al. (2013), os microrganismos patogênicos desenvolvem algumas estratégias de sobrevivência para colonizar determinados sítios do hospedeiro, por meio do desenvolvimento de vários fatores de virulência, que têm como função invadir as defesas fagocíticas, facilitar sua aderência às células epiteliais, colonizar os tecidos e propiciar sua persistência extracelular.

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SNC) são importantes causas de infecção intramamária em bovinos leiteiros, sendo sua capacidade de produzir biofilme, considerada uma importante propriedade de virulência na patogênese da mastite (FELIPE et al., 2017). Essa capacidade de formar biofilme é um dos fatores de virulência que facilitam a adesão e colonização do epitélio mamário, fato que leva a infecções recorrentes ou persistentes (FOX et al., 2005; MELCHIOR et al., 2011).

Depois de invadir o epitélio, o *S. aureus* utiliza diversas estratégias para permitir sua sobrevivência e se proliferar no organismo do hospedeiro. Tais estratégias estão relacionadas com a opsonização do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição das respostas imunes celular e humoral (SANTOS et al., 2007).

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *Staphylococcus aureus* se deve aos seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e ainda em sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro. Os fatores de virulência podem ser classificados em três categorias, os relacionados à aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, (produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase), os fatores relacionados à evasão da defesa do hospedeiro (enterotoxinas estafilocócicas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, as lipases e polissacarídeos capsulares), e os fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses, que incluem as proteínas (toxinas) α , β , δ , γ e ϵ – hemolisinas (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Na estrutura da parede celular do *S. aureus* existem também, polissacarídeos e proteínas antigênicas, bem como outras moléculas importantes, que podem induzir à uma resposta imunológica no hospedeiro. Entre essas outras moléculas podemos citar o ácido tecóico, o glicanopeptídeo, a proteína A, e presença de cápsula e de adesinas (LUTZ, L. et al., 2003. /OLIVEIRA, G. A. et al., 2001)

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais causadores de mastites contagiosas, apresentando alta incidência na maioria dos rebanhos leiteiros em vários países. Além de perdas econômicas cabe ressaltar o aspecto de saúde pública para cepas produtoras de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico. A

enterotoxina A, é relacionada grande parte com os casos de toxinfecções alimentares, podendo ser veiculada pelo leite cru, pasteurizado e subprodutos lácteos. A síndrome do choque tóxico é determinada em sua maioria pela toxina do choque tóxico, entretanto as enterotoxinas do tipo B e C também podem estar envolvidas (SÁ et al., 2004).

Nas bactérias, os genes que codificam as enzimas de uma via metabólica, de forma geral estão dispostos de maneira consecutiva para formar uma unidade funcional denominada *operon* (PELCZAR et al., 1996).

O *Staphylococcus aureus* adere à superfície através de um polissacarídeo capsular/ adesina. Ocorre então a multiplicação bacteriana em múltiplas camadas, associadas a produção de 2 polissacarídeos que são intimamente relacionados, o poli-N-acetilglucosamina e polissacarídeo intercelular adesina (KRISTIAN et al., 2004). Alguns *Staphylococcus aureus* tem o gene *bap*, codificando a proteína associada biofilme (Bap) que intermedia a adesão inicial à superfície ligação entre as células bacterianas, permitindo que esses microrganismos produzam biofilme mesmo na ausência do operon ica (CUCARELLA et al., 2004).

A família de adesinas (MSCRAMM) é um fator de virulência adicional de *Staphylococcus aureus* associado à adesão e invasão de células hospedeiras (KLEIN et al., 2012). Para os *Staphylococcus*, o processo de adesão é decisivo para que ocorra a colonização, sendo mediado por proteínas denominadas adesinas. Estas adesinas pertencem à família das proteínas associadas à parede celular, conhecidas como MSCRAMMs, que são componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz. Tais componentes estão ligados covalentemente ao peptidoglicano da parede celular e reconhecem o colágeno (proteína ligadora de colágeno), a fibronectina (proteína ligadora de fibronectina), o fibrinogênio (proteína ligadora de fibrinogênio), elastina (proteína ligadora de elastina) e laminina (proteína ligadora de laminina) (FOSTER e HÖÖK, 1998). Porém a patogênese dos *Staphylococcus aureus* também sofre influência da formação de biofilme (MELCHIOR et al., 2006).

2.3.2 Biofilmes

Biofilmes são comunidades estruturadas de bactérias unidas por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas como, os polissacarídeos de adesão

intercelular (PIA) e outros componentes como o ácido teicóico e proteínas associadas ao biofilme (BAP) que aderem a superfícies vivas ou inertes (COSTERTON et al., 1999).

Biofilmes são definidos como agrupamentos de células microbianas associadas às superfícies, que se encontram envoltos por substâncias poliméricas extracelulares hidratadas (SAUER et al., 2007).

O biofilme consiste em comunidades de células bacterianas envolvidas por uma matriz polissacarídica, produzidas pelas bactérias que permanecem aderentes a superfícies inertes ou vivas. A formação do Biofilme parece ocorrer em duas etapas: a adesão da bactéria a uma superfície e a adesão celular, formando múltiplas camadas de células bacteriana (GÖTZ, 2002).

As bactérias podem viver individualmente, de forma livre para se moverem em suspensão, recebendo a denominação de células planctônicas, ou podem ser encontradas em comunidades organizadas aderidas a uma superfície, como em biofilmes (GUILHEN et al., 2016).

Biofilmes são compostos por uma matriz exopolissacarídica liberada por células bacterianas quando estão aderidas em comunidade e podem ser formados por uma ou mais espécies diferentes. Em biofilmes dentários, podem ser encontradas até 500 espécies diferentes. A formação de biofilmes é um processo dividido em estágios, como a adesão inicial, criação de uma microcolônia, formação de um biofilme maduro, e a liberação de células para o meio. Tem sido mostrado que os biofilmes possuem uma grande importância na área médica. Cerca de 65% das infecções nosocomiais estão associadas a formação de biofilmes, visto que permitem a adesão bacteriana a superfícies bióticas e abióticas, incluindo dispositivos médicos como cateteres (MAH e O'TOOLE, 2001).

A formação de biofilme em estafilococos é multifatorial, fazendo com que as cepas sejam capazes de sobreviver em ambientes normalmente hostis. A formação de biofilme parece ser uma estratégia de sobrevivência bacteriana que é ativada em algumas situações como o oxigênio e íons Fe estão em quantidade limitada, quando concentrações subletais de certos antibióticos estão presentes ou ainda quando outras situações de estresse se iniciam. A produção de PIA (*slime*), um polissacarídeo composto por N-acetilglucosaminas β -1,6 ligadas com resíduos parcialmente desacetilados, onde as células estão embebidas e protegidas contra o

sistema imune do hospedeiro e o tratamento antibiótico, certamente desempenha um papel importante na geração de um biofilme, e os genes *ica* correspondentes estão predominantemente presentes em isolados clínicos (GÖETZ, 2002).

A capacidade que um microrganismo tem de formar um biofilme proporciona a propriedade de aderência de células a uma superfície e a de acumulação para formar aglomerados de células de múltiplas camadas (GÖETZ, 2002).

Na formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*, dois importantes componentes de superfície têm sido implicados. Um dos componentes depende da presença do *operon ica* ADBC, que codifica proteínas envolvidas na síntese do polissacarídeo de matriz poli-N-sucinil β -1,6 glucosamina (PNSG) e o outro são proteínas envolvidas na formação de biofilme, que parecem promover a ligação primária entre as superfícies. Outras proteínas como a BAP, pertencem ao grupo das chamadas MSCRAMMs (componentes da superfície microbiana que reconhecem as moléculas adesivas da matriz) (O'NEIL et al., 2007).

Göetz (2002), em seu estudo, verificou que proteínas também estão envolvidas na formação de biofilme, como a proteína associada à acumulação (AAP), o fator aglutinante A (ClfA), a proteína de superfície estafilocócica (SSP1) e a proteína associada ao biofilme (BAP).

Segundo Melchior et al. (2006), as infecções recorrentes são frequentemente atribuídas ao crescimento de bactérias no biofilme. Junto a formação de biofilme acontecem significativas modificações fisiológicas e genéticas nos microrganismos resultando, numa perda de sensibilidade à todas as classes de antibióticos. Essas bactérias possuem uma resistência inata aos antibióticos, aos desinfetantes e até mesmo à eliminação pelos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Na infecção da glândula mamária, o *Staphylococcus aureus* se localiza dentro dos alvéolos e ductos lactíferos, em forma de conglomerado e associado com o tecido epitelial e invadindo o tecido intersticial (MELCHIOR et al., 2006). Tais conglomerados, correspondem a um crescimento bacteriano em forma de colônias aderentes rodeadas por uma matriz de exopolissacarídeos, cuja estrutura completa constitui o biofilme enquanto que a camada extracelular mais próxima da célula é chamada de *slime* (COSTERTON et al., 1999).

Devido ao tamanho do agregado e a presença dos exopolímeros, as bactérias banhadas pelo biofilme ficam protegidas do sistema imune do hospedeiro, entre eles

da atividade fagocítica por macrófagos, a ação das opsoninas e da atividade bactericida dos neutrófilos (BARRIO et al., 2000).

Existem vários mecanismos responsáveis pela resistência do biofilme aos antibióticos, dentre os quais destacam-se, a penetração reduzida dos agentes antimicrobianos pela matriz do biofilme, a alteração da taxa de crescimento das bactérias no biofilme e alterações fisiológicas que dão origem a células resistentes (MELCHIOR et al., 2006).

A habilidade do *Staphylococcus aureus* em formar biofilme *in vivo*, é considerada um de seus principais fatores de virulência que influenciam na patogenia das mastites, uma vez que permite uma melhor colonização do tecido hospedeiro, entre outras vantagens (ARSLAN e ÖZKARDES, 2007). No entanto, as vias regulatórias para a formação do biofilme variam entre as linhagens (MELCHIOR et al., 2006) tal fato, torna interessante descobrir se as diferenças na expressão entre as linhagens podem ser atribuídas a diferentes genótipos (PEÑA e UFFO, 2013).

Peña e Uffo (2013), obtiveram em seu estudo que em 98% (96/98) dos isolados de *Staphylococcus aureus* foram produtores de biofilme. Em relação à intensidade de produção de biofilme, obteve-se que 40,8% (40/98) apresentaram forte intensidade, 23,5% (23/98) intensidade moderada, 33,7% (33/98) fraca intensidade e em 2% (2/98) não houve produção.

Segundo Aguilar et al., (2001), a maioria das estirpes dos *Staphylococcus aureus* que causam doenças são envoltos por uma camada espessa (slime - polissacarídeo extracelular), que auxilia na aderência e colonização do epitélio da glândula mamária pelos microrganismos.

Dois componentes de superfície já foram implicados na formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*, o produto do operon icaADBC, que codifica para proteínas envolvidas na síntese de polissacarídeo-N-succinil- poli -1-6-glucosamina (PIA / PNSG) (MCKENNEY et al., 1999; CRAMTON et al., 1999), e a proteína associada ao biofilme (BAP).

2.3.3 Proteína BAP e Gene *bap*

A BAP é considerada uma proteína de superfície formada por 2.276 aminoácidos, (CUCARELLA et al., 2001). Esta proteína promove tanto a fixação primária em superfícies inertes quanto a adesão intercelular, diferente da PIA/ PNSG que parece estar envolvida apenas na adesão intercelular (CUCARELLA et al., 2002).

No estudo de Cucarella et al. (2002), foi investigada a relação entre a formação de biofilme e a funcionalidade das proteínas MSCRAMM em *Staphylococcus aureus* em ovelhas. Os resultados demonstraram que a expressão da proteína Bap bloqueou a adesão do fibrinogênio à fibronectina “*in vitro*”, e interferiu nas propriedades funcionais das proteínas MSCRAMM, evitando a fixação bacteriana inicial aos tecidos do hospedeiro e a internalização celular.

Taglialegna et al. (2016), demonstraram como o Bap de *Staphylococcus aureus* promove a formação do arcabouço da matriz de biofilme em resposta a sinais ambientais. Fazendo uma análise da expressão de Bap na presença de glicose, verificaram que a diminuição do pH durante o crescimento, induziu à agregação bacteriana e à forte formação de biofilme. “*In vivo*”, a acidose local ocorre durante infecções estafilocócicas, resultante do metabolismo bacteriano e da resposta inflamatória.

No mesmo estudo de Taglialegna et al. (2016), foram verificadas evidências de que a Bap em *Staphylococcus aureus*, pode perceber no ambiente bacteriano mudanças de pH e concentração de Ca^{2+} , e com isso modular a formação de biofilme sob condições particulares de uma maneira dependente de amiloide. O Bap é processado e os fragmentos contendo pelo menos o terminal N da proteína tornam-se propensos à agregação e por si só se montam em estruturas do tipo amiloide, em pH ácido e em baixas concentrações de cálcio. Estas descobertas definem uma dupla função para o Bap, inicialmente como um sensor e depois como uma proteína de suporte para promover o desenvolvimento do biofilme sob condições ambientais específicas.

Segundo Latasa et al. (2006), embora a síntese da matriz consuma energia, a vida em comunidade protege as bactérias contra as agressões ambientais, o sistema imunológico ou a ação de antimicrobianos. Nos últimos anos, muitos

estudos dedicaram grandes esforços para identificar os fatores envolvidos no desenvolvimento do biofilme e como resultado descobriu-se que diferentes bactérias não relacionadas possuem características em comum, apresentando dessa forma, os mesmos exopolissacarídeos (celulose, poli- β -1,6-N-acetilglucosamina) para construção da matriz, o mesmo mensageiro secundário, c di-GMP, cuja função é regular a produção de exopolissacarídeos da matriz de biofilme, e ainda um grupo de proteínas de superfície que têm homologia com Bap de *Staphylococcus aureus*, cuja função é promover a adesão a superfícies vivas ou inertes.

O primeiro membro da família BAP foi descrito por Cucarella et al. (2001), que identificaram uma nova estrutura de leitura de 6831pb envolvida no desenvolvimento do biofilme. Este gene é transportado em um suposto composto elemento de transposição, inserido na ilha de patogenicidade SapIbov2 que codifica uma proteína de superfície de 2276 aminoácidos, denominada Bap (UBEDA et al., 2003).

O gene *bap* já foi detectado em isolados de várias espécies estafilocócicas coagulase-negativas, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus hyicus* (TORMO et al., 2005).

Segundo Cucarella e colaboradores (2001), a característica estrutural mais distintiva da proteína Bap é a presença de uma região central que consiste em 13 repetições sucessivas e idênticas de 86 aminoácidos, mesmo ao nível dos nucleotídeos.

A identidade existente entre as repetições desencadeia eventos de recombinação entre eles, levando à produção de proteínas com diferentes comprimentos ao longo de uma infecção por *Staphylococcus*, inclusive, de forma curiosa, o número de repetições não afeta a funcionalidade da proteína, mesmo quando apenas uma repete a região central (CUCARELLA et al., 2004).

Segundo Latasa et al. (2006), experimentos in vitro mostraram a Bap não está somente envolvida na etapa de fixação primária, mas também, participa em conjunto com o PIA polissacarídeo / PNAG, na agregação de célula-a-célula e maturação biofilme, o que reforça a existência de uma cooperação entre PIA / PNAG e a proteína Bap.

Cucarella et al. (2001), relataram em seu estudo que durante a segunda etapa da formação de biofilme, foi verificado um aumento na produção de polissacarídeos

em cepas de superprodução de Bap e uma diminuição dos níveis de PIA/PNAG em cepas cujo gene *bap* foi interrompido.

A deficiência de biofilme da estirpe mutante BAP foi supostamente devida a um nível insuficiente de polissacárido PIA / PNAG, porém, as cepas portadoras do gene BAP foram capazes de produzir biofilme e exibir um fenótipo positivo, mesmo se o operon *ica*, responsável pela síntese de PIA/PNAG, fosse interrompido (CUCARELLA et al., 2004). Dessa forma concluiu-se que a expressão da proteína Bap é suficiente para promover o desenvolvimento de biofilme independente da presença de PIA / PNAG em superfícies inertes (LATASA et al., 2006).

Tormo e colaboradores (2005) observaram que todos os isolados testados de estafilococos que possuíam o gene *bap* eram fortes produtores de biofilme, apesar da maioria não possuir o operon *icaADBC* e concluíram que a proteína Bap é capaz de mediar um mecanismo de desenvolvimento de biofilme alternativo ao mecanismo de PIA/PNAG.

Zuniga (2012) em seu estudo, pesquisou os genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e verificou que com exceção do *fnbA*, todos os outros fatores de virulência estudados foram detectados, sendo os genes *eno*, *fib* e a associação dos genes “*eno/fib/bap*” os mais frequentemente detectados. Em relação aos isolados de *Staphylococcus* spp coagulase positivos e coagulase negativos, 56,6% (N=60) foram positivos para Bap.

Marques (2016) em seu estudo, dos 20 isolados avaliados, foram produtores de biofilme, sendo 16 positivos para ambos os genes *icaA* e *icaD* e os demais apresentaram apenas um destes genes. Apenas um isolado apresentou o gene *bap*, entretanto este foi um forte produtor de biofilme.

Reinert (2006) estudando os genes de virulência agr-dependentes em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina SCCmec Tipo IV isoladas no Brasil, não encontrou o gene *bap* entre os isolados.

Almeida (2009), avaliando os fatores de virulência e genes regulatórios (agr) de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastites bovina e ovina, não encontrou o gene *bap* em seus isolados.

A proteína Bap, de *Staphylococcus aureus* é caracterizada por multidomínios de proteínas de superfície de bactérias Gram-positivas. O gene *bap* está contido em um transposon junto com o gene transposase e três genes codificadores de

proteínas de um *ATP-binding cassette (ABC) transporter*. Isso pode ser visto como coincidência ou como uma indicação de que o (ABC) transporter pode estar envolvido direta ou indiretamente na secreção de Bap, como ocorre em bactérias Gram-negativas (LASA e PEÑADES, 2006).

Uma das principais etapas na patogenia das infecções por *Staphylococcus* é a aderência destes às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro. *S. aureus* possui uma família de adesinas conhecidas como MSCRAMMs que reconhecem especificamente os componentes da matriz do hospedeiro. Estudos realizados sobre a influência da presença de Bap, na aderência de *Staphylococcus aureus* às proteínas do hospedeiro, culturas de células epiteliais e regiões da glândula mamária, têm indicado que linhagens Bap positivas mostram aderência inferior ao fibrinogênio imobilizado, fibronectina e culturas de células epiteliais (CUCARELLA et al., 2002).

Segundo Trotonda et al. (2005) estudos recentes têm mostrado que o regulador de virulência global SarA age como um ativador da expressão de *bap*.

Estudos experimentais de infecção da glândula mamária têm indicado que Bap pode atuar como um fator que impede a ligação bacteriana inicial aos tecidos do hospedeiro, embora que em longo período a presença de Bap facilite a persistência de *S. aureus* na glândula mamária (CUCARELLA et al., 2004).

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo, foi detectar a expressão do gene *bap*, como fator de virulência, em amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (*Campus São Paulo*).

4.1 Delineamento experimental

4.1.1 Amostras de *Staphylococcus* spp.

Foram utilizadas 283 cepas de *Staphylococcus* oriundas do banco de amostras do Laboratório de Bacteriologia e Micologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS). Estes isolados foram colhidos de amostras de leite de animais com mastite clínica e subclínica, tendo sido submetidos ao sequenciamento genético (gene *rpob*) para identificação das espécies. As amostras utilizadas para este estudo também foram previamente submetidas à detecção do gene *bap*, sendo positivas para o mesmo.

4.1.2 Avaliação da expressão do gene *bap*

4.1.2.1. Extração de RNA

O RNA foi extraído de cepas de *Staphylococcus* utilizando-se o Kit Illustra RNASpin Mini Isolation Kit (GE Healthcare®), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras foram submetidas à quantificação utilizando o NanoDrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific®). Posteriormente o RNA foi destinado à produção de cDNA (descrita a seguir) para reduzir as possibilidades de degradação.

4.1.2.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

Para obtenção do cDNA foram utilizados 2ng de random primer, 0,4mM de cada DNTP, 8µL de água nuclease free e 10µL de RNA extraído). A mistura de 20µL foi colocada no termociclador a 65°C por 5 minutos e, em seguida, permaneceu por 5 minutos em banho de gelo, resultando em desnaturação do RNA e ligação do primer. Posteriormente foram adicionados 0,8X First-Strand Buffer, 4mM DTT e 200U de SuperScript III (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA), à mistura anterior e levada ao termociclador com ciclos de 65°C por 5 minutos, 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos, 70°C por 15 minutos. O cDNA foi realizado utilizando-se 10µL de RNA extraído e armazenado a -20°C até a realização da PCR.

4.1.2.3 Detecção da Expressão Gênica

Para a avaliação da expressão do gene *bap* em estirpes de *Staphylococcus* spp., foram utilizados pares de *primers* *bap*-F 5'- CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG- 3' e *bap*-R 5'- GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC - 3' (CUCARELLA et al., 2001).

As reações de PCR foram realizadas com 3µL de cDNA, utilizando-se o kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) e água ultrapura q.s.p. 25µL. Para as amplificações utilizou-se o termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Life Technologies®). As reações de PCR foram dispostas em gel de agarose a 1% e coradas com SYBR® Safe DNA gel *stain* (Life Technologies®), conforme instruções do fabricante. A visualização da banda esperada (971pb) foi realizada sob luz UV em aparelho de foto documentação de géis (Syngene Bioimaging, Syngene®). Como controles positivos foram utilizadas cepas padrão ATCC e cepas da coleção do Laboratório de Bacteriologia e Micologia (FMVZ-VPS-USP).

Figura 4- Eletroforese para a avaliação da expressão do gene *bap* em estirpes de *Staphylococcus* spp, em Gel de agarose 1%, corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies®), com visualização de banda de 971pb.

Fonte: BENVENGA, G.U. (2018)

Legenda: C+ (Controle positivo), C- (Controle negativo), C.E. (Controle da extração).

4.2 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada, utilizando o software GRAPHPAD INSTAT (*Statistical Analysis Systems for Personal Computers*, 1990-1993), utilizando o teste de Fischer.

5 RESULTADOS

No presente estudo, das 283 amostras utilizadas de *Staphylococcus* isolados de mastite bovina, 50 (17,7%) eram provenientes de animais com mastite clínica, e 233 de animais (81,3%) com mastite subclínica.

Em relação aos microrganismos isolados de amostras de animais com mastite clínica, verificou-se que a frequência de *Staphylococcus aureus* foi maior estatisticamente ($p < 0,05$), quando comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados. Em relação à frequência da expressão do gene *bap*, 38% dos *Staphylococcus aureus* expressaram o gene *bap*, enquanto que 4% dos *Staphylococcus equorum* expressaram o gene. Para o *Staphylococcus haemolyticus* a expressão positiva foi de 4%, e nos *Staphylococcus epidermidis* a frequência de expressão positiva foi de 2%.

Tabela 1- Porcentagem de valores absolutos dos *Staphylococcus* isolados de 50 amostras de mastite clínica, 2018.

Microrganismos	Expressão positiva		Expressão negativa		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Staphylococcus agnetis</i>	0	0,00	1	2,00	1	2,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	38,00*	16	32,00*	35	70,00*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	2,00	1	2,00	2	4,00
<i>Staphylococcus equorum</i>	2	4,00	0	0,00	2	4,00
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	4,00	1	2,00	3	6,00
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	0,00	6	12,00	6	12,00
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	2,00	0	0,00	1	2,00
TOTAL	25	50,00	25	50,00	50	100,00

BENVENGA, G.U. (2018)

* A frequência de *Staphylococcus aureus* foi maior estatisticamente ($p < 0,05$), quando comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados.

Gráfico 1- Espécies de *Staphylococcus* isolados de amostras de leite de animais com mastite clínica, 2018.

BENVENGA, G.U. (2018)

Gráfico 2- Expressão do gene *bap*, nas diferentes espécies de *Staphylococcus*, isolados de amostras de leite de animais portadores de mastite clínica, 2018.

BENVENGA, G.U. (2018)

Nas amostras isoladas de animais com mastite subclínica, a frequência de *Staphylococcus aureus* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados. Em relação à frequência da expressão do gene *bap*, 25,32% dos *Staphylococcus aureus*, expressaram o gene *bap*. Para o *Staphylococcus agnetis* a expressão positiva foi de 0,43%, enquanto que para o *Staphylococcus epidermidis* e para o *Staphylococcus haemolyticus* foi de 1,29%. Em relação ao *Staphylococcus hyicus* e ao *Staphylococcus saprophyticus* a expressão positiva do gene aconteceu em 3,86% e 0,43% respectivamente. A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência das amostras de expressão positiva.

Tabela 2- Porcentagem de valores absolutos de *Staphylococcus* isolados de amostras de mastite subclínica. 2018.

Microrganismos	Expressão positiva		Expressão negativa		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Staphylococcus agnetis</i>	1	0,43	1	0,43	2	0,86
<i>Staphylococcus aureus</i>	59	25,32 ¹	98	42,06 ¹	157	67,3 ¹
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	0,00	1	0,43	1	0,43
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	1,29	15	6,44	18	7,73
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	1,29	11	4,72	14	6,01
<i>Staphylococcus hyicus</i>	9	3,86	29	12,45	38	16,31
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0,43	0	0,00	1	0,43
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	0,00	1	0,43	1	0,43
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	0,00	1	0,43	1	0,43
TOTAL	76	32,62 ¹	157	67,38 ¹	233	100,00

BENVENGA, G.U. (2018)

* A frequência de *Staphylococcus aureus* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados.

¹ A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência das amostras de expressão positiva.

Gráfico 3- Espécies de *Staphylococcus* isolados de amostras de leite de animais com mastite subclínica, 2018.

BENVENGA, G.U. (2018)

Gráfico 4- Expressão do gene *bap*, nas diferentes espécies de *Staphylococcus*, isolados de amostras de leite de animais portadores de mastite subclínica, 2018.

BENVENGA, G.U. (2018)

Em relação aos valores absolutos dos *Staphylococcus* isolados de amostras de mastite clínicas e subclínicas, a frequência de *Staphylococcus aureus* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados. Em relação à frequência da expressão do gene *bap* os resultados obtidos mostram que 35,7% das amostras expressaram o gene *bap*, enquanto que em 64,3% das amostras não houve a expressão do mesmo gene. As frequências de expressão positiva do gene, nos diferentes estafilococos foi de 27,56% para *Staphylococcus aureus*, 0,35% para o *Staphylococcus agnetis*, 1,41% para o *Staphylococcus epidermidis*, 1,77% para o *Staphylococcus haemolyticus*, 3,18% para o *Staphylococcus hyicus*, 0,35% para o *Staphylococcus saprophyticus*, 0,71% para o *Staphylococcus equorum* e 0,35% para o *Staphylococcus xylosus*. A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparada com a frequência das amostras com expressão positiva.

Tabela 3- Porcentagem de valores absolutos de *Staphylococcus* isolados de amostras de mastite (clínica e subclínica), 2018.

Microrganismos	Expressão positiva		Expressão negativa		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Staphylococcus agnetis</i>	1	0,35	2	0,71	3	1,06
<i>Staphylococcus. aureus</i>	78 ¹	27,56	114	40,28 ¹	192	67,84 ¹
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	0,00	1	0,35	1	0,35
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	1,41	16	5,65	20	7,07
<i>Staphylococcus equorum</i>	2	0,71	0	0,00	2	0,71
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	1,77	12	4,24	17	6,01
<i>Staphylococcus hyicus</i>	98 ¹	3,18	35 ¹	12,37	44	15,55 ¹
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0,35	0	0,00	1	0,35
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	0,00	1	0,35	1	0,35
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	0,00	1	0,35	1	0,35
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	0,35	0	0,00	1	0,35
TOTAL	101	35,69	182	64,31	283	100,00

BENVENGA, G.U. (2018)

* A frequência de *Staphylococcus aureus* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados.

¹ A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência das amostras de expressão positiva.

Gráfico 5- Porcentagem de valores absolutos de *Staphylococcus* isolados de amostras de mastite subclínica, 2018.

BENVENGA, G.U. (2018)

Em relação aos valores absolutos dos *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de amostras de mastite, a frequência de *Staphylococcus aureus* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados. Em relação à frequência de *Staphylococcus hyicus* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) comparado com a frequência de todos os outros. Em relação à frequência da expressão do gene *bap* os resultados obtidos mostram para o *Staphylococcus aureus* 32,64% de expressão positiva do gene, 0,42% para *Staphylococcus agnetis* e 3,77% para o *Staphylococcus hyicus*. A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência das amostras com expressão positiva.

Tabela 4- Porcentagem de valores absolutos de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de amostras de mastite, 2018.

Microrganismos	Expressão positiva		Expressão negativa		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Staphylococcus agnetis</i>	1	0,42	2	0,84	3	1,26
<i>Staphylococcus aureus</i>	78 ^{*,1}	32,64	114 ^{*,1}	47,70	192	80,33 ^{*,1}
<i>Staphylococcus hyicus</i>	9 ^{*,1}	3,77	35 ^{*,1}	14,64	44	18,41 ^{*,1}
TOTAL	88	36,82	151	63,18	239	100,00

BENVENGA, G.U. (2018)

* A frequência de *Staphylococcus aureus* foi estatisticamente significante ($p < 0,0001$) comparado com a frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados.

** A frequência de *Staphylococcus hyicus* foi estatisticamente significante ($p < 0,0001$) comparado com a frequência de todos os outros.

¹ A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência das amostras de expressão positiva.

Gráfico 6- *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de amostras de mastite, clínicas e subclínicas, 2018.

BENVENGA, G.U. (2018)

Em relação à frequência da expressão do gene *bap* dos *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de amostras de mastite, os resultados obtidos foram, 9,09% de expressão positiva para *Staphylococcus epidermidis*, 4,55% para o *Staphylococcus equorum*, 11,36% para o *Staphylococcus haemolyticus*, 2,27% para o *Staphylococcus saprophyticus*, e para o *Staphylococcus xylosus*. A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência das amostras com expressão positiva.

Tabela 5- Porcentagem de valores absolutos de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de amostras de mastite, 2018

Microrganismos	Expressão positiva		Expressão negativa		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>S. chromogenes</i>	0	0,00	1	2,27	1	2,27
<i>S. epidermidis</i>	4	9,09	16	36,36	20	45,45
<i>S. equorum</i>	2	4,55	0	0,00	2	4,55
<i>S. haemolyticus</i>	5	11,36	12	27,27	17	38,64
<i>S. saprophyticus</i>	1	2,27	0	0,00	1	2,27
<i>S. sciuri</i>	0	0,00	1	2,27	1	2,27
<i>S. simulans</i>	0	0,00	1	2,27	1	2,27
<i>S. xylosus</i>	1	2,27	0	0,00	1	2,27
TOTAL	13 ¹	29,55	31 ¹	70,45	44 ¹	100,00

BENVENGA, G.U. (2018)

¹ A frequência de não expressão do *bap* foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) quando comparado com a frequência das amostras de expressão positiva.

Gráfico 7- *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de amostras de mastite, 2018.

BENVENGA, G.U. (2018)

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram utilizadas 283 amostras positivas para a proteína Bap, dentre as quais, 35,7% (n= 101) mostraram-se positivas para a expressão do gene *bap* e 64,3% (n=182) não expressaram o gene. A frequência de expressão do gene *bap* foi bem inferior a frequência de detecção do gene.

Os testes diagnósticos utilizados para verificar a expressão do gene *bap* foram “*in vitro*” e, portanto, as condições para expressão do gene também. Dessa maneira, existe a possibilidade de que os resultados obtidos não se repitam em um teste “*in vivo*” ou até mesmo que as frequências obtidas apresentem resultados inversos ou que ainda que a porcentagem de expressão do gene *bap* tenha resultados inferiores ao do teste *in vitro*.

Em um experimento *in vivo*, inúmeras variáveis devem ser levadas em consideração, sendo a principal delas a resposta imune do hospedeiro, que é determinada por diversos fatores como idade, estado nutricional, fase reprodutiva e fase de lactação, entre outras. Devido a tais variáveis as condições de um teste “*in vitro*” são muito diferentes das condições “*in vivo*”.

Esses fatores podem determinar frequências de expressão ainda menores do que as obtidas nesse estudo, porém conseguir demonstrar a expressão do gene *bap* *in vivo* é difícil, principalmente pela inexistência de testes para a detecção de biofilme e de *bap* no hospedeiro.

Com exceção da frequência de expressão positiva e negativa nas mastites clínicas, não se verificou diferença na frequência.

Nos *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica e o total de *Staphylococcus*, tanto de mastites clínicas quanto de subclínicas, como no total de coagulase positivos, houve uma frequência maior de expressão negativa, demonstrando que a presença desse gene pode contribuir com a virulência do processo. Porém esses fatores estão se apresentando com uma frequência de expressão positiva baixa, e portanto, não se pode atribuir unicamente à este gene a virulência do microrganismo.

Em relação à frequência dos valores absolutos de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos isolados de amostras de mastite no presente estudo, verificamos que nas amostras utilizadas neste estudo, 84,5% eram coagulase

positivos e 15,5% coagulase negativos. Discordando dos dados obtidos por Marques e colaboradores (2013), que verificaram em amostras de leite mastítico, 58% *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECN) e 42% de *Staphylococcus* coagulase-positivos.

Ainda em relação a frequência de valores absolutos de *Staphylococcus* coagulase positivos, no presente estudo, dentre as espécies identificadas, os *Staphylococcus aureus* foram os que tiveram maior frequência (67,8%). Tais dados nos fazem corroborar com Marques et al. (2013) que verificaram maior frequência de *Staphylococcus aureus* (36,2%) entre os coagulase-positivos.

Por não haver pesquisas semelhantes à do presente estudo, relacionadas à detecção da expressão gênica de *bap*, em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina pela PCR, tornou-se difícil a discussão dos dados obtidos com os de outros pesquisadores. Devido a tal fato, se fez necessário, incluir na discussão desta pesquisa, trabalhos que utilizaram metodologias diferentes.

Como exemplo de outros testes para avaliar a expressão de *bap* em *Staphylococcus aureus*, Tormo et al. (2007), após a subcultura da estirpe de *S. aureus* Bap-positiva V329, em Ágar vermelho do Congo, verificaram o aparecimento de colônias espontâneas de biofilme liso e negativo, em baixa frequência e utilizaram a análise de *Northern blot* dessas variantes, com uma sonda de gene específica de *bap*, para mostrar que a transcrição do gene *bap* não ocorreu.

Ainda como outra opção de teste para demonstrar a expressão da proteína Bap, Tormo et al. (2007) utilizaram-se do teste *Western blotting* utilizando anti-soro policlonal anti-Bap, e caracterizaram a fase variável de expressão da proteína Bap, indicando que este processo modula a funcionalidade de diferentes adesinas de *Staphylococcus*.

A escassa quantidade de estudos utilizando a detecção da expressão gênica de *bap* em *Staphylococcus* spp. pela PCR, mostra a necessidade de que novos estudos sejam realizados, para ampliar os conhecimentos sobre a proteína BAP e sobre o gene *bap*, para possibilitar a comparação dos dados de expressão gênica com os obtidos neste estudo, e também para estudar em detalhe outros genes envolvidos na produção de biofilme, utilizando-se os mesmos testes.

7 CONCLUSÕES

Em amostras provenientes de mastite subclínica, os *Staphylococcus aureus*, apresentaram maior frequência, quando comparado à frequência dos outros *Staphylococcus* isolados.

Em relação aos microrganismos isolados de amostras de animais com mastite clínica, verificou-se que a frequência de *Staphylococcus aureus* foi maior quando comparada à frequência de todos os outros *Staphylococcus* isolados. A frequência de expressão positiva do gene *bap*, foi maior nos *Staphylococcus aureus* do que nos demais *Staphylococcus*.

Considerando amostras provenientes de mastite clínica e subclínica, a frequência de *Staphylococcus aureus* foi maior do que a de todos os outros *Staphylococcus* isolados. Em relação a expressão do gene *bap*, a frequência de não expressão do *bap* foi maior do que a das amostras que apresentaram expressão positiva.

Nos *Staphylococcus* coagulase positivos, a maior frequência foi a de *Staphylococcus aureus*, em relação a todos os outros *Staphylococcus* isolados, seguida em segundo lugar, pelos *Staphylococcus hyicus*. A frequência de não expressão do gene *bap*, foi maior do que a das amostras que apresentaram expressão positiva.

Entre os *Staphylococcus* coagulase negativos isolados, a maior frequência foi de *Staphylococcus haemolyticus*, seguida pela segunda maior frequência, a dos *Staphylococcus epidermidis*.

De acordo com os resultados obtidos da expressão de gene *bap* “*in vitro*”, não se determinou uma maior frequência do processo inflamatório, porém há necessidade de se desenvolver uma forma de avaliar o a expressão de *bap* e a presença de biofilme no hospedeiro, para que dessa forma, se consiga ter certeza da condição de virulência que estes produzem.

Com os dados obtidos nesse estudo, a frequência de não expressão do gene *bap* foi maior quando comparada a frequência das amostras com expressão positiva. A expressão do gene *bap*, parece ocorrer em poucas das amostras, ou seja, em número bem menor de amostras do que onde o gene encontrava-se presente. Tal

fato sugere que a frequência de expressão do gene *bap*, ocorre de maneira inferior a da frequência de detecção deste gene.

Para se ampliar os conhecimentos sobre a expressão do gene *bap* e produção de biofilme, são necessários outros estudos, se possível *in vivo*, que levem em consideração variáveis como a idade, estado nutricional, fase de lactação e fase reprodutiva, para se verificar se tais condições podem causar interferências nestes.

Outras pesquisas devem ser realizadas, afim de possibilitar a comparação dos dados de expressão gênica com os obtidos neste estudo, e ainda, para estudar em detalhe os demais genes envolvidos na produção de biofilme, utilizando-se os mesmos testes.

REFERÊNCIAS

ABIA. Números do Setor – Faturamento. **Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação**, 2017. Disponível em <https://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2018.pdf>. Acesso em: Novembro, 2018.

ACOSTA, A.C.; COSTA, M.M.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*- Revisão. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v.11, n.4 (out-dez), p.252-269, 2017.

AGUILAR, B.; AMORENA, B.; ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.183-191, 2001.

ALMEIDA, L.M. **Fatores de Virulência e genes regulatórios agr de Staphylococcus aureus e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastite bovina e ovina**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2009.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manolo, 2003. 135p.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v.2, p.1751-1773, 2010.

ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. Revisão: Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p.775-790, 2012.

ARSLAN S, ÖZKARDES F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2007;102(1):29-33.

BALLARINI, G. **O Leite e a Vida**, Parmalat, 1994.

BARRIO B, VANGROENWEGHE F, DOSOGNE H, BURVENICH C. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Veterinary Research**. v.31, p.603-609, 2000.

BENEVIDES, I. A.; VEIGA, A. Aspectos históricos, fisiológicos e antroposóficos do leite na alimentação humana: uma introdução ao tema. **Arte Médica Ampliada**, V.34(n.1): p.5-12, 2014.

BENITES, N.R. **Comparação entre tratamento homeopático de mastite bovina clínica e subclínica**. 116 f. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, FMVZ-USP, Brasil, 2006.

BERTOLA, F. The Milky Way through the Ages: An Iconographic Journey. ***Cosmology Across Cultures Asp Conference Series***, v.409, 2009.

BLOODY, D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O.M. Veterinary Medicine: **A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses**. 5th ed, 1979.

BLOODY, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1263p. 1991.

BLOWEY, R.W.; EDMONDSON, P. Mastitis control in dairy herds, 2. ed, 2010.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: An envolving disease. **Veterinary Journal**, v.164, n.2, p. 116-128, 2002.

BRASIL- MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade do leite tipos A, B e C, da identidade e qualidade do leite cru refrigerado e pasteurizado e da coleta de leite cru refrigerado e de seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, n. 183, p. 13-22.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 51, p. 129-135, 1999.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N. **Microbiologia Médica**. 20 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

CAPURRO, A.; ASPÁN, A.; ERICSSON UNNERSTAD, H.; PERSSON WALLER, K.; ARTURSSON, K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.1, 2010.

CARVALHO, G. R. Indústria de laticínios no Brasil. **In**: STOCK, L. A.; ZOCCAL, R.; CARVALHO, G. R. de; SIQUEIRA, K. B. (Org.). Competitividade do agronegócio do leite brasileiro. Brasília: **Embrapa**, 2011. p. 107-131

CASCUDO, L.C. Civilização e cultura. **Pesquisas e notas de etnografia geral**. São Paulo: Global Editora; 2004.

CASTILHO, I.G.; DANTAS, S.T.A.; LANGONI, H.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; FERNANDES JÚNIOR, A.; ALVARENGA, F.C.L.; MAIA, L.; CAGNINI, D.Q.; RALL, V.L.M. Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.100, n. 8, 2017.

COMERÓN E.A. & ANDREO N.A. Produção, industrialização e comercialização do leite orgânico na Argentina. In: 2º SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NO BRASIL, **Anais...**; Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2000.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. São Paulo, fascículo 1, volume 1, p. 003 - 009, 1998.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, p.442-455, 2002.

COSTERTON J, STEWART PS, GREENBERG E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v.284(5418): p.1318-1322, 1999.

CRAMTON, S. E., C. GERKE, N. F. SCHNELL, W. W. NICHOLS, GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v.67, p.5427–5433, 1999.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C. VALLE, J. AMORENA, B.; LASA, I.; PEÑADES, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2888–2896, May 2001.

CUCARELLA, C. TORMO, M.A.; KNECHT, E., AMORENA B.; LASA, I, FOSTER T.J., PEÑADES J.R. Expression of the Biofilm-Associated Protein Interferes with Host Protein Receptors of *Staphylococcus aureus* and Alters the Infective Process. **Infection and immunity**, v. 70, n. 6, p. 3180–3186, 2002.

CUCARELLA, C. TORMO, M.A.; UBEDA, C. TROTONDA, M.P. MONZO M. PERIS, C.; AMORENA, B. LASA, I.; PEÑADES, J.R. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus* **Infection and immunity**, v. 72, p. 2177–2185, Abril, 2004.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; GONZALES, J.A.H.; FREGONESI, O.B. Determinação de gordura, proteína, cobre, ferro, manganês, zinco e contagem de células somáticas no leite de vacas com mastite subclínica **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 169-174, jul./dez. 2001
EMBRAPA. Anuário Leite Embrapa. Embrapa, 2018.

EMBRAPA, Anuário Leite 2018. Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. **Embrapa**, 2018.

FAO & WHO. Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance. **Codex Alimentarius**. CAC/RCP 61-2005. Rome, 2005.

Disponível em:http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BRCP%2B61-2005%252FCXP_061e.pdf
Acesso em: 02/01/19.

FAO & WHO. **Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals.** Codex Alimentarius. CAC/GL 71-2009. Rome, 2009.

Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BGL%2B71-2009%252FCXG_071e_2014.pdf

Acesso em: 02/01/19.

FAO & WHO. **Guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance.** Codex Alimentarius. CAC/GL 77,2011.

Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BGL%2B77-2011%252FCXG_077e.pdf

Acesso em: Janeiro/ 2019.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS **Milk and dairy products in human nutrition**, Roma, 2013.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Dairy Production and Products** – Milk Production, 2016.

Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/>

Acesso em: Dezembro/2019.

FAO & WHO. **Codex texts on foodborne antimicrobial resistance**, 2015.

Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4296t.pdf>. Acesso em: Janeiro/2019.

FAO, **Dairy Market Review**. Roma, Abril, 2018a.

FAO. **Gateway to dairy production and products**

Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/> Acesso: Dezembro 2018b

FAOSTAT. 2011. **FAO statistical database**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>.

Acesso em: Dezembro de 2018.

FELDENS, L. **O homem, a agricultura e a história**. Lajeado: Editora Univates, 2018, 171 p.

FELIPE, V.; MORGANTE, C.A.; SOMALE, P.S.; VARRONI, F.; ZINGARETTI, M.L.; BACHETTI, R.A.; CORREA, S.G.; PORPORATTO, C. Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in Staphylococcus species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. **Microbial Pathogenesis**, v.104, p. 278-286, 2017.

FERREIRO, L.; SOUZA, H.M.; HEINECK, L.A.; Influência da mastite bovina subclínica na composição físico-química do leite de gado mestiço. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 208, p.19-24, 1980.

FISCHER, W.J., TRITSCHER, A.M., SCHILTER, B. & STADLER, R.H. Contaminants of milk and dairy products/ contaminants resulting from agricultural and dairy practices. **In:** Encyclopedia of dairy sciences, Londres, Elsevier Science, v.1, p. 516-532. 2003.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. 2.ed. São Paulo: Lemos editorial, p.175, 2001.

FONSECA L.F.L.; SANTOS M.V. **Qualidade do leite e controle de mastites**. 1.ed. São Paulo, Lemos editorial, p.175, 2000.

FOSTER, T.J.; HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.6, n.12, 1998.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.107, p. 295-299, 2005.

FURTADO, M.F. **Principais problemas dos queijos. Causas e prevenção**. São Paulo, 1999, p.13-17.

GONZALES, F. H. D., DÜRR, J.W., FONTANELI, R. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001. 72 p.

GÖTZ F. Micro Review *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology** v.43(6), p.1367–1378, 2002

GUILHEN, C., CHARBONNEL, V., PARISOT, N., GUEGUEN, N., ILTIS, A., FORESTIER, C., BALESTRINO, D. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. **BMC Genomics**.; 17: 237, 2016.

JUNQUEIRA NB, LANGONI H. Aspectos gerais sobre a mastite bovina causada por *Mycoplasma* spp. **Veterinária e Zootecnia**. 2016, set., 23(3), p. 356-364.

KLEIN, R.C.; SOUZA, G.N.; RIBON, A.O.B. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC Veterinary Research**, 11:3, 2015.

KLEIN, R. C., FABRES-KLEIN, M. H., BRITO, M. A. V. P., FIETTO, L.G.A.; RIBON, 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.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR. **Diagnóstico Microbiológico**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2012.

KRISTIAN, S. A.; GOLDA, T.; FERRACIN, F.; ECRAMTON, S.; NEUMEISTER, B.; PESCHEL, A.; GÖTZ, F.; LANDMANN, R. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. **Microbial Pathogenesis**, v.36, p.237–245, 2004.

LANGONI, H. Mastite bovina: conceitos e fundamentos. **In:** Encontro de Pesquisadores em Mastites, p. 8-17, Botucatu, 2007.

LANGONI, H.; GUIMARÃES, F.F.; COSTA, E.O.; JOAQUIMS.F.; MENOZZI, B.D. Celularidade do leite e Unidades Formadoras de Colônias nas mastites causadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35(6), p.518-524, 2015.

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

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

LUTZ, L.; MACHADO, A.; KUPLICH, N.; BARTH, A.L. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, n.3, p.224-8, 2003.

MAH T.C., O'TOOLE G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, p34-39, 2001.

MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S.; MENDONÇA, E. C. L.; ALENCAR, T.A.; PRIBUL, E.R.; COELHO, S.O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E.B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2013, v. 33(2), p.161-170.

MARQUES, V.F. **Expressão gênica na formação do biofilme e resistência aos beta-lactâmicos em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de leite mastítico bovino**. 2016. (Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias) UFRRJ-INSTITUTO DE VETERINÁRIA, Rio de Janeiro.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea. Editora UNESP; Brasília, 2010, 568p.

MCKENNEY, D., K. L. POULIOT, Y. WANG, V. MURTHY, M. ULRICH, G. DÖRING, J. C. LEE, D. A. GOLDMANN, AND G. B. PIER. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. **Science**. v.284, p.1523–1527, 1999.

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

MELCHIOR, M.B.; VAN OSCH, M.H.J. ; LAM, T.J.G.M.; VERNOOIJ, J.C.M. ; GAASTRA, W.; FINK-GREMMEIS, J.; Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility, **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 926-937, 2011.

MORAIS, C.M.Q. J.; DURÃES, T.S.; NÓBREGA, A.V.; JACOB, S.C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v.30, supl.1, Campinas, 2010.

NADER FILHO, L.M. FERREIRA, L.A. DO AMARAL, O.D. ROSSI JUNIOR, R.P. OLIVEIRA. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4, 2007.

NOGUEIRA, J.M.R., MIGUEL, L.F.S. (2010) Bacteriologia. p. 221-399 **in** MOLINARO, E.M., CAPUTO, L.F.G., AMENODEIRA, M.R.R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: Volume 4. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

OLIVEIRA, G. A.; FARIA, J.B.; LEVY, C.E.; MAMIZUKA, E.M. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, p.163-170, 2001.

OLIVER, S.P.; MURINDA, S.E. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens., Mastitis in Dairy Cows Veterinary Clinics of North America, **Food Animal Practice**, 2012, v.28, n .2, p. 165-185.

O'NEILL, E., C. POZZI, P. HOUSTON, D. SMYTH, H. HUMPHREYS, D. A. ROBINSON, AND J. P. O'GARA. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **Journal of Clinic Microbiology**, 2007, 45:1379.

PEÑA J.; UFFO, O. Biofilm production of *Staphylococcus aureus* genotypes isolated from bovine mastitis in Cuba. **Revista Salud Animal**. 2013, v.35 n.3.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. 2009. **Food Microbiology**. 2009, v.26, p.278–282.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a Mastite**, Westfalia Surge /Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002, 192p.

PONTES NETTO, D., OLIVEIRA M. L.; SCHONDERMARK C.O, PINTO NUNES, M.; MACHINSKI JUNIOR, M. BOSQUIROLI, M.L. BENATTO, S., BENINI, A. BOMBARDELLI, A.L.C; VEDOVELLO FILHO, A.; MACHADO, D. BELMONTE, E.L., ALBERTON, I. PEDROSO, M.P. SCUCATO, E.S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 2005, V. 27.

RAIMONDO, R.F.S **Características físico-químicas e celulares do leite de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo durante o primeiro mês de lactação**: determinação dos valores de referência e das variações durante a fase colostrar. 2006. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

REINERT, C. **Genes de Virulência agr-Dependentes em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina SCCmec Tipo IV isoladas no Brasil**. (Tese de Doutorado), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2006.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3ª Edição. São Paulo, Editora Roca, 2008, 936p.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2009, v. 29(1), p.52-58.

RIVERO, A.F. **Enciclopedia de los alimentos**. Madri. Mercasa, 2007.

ROCHA, D.T.; RESENDE, J.C; MARTINS, P.C. Evolução tecnológica da atividade leiteira no Brasil: uma visão a partir do Sistema de Produção da Embrapa Gado de Leite, **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, v.62, 2018.

RUEGG, P. L. Mastitis in Dairy Cows. **Veterinary Clinics Food Animal**. v.28, 2012.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.320-326, 2004.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1.ed. Barueri: Editora Manole, p.314p, 2007.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. REVIEW *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, vol.43 n.6, 2007.

SAUER, K.; RICKARD, H.; DAVIES, D.G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v.2, n.7, p. 347-353, 2007.

SILVA, N.C.C. GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P., FERNANDES JÚNIOR, A.; E. GÓMEZ-SANZ, E.; GÓMEZ, P. LANGONI, H.; RALL, V.L.M.; TORRES, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Letters in Applied Microbiology**, v.59, p.665-669, 2014.

TAGLIALEGNA A, NAVARRO S, VENTURA S, GARNETT JA, MATTHEWS S, PENADES JR, Staphylococcal Bap Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. **PLoS Pathog**, 12(6), 2016.

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

TORMO, M. A.; UBEDA, C.; MARTÍM., MAIQUES, E.; CUCARELLA, C. VALLE, J. FOSTER, T.J.; LASA, I. PEÑADES, J.R. Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (bap) in *staphylococcus aureus*. **Microbiology**. v.153, p.1702–1710, 2007.

TROTONDA, M.P.; MANNA, A.C.; CHEUNG, A.L.; LASA,I.; PENADES, J.R. SarA positively controls Bap-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, 187 (16), p. 5790-5798, 2005.

UBEDA, C., TORMO, M. A., CUCARELLA, C., TROTONDA, P., FOSTER, T. J., LASA, I.; PENADES, J. R. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. **Molecular Microbiology**, v. 49, p.193–210, 2003.

VELÁZQUEZ-MEZA, M.E. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. **Salud pública de México**, v. 47(5), p.381-387, 2005.

VILELA, D. Para onde caminha o leite. **Revista Balde Branco**, n. 603, p. 41-43, 2015.

VILELA, D.; RESENDE, J.C. LEITE, J.B. ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**. Ano XXVI – n.1, 2017.

WATTS JL. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-66, 1998.

WILKINSON P.; PHILIP N. Mitologia. **Guia Ilustrado Zahar**. 2ª ed. Editora Zahar, 2008.

ZAFALON, L.F.; FILHO, A.N.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.159-163, 2005.

ZUNIGA, E. **Pesquisa de genes codificadores de adesinas em Staphylococcus spp. isolados de mastite bovina.** 2012. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ZWALD, A.G., RUEGG, P.L., KANEENE, J.B., WARNICK, L.D., WELLS, S.J., FOSSLER, C. & HALBERT, L.W. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.191–201, 2004.