

MAGNA CORÔA LIMA

**MASTITE CAPRINA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES  
DAS INFECÇÕES PERSISTENTES POR *Staphylococcus aureus* E  
*Escherichia coli***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L732m  
2018  
Lima, Magna Corôa, 1984-  
Mastite caprina : aspectos epidemiológicos e moleculares  
das infecções persistentes por *Staphylococcus aureus* e  
*Escherichia coli* / Magna Corôa Lima. – Viçosa, MG, 2018.  
xv, 116f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Caprinos - Doenças. 2. Mastite. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

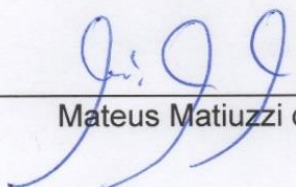
CDD 22 ed. 636.39

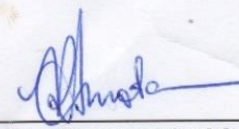
MAGNA CORÔA LIMA

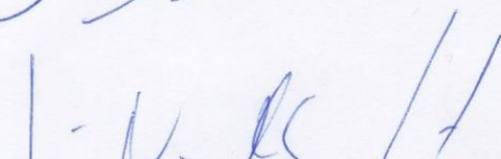
**MASTITE CAPRINA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES  
DAS INFECÇÕES PERSISTENTES POR *Staphylococcus aureus* E  
*Escherichia coli***

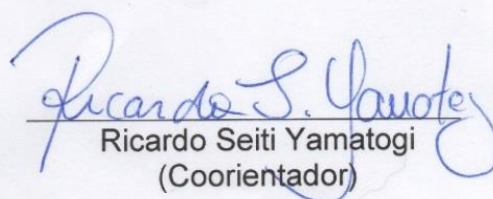
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

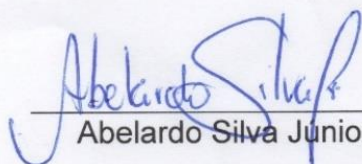
APROVADA: 25 de janeiro de 2018.


  
Mateus Matiuzzi da Costa

  
Rinaldo Aparecido Mota

  
José Dantas Ribeiro Filho  
(Coorientador)

  
Ricardo Seiti Yamatogi  
(Coorientador)

  
Abelardo Silva Junior

  
Maria Aparecida Scatamburlo Moreira  
(Orientadora)

*A minha família, pais, esposo e filhos,  
pelo amor e compreensão, que tornaram possível a realização deste sonho.*

*Dedico*

*“Possuímos em nós mesmos, pelo pensamento e a vontade, um poder de ação que se estende muito além dos limites de nossa esfera corpórea”*

*Allan Kardec*

## AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” Charles Chaplin

A realização dessa tese contou com pessoas importantes que me apoiaram e incentivaram sem os quais não teria tornado esse sonho em uma realidade. Serei eternamente grata.

A Deus pela infinita bondade e misericórdia, por me dar força, saúde e oportunidade de realizar meus sonhos.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira (Cida), pela sua orientação em todas as etapas, disponibilidade incondicional nos finais de semana, a noite e feriados. Por todos ensinamentos, conselhos e confiança depositada em mim. Minha eterna gratidão.

Meu agradecimento especial só poderia ser dado a uma pessoa: meu esposo Wederson.

Por estar durante todo tempo ao meu lado, nos momentos mais difíceis nesses últimos anos, que não foram poucos, sou grata por toda compreensão, incentivo e apoio e por não medir esforços em me auxiliar.

Aos meus filhos Micael e Maria Clara por sempre entender as minhas ausências e serem os maiores inspiradores e incentivadores da minha vida.

A minha mãe Analice e meu pai José Clóvis e a minha irmã, Márcia e a todos da família que sempre me apoiaram, incentivaram, rezaram e torceram durante toda minha caminhada acadêmica.

Aos professores Dantas e Ricardo, disponibilidade e auxílio nas análises em todas as vezes que precisei.

Aos professores Mateus, Rinaldo e Abelardo por aceitar participar da banca.

Ao professor Marcelo (DZO/UFV) por todo auxílio na execução deste trabalho, confiança e amizade, além de deixar o setor de caprinocultura as minhas ordens. Pode contar comigo sempre.

A todos meus professores desde o ensino fundamental, ensino médio e cursinho sem vocês não seria possível chegar até aqui.

Aos meus professores da UFBA, em especial professor Adelmo que muito me incentivou e me despertou o amor pela pesquisa e pelas cabras. Tudo que sei devo em grande parte ao que me ensinou.

A professora Simone que muito me ensinou, incentivou, apoiou e me fez amar a rotina de laboratório durante todas as conversas ao preparamos material, jamais esquecerei. A todos professores do Departamento de Veterinária da UFV pelos ensinamentos e agradável convivência durante esses 4 anos e meio.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária e ao Setor de Caprinocultura, e aos produtores de leite de cabra da Zona da Mata de Minas Gerais. A todos meus queridos bolsistas de iniciação que contribuíram imensamente para realização deste trabalho: Pedro, Jéssica, Geórggio, Laís e Samuel. Gratidão.

Aos meus amigos e colegas do LDBAC David, Isis, Marina, Mariana, Richard, Natasha, Sanely, Núbria, Jéssica e Junnia pelo auxílio e convivência agradável.

Aos colegas de PPG por todo apoio e auxílio durante esse período do doutoramento, em especial a Thalita e o Richard que muito auxiliou na execução e interpretação das análises moleculares.

Aos funcionários do setor de Medicina Veterinária Preventiva Marquinhos, Alex, Nívea em especial ao Luiz Carlos por toda disposição em ajudar, ensinamentos e alegria contagiante. A secretária da Pós-Graduação Rosi pelo carinho, dedicação, eficiência e disponibilidade.

Ao CNPq pelo financiamento deste projeto, a Capes pela concessão da bolsa de estudos e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos meus gatos Tom e Ariel companheiros de madrugada.

Agradecimento especial ao grupo Bolsistas Capes do “Facebook”, onde juntamente com colegas de todo Brasil, compartilhamos as angustias, pequenas alegrias e risos diários. Aos meus colegas da Univiçosa que e torceram e incentivaram me acalmando todas as vezes que precisei na árdua missão concluir o doutorado e ser professora. Minha eterna gratidão.

A todos meus alunos por serem meus incentivadores, que me instigam sempre a aprender mais e pela convivência amigável e agradável.

Há muito mais a agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas em inesquecíveis meu reconhecido e carinhoso muito obrigado.

## BIOGRAFIA

Magna Coroa Lima, filha de José Clóvis de oliveira Lima e Analice Coroa Lima. Nascida em 25 de maio de 1984 em Salvador – BA.

Em 2005 iniciou a graduação em Medicina Veterinária na Universidade federal da Bahia, neste mesmo ano iniciou a participação no projeto de extensão conexões de saberes, onde permaneceu durante dois anos. Realizou diversos estágios e projetos de iniciação científica nesta universidade e em 2010 concluiu a graduação.

Em 2011 iniciou o mestrado no programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de *Magister Scientiae* em Zootecnia em março de 2013.

Em agosto de 2013 iniciou o doutorado no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa. Em 2016 iniciou foi aprovada no processo seletivo para professora do ensino superior na Univiçosa onde segue até o presente momento. Em janeiro de 2018 concluiu seu doutoramento.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVOS .....	8
Capítulo I: Tratamento da mastite caprina- Uma revisão sistemática .....	9
1. Introdução.....	10
2. Métodos .....	12
3. Resultados e Discussão.....	12
4. Conclusões.....	25
6. Referências .....	26
Capítulo II: Mastitis in dairy goats from the State of Minas Gerais, Brazil: Profiles of properties, risk factors and characterization of bacteria .....	30
1. Introduction.....	33
2. Material and Methods .....	35
3. Results .....	37
4. Discussion .....	44
5. Conclusions.....	49
6. References .....	49
Capítulo III –Infecção intramamária persistente por <i>Staphylococcus aureus</i> após tratamento com enrofloxacina.....	65
1. Introdução .....	67
2. Material e Métodos.....	66
3. Resultados .....	76
5. Discussão.....	82
6. Conclusão .....	88
7 Agradecimentos.....	88
8. Referências .....	88
ANEXO .....	94
Capítulo IV - Diversidade de <i>Escherichia coli</i> isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite.....	95

1. Introdução.....	97
3. Resultados e discussão .....	103
4. Conclusão.....	111
5. Referências .....	112
CONCLUSÃO GERAL .....	115
ANEXO .....	116

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1: Fluxograma dos artigos selecionados para o trabalho.....13

### Capítulo II

Figure 1. Location of the mesoregion Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil, with microregion.....35

Figure 2. Distribution of bacterial species obtained from dairy goats with mastitis of mesoregion of Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil .....42

### Capítulo III

Figura 1. Dendrograma dos perfis de PFGE gerado pela análise UPGMA/Dice (Bionumerics, Applied Maths) dos 18 isolados de *Staphylococcus aureus* (com 95 % de similaridade e 5% de tolerância e otimização).....77

### Capítulo IV

Figura 1. Dendrograma de PFGE gerado usando UPGMA/Dice (BioNumerics) de 12 isolados de *Escherichia coli* de amostras de leite de cabras com mastite.....109

Figura 2. Ensaio de adesão e invasão em células epitelial mamária bovina (MAC-T) de *Escherichia coli* isoladas de cabras leiteiras com mastite clínica, persistente e subclínica.....110

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1: Lista de trabalhos científicos incluídos na revisão sistemática.....	14
--	----

### Capítulo II

Table 1. Oligonucleotides used to identify bacteria isolated from goat milk with clinical and subclinical mastitis.....	36
---	----

Table 2. Prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy goats, by microregion that compose the mesoregion of the Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil.....	40
--	----

Table 3. Multivariate analysis with the distribution of variables related to management and associated with risk factors for mastitis in dairy goats from the Zona da Mata of Minas Gerais.....	40
---	----

Table 4. Distribution of Gram positive bacteria obtained from dairy goats with mastitis of mesoregion of Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil.....	44
--	----

### ANEXOS

Table 1. Profile of antimicrobial Gram positive bacteria.....	58
---	----

Table 2. Profile of antimicrobial Gram positive bacteria.....	62
---	----

### Capítulo III

Tabela 1. Primers utilizados para a detecção genes housekeeping de <i>Staphylococcus aureus</i> para realização da técnica de Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	69
---	----

Tabela 2. Primers utilizados na detecção de genes de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento através da técnica de PCR.....	74
--	----

Tabela 3. Primers utilizados para detecção de genes de sistema de efluxo multidrogas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento através da técnica de PCR.....	75
--	----

Tabela 4. Primers utilizados para detecção do perfil de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento através da técnica de PCR.....	75
--	----

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) ( $\mu\text{g/ml}$ ) de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento, utilizando o E-test (bioMerieux).....79

Tabela 6: Perfis de resistência, de virulência e clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras leiteiras com mastite antes e após o tratamen.....81

Tabela 7. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* frente a antimicrobianos pelo método de difusão e disco (Kirby-Bauer).....83

## Capítulo IV

Tabela 1: Padrão de resistência e índice de resistência múltipla (IRMA) de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite.....104

Tabela 2. Perfil de resistência de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite.....105

Tabela 3 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite.....106

## RESUMO

LIMA, Magna Coroa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2018. **Mastite caprina: aspectos epidemiológicos e moleculares das infecções persistentes por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: José Dantas Ribeiro Filho e Ricardo Seiti Yamatogi.

A mastite é uma enfermidade de grande importância nos ruminantes, principalmente nos animais com aptidão leiteira, causando prejuízos econômicos diretos e indiretos além de riscos à saúde dos consumidores de leite e derivados, pois esses alimentos podem veicular microrganismos patogênicos e/ou toxinas. Este estudo objetivou revisar quanto aos tratamentos para mastite caprina, identificar e caracterizar as bactérias isoladas de leite de cabras com diferentes mastites, determinar o perfil das propriedades e os fatores de risco para mastite, identificar alterações da infecção intramamária persistente por *Staphylococcus aureus* após o tratamento com enrofloxacin e avaliar a diversidade de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com mastite clínica, subclínica e persistente. Um total de 539 cabras em lactação foram examinados e 268 amostras individuais de leite (uma/teto) foram coletadas de animais positivos no teste da caneca de fundo escuro e/ou Califórnia Mastitis teste (CMT). A prevalência de mastite subclínica foi de 28,0% e da clínica, 2,8%. A multiplicação bacteriana foi obtida em 62,0% das amostras. Um total de cento e oitenta e sete bactérias foram identificadas (fenotípica e genotípica). As espécies mais isoladas foram *S. aureus* (60,4%), *Staphylococcus epidermidis* (9,1%), *Escherichia coli* (6,9%), *Staphylococcus saprophyticus* (5,9%) e *Staphylococcus caprae* (4,3%). No gênero *Staphylococcus* predominou perfil de resistência à classe de beta-lactâmicos: penicilina, ampicilina e oxacilina, além da tetraciclina. Doze por cento dos isolados apresentaram resistência múltipla a antimicrobianos (MDR). Entre as bactérias com maior prevalência de MDR, 38,5% *E. coli* e 10,6% *S. aureus*. Os produtores são tecnificados, trabalham com raças leiteiras especializadas e possuem bom manejo. Os fatores de risco: ordenha manual, utilização de cama, baixa frequência de limpeza dos bebedouros, intervalo entre partos menor de 12 meses. *S. aureus* isolado de mastite persistente após o tratamento com enrofloxacin foi encontrado somente um complexo clonal, (133) e apresentaram pulsotipos idênticos ou estreitamente relacionados, confirmando a persistência. Nos isolados após o tratamento com enrofloxacin aumentaram a concentração inibitória mínima para enrofloxacin, ampicilina e

gentamicina. Houve pouca variação na presença dos genes de resistência, entretanto para genes de sistema de efluxo multidrogas variaram consideravelmente. A presença do *gene norA* aumentou em 50% nos isolados obtidos após o tratamento. A resistência antimicrobiana é o fator predominante na persistência mastite caprina. Foram encontrados 15 *E. coli*, sendo: nove (60,0 %) de mastite subclínica, quatro (26,7 %) de clínica e dois (13,3 %) de persistente. Houve maior número de isolados apresentando resistência frente a cefatofur, tetraciclina e cefalexina e o índice de resistência múltipla ocorreu em 33,3 %, variando de 0,2 a 0, 5. *E. coli* obtidos de animais com mastite clínica, a CIM foi maior para tetraciclina, ampicilina e gentamicina, os obtidos de mastite persistente apresentaram valores maiores da MIC frente a tetraciclina, ampicilina, cefoperazona e ciprofloxacina, e os isolados de animais com mastite subclínica observou-se maiores MIC para tetraciclina e cefoperazona. No perfil clonal não houve associação entre o *cluster* e o tipo de mastite. *E. coli* isolados de cabras com mastite persistente possui maior capacidade de adesão e invadem as células epiteliais mamária bovina (MAC-T). São necessários mais estudos para validar a eficácia e segurança dos antimicrobianos para tratamento da mastite caprina. As propriedades da Zona da Mata de Minas Gerais os Produtores são bem instruídos e tecnicados, criam raças especializadas na produção de leite, e não possuem assistência veterinária. *Staphylococcus aureus* foi a bactéria mais isolada com perfil de resistência principalmente aos beta-lactâmicos. *Escherichia coli* foi a bactéria Gram negativa mais prevalente. Foram observadas alterações nos perfis de resistência nos isolados de *S. aureus* obtidos após o tratamento com enrofloxacin. Não há uma relação entre os perfis estudados de *E. coli* e o tipo de mastite, entretanto *E. coli* isolados de cabras com mastite persistente apresentou maior capacidade de adesão e invasão.

## ABSTRACT

LIMA, Magna Coroa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2018. **Goat mastitis: epidemiological and molecular aspects of persistent infections by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: José Dantas Ribeiro Filho and Ricardo Seiti Yamatogi.

The mastitis is one disease of great importance ruminants, mainly animals with dairy fitness, causing direct and indirect economic losses, risks to the health of consumers of milk and milk products, as these foods may carry pathogenic microorganisms and / or toxins This study objected revise how many treatments for goats mastitis, identify and characterize the bacteria isolated from goat leite with different mastites, determine or profile the farms of the mastitis, identify alterations of persistent intramammary infection by *Staphylococcus aureus* after or enrofloxacin treatment and to evaluate the diversity of *Escherichia coli* isolates of dairy goats with clinical mastitis, subclinical and persistent. A total of 539 goats in lactation foram examined in 268 individual samples of milk (one / teat) was coleted of positive animals strip cup testo r Califórnia Mastitis test (CMT). A prevalence of subclinical mastitis was 28.0% and clinic, 2.8%. A bacterial multiplication was obtained in 62.0% of the days. A total of seven cents and seven identified bacteria (phenotypic and genotypic). As well as more isolates were *S. aureus* (60.4%), *Staphylococcus epidermidis* (9.1%), *Escherichia coli* (6.9%), *Staphylococcus saprophyticus* (5.9%) and *Staphylococcus caprae* (4.3%). Genus *Staphylococcus* predominated resistance profile à class of beta-lactamics: penicillin, ampicillin and oxacillin, besides the tetracycline. Twelve percente of isolates presented multiple antimicrobial resistance (MDR). Among the bacterias by greater prevalence of MDR, 38.5% *E. coli* and 10.6% *S. aureus*. The producers are technified, work with specialized dairy breeds and have good management. Risk factors: manual milking, utilization of bed, low frequency of cleaning two drinkers, interval between parturition less than 12 months. *S. aureus* isolated of persistent mastitis after treatment with enrofloxacin was found only one clonal complex (133) and apresented identical pulsotypes or closely related, confirming persistence. The isolates afther treatment of enrofloxacin increased concentration inhibitory minimal for enrofloxacin, ampicillin and gentamicin. There was no variation for resistenfe genes, the genes of multidrug pump efflux varied. The presence of *norA* gene increased in 50% isolates obtained após or treatment. Antimicrobial resistance is factor

predominant of persistence goat mastitis. Foram found 15 *E. coli*: Nine (60.0%) of subclinical mastitis, four (26.7%) of clinic and two (13.3%) of persistente. There was number of isolates exhibiting resistance to cefatofur, tetracycline and cephalixin and resistance index multipla in 33.3%, varying from 0.2 to 0, 5. *E. coli* obtained from animais with clinical mastitis, to MIC increased. For tetracycline, ampicillin and gentamicin, obtained of persistent mastitis presented higher values of MIC against tetracycline, ampicillin, cefoperazone and ciprofloxacin, the isolates of animals with subclinical mastitis observed MICs for tetracycline and cefoperazone. The clonal profile there was no association between or cluster and o type of mastite. *E. coli* isolates of goats with persistent mastitis have increased fitness of adhesion and invasion of mammary bovine epithelial cells (MAC-T). There are more studies to validate the effectiveness and safety of two antimicrobials for goat mastitis treatment. As farms of Zona da Mata of Minas Gerais, farmers are trained and technified, specialized breeds of goat milk and not have veterinary assistance. *Staphylococcus aureus* is bacteria with a resistance profile mainly beta-lactams. *E. coli* was more prevalent Gram negative bacteria. Foram observed alterações nos perfis de resistência we isolados of *S. aureus* obtidos após or tratamento com enrofloxacin. There is not relationship between *E. coli* and type of mastitis. *E. coli* isolated from goats with persistent mastitis apresented greater capacity of adhesion and invasion.

## INTRODUÇÃO GERAL

O leite de cabra é consumido no mundo desde os primórdios da humanidade, estando na maioria dos países relacionados a subsistência das populações, especialmente nas regiões áridas e semiáridas do mundo devido a facilidade de adaptação dos caprinos a essas regiões. A produção e comercialização de leite de cabra e derivados vem aumentando consideravelmente pelo conhecimento do valor nutricional e propriedades nutracêuticas, sendo consumido principalmente por idosos, crianças e pessoas com problemas de saúde.

O consumo do leite de cabra e derivados no Brasil ainda é baixo comparado as outras espécies leiteiras, bovinos e bubalinos, devido ao custo elevado, baixa oferta, preconceito e sazonalidade dos produtos no mercado nacional. A maioria do leite caprino no Brasil é produzido na região Nordeste, devido a maior concentração das cabras nesta região do país, entretanto a produtividade é baixa e há sazonalidade. Além disso, o leite e derivados produzidos são consumidos no local ou próximo ao local de produção.

Na região Sudeste do Brasil, a caprinocultura leiteira tem expandido nas últimas cinco décadas, os produtores investiram em animais especializados em produção de leite por meio de importação de animais e material genético, concretizando uma cadeia de leite caprino especializada no Brasil. Minas Gerais é o estado com maior produção da região Sudeste e referência em tecnologia e genética, contudo alguns entraves limitam a atividade, especialmente de ordem sanitária; dentre os problemas sanitários, a mastite. A mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais é composta de sete microrregiões detém, aproximadamente, 20% do rebanho da região Sudeste. É uma região de grande relevância na produção de leite de cabra do país, entretanto há pouco conhecimento a respeito das características dos produtores e das propriedades.

A mastite é uma doença de grande importância nos ruminantes, principalmente nos animais com aptidão leiteira, causando prejuízos econômicos diretos e indiretos além de riscos à saúde dos consumidores de leite e derivados, pois esses alimentos podem veicular microrganismos patogênicos e/ou toxinas, caso não haja um conjunto de ações preventivas desde a sua produção, sanidade do úbere e do animal até a sua chegada ao consumidor final. A mastite caprina, particularmente a forma subclínica, representa um problema no diagnóstico, principalmente em regiões onde não se dispõe de pessoal e equipamentos especializados. A grande quantidade de células

epiteliais e partículas anucleadas presentes no leite de cabra, em virtude do tipo de secreção láctea ser predominantemente apócrina, enquanto que nos bovinos a secreção láctea é do tipo merócrina, o que diferencia a interpretação da contagem de células somáticas, interferindo significativamente com os testes de rotina como o Califórnia Mastitis Test (CMT) utilizados para detectar a forma subclínica da doença. Para evitar resultados falsos positivos sugere-se utilizar a lactocultura para confirmação, por ser a técnica considerada padrão ouro para o diagnóstico da mastite.

Os antimicrobianos são a primeira escolha no tratamento da mastite, o protocolo normalmente é estabelecido baseado nos testes de susceptibilidade *in vitro*, entretanto mesmo sendo susceptível *in vitro*, o sucesso da terapia desaponta em muitos casos. Além disso há poucos estudos disponíveis sobre a eficácia, isto é cura clínica e bacteriológica, resultantes da antibioticoterapia parenteral ou intramamária em caprinos.

É conhecido que para o desenvolvimento da doença é necessário a perda do equilíbrio da relação animal, ambiente e agente etiológico (Teoria Ecológica). Estudos envolvendo isolamento e caracterização do agente etiológico da mastite é essencial para o adequado entendimento dos fatores relacionados ao agente que podem desencadear a mastite na espécie caprina. Há poucos trabalhos na literatura com esse tema e não há conhecimento sobre a caracterização dos microrganismos antes e após o tratamento (mastite e mastite persistente/recidivante), apesar da mastite ser um dos grandes problemas em rebanhos leiteiros. Pouco se conhece sobre o perfil das propriedades e fatores de risco para mastite na Zona da Mata de Minas Gerais, região de relevância na produção de leite caprino do Brasil. O que justifica esse estudo.

As glândulas mamárias são glândulas epiteliais modificadas que aparecem no início da vida embrionária no ectoderma embrionário. Sua função é a produção e secreção de leite e pode ser extirpada em qualquer momento da vida sem qualquer desordem (Klein, 2014).

A estrutura da glândula mamária das cabras consiste em duas glândulas separadas anatomicamente e funcionalmente, com um teto cada uma. Há entre seis e nove grandes ductos de leite que se juntam para formando a cisterna da glândula. A cisterna da glândula se mistura com a cisterna do teto, que termina em um único canal e uma única abertura do teto. O maior suprimento de sangue é fornecido pela

artéria pudenda externa. O retorno venoso é através da veia pudenda externa e subcutânea veia abdominal (Smith et al., 2009).

O úbere transforma os materiais recebidos no sangue em seus produtos específicos de secreção: proteínas, gorduras, lactose, sais minerais e vitaminas. O sangue carregado de princípios nutritivos é transportado pelas paredes dos capilares do úbere para os alvéolos. As células secretoras devem ser amplamente irrigadas; a atividade circulatória, embora muito grande, é lenta, o sangue permanece por muito tempo em contato com os tecidos da glândula, e uma rede capilar fina permite a troca de substâncias (Climent et al, 2005).

A atividade da glândula é regulada pelo sistema endócrino durante o ciclo sexual das fêmeas. O crescimento do úbere é estimulado pela progesterona e estrogênio durante a prenhez, a placenta aumenta a secreção de estrogênio, o que estimula a secreção da prolactina, que por sua vez inicia a lactação pelas células epiteliais do úbere. O rápido aumento da secreção de estrogênio no final da prenhez supera a função fisiológica da progesterona, estes estimulam a secreção da prolactina e inicia a lactação. Nas cabras há um aumento da prolactina após 1 ou 2 minutos de iniciar os estímulos de sucção e este aumento é mantido até aproximadamente 15 minutos depois (Climent et al, 2005).

A ejeção do leite é produzida por um movimento reflexo, estimulado pela mesma ação de sucção. O teto é muito rico em nervos, que atuam como receptores a nível da pele. Este reflexo atinge o hipotálamo onde causa a liberação do hormônio oxitocina do lóbulo posterior da glândula pituitária. Nas cabras é provado que esta ação reflexa é menos importante que nas vacas. O sistema vascular dos mamilos é formado por uma boa rede de capilares (Climent et al, 2005).

A mastite é uma inflamação da glândula mamária cuja etiologia normalmente é causada por bactérias, entretanto é uma enfermidade multifatorial, envolvendo diversos patógenos, o ambiente e fatores inerentes ao animal. Possui alta frequência de doenças em rebanhos leiteiros, podendo ser classificada em clínica ou subclínica. A mastite clínica é detectada pelos sinais de inflamação e/ou pela presença de grumos, flocos, ou anormalidade na coloração ou na consistência no leite, nos primeiros jatos de ordenha. Na mastite subclínica, os animais, aparentemente, estão saudáveis e para sua determinação são utilizados o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS)(Pugh and Baird, 2012; Smith et al., 2009). O aumento dessas células no leite ocorre devido ao combate dos microrganismos infecciosos,

através da fagocitose e reparação dos tecidos de secreção de leite danificados pela infecção ou lesão (Pantoja et al., 2009).

A mastite constitui o principal problema sanitário devido à alta prevalência e ligação direta com custos na linha de produção, saúde do rebanho e do consumidor, levando a redução na produção de leite e de seus derivados, alterações na composição do leite e nos casos de maior severidade e cronicidade leva ao descarte do animal, além do risco potencial à saúde pública, seja pela presença dos patógenos e/ou toxinas liberadas no leite, assim como resíduos de antimicrobianos (Bergonier et al., 2003; Contreras and Rodríguez, 2011; Peixoto et al., 2010b).

Esta doença é ocasionada por vários microrganismos que podem ser classificados em agentes contagiosos e ambientais. Os contagiosos são transmitidos fundamentalmente no momento da ordenha ou no ato de mamar do filhote e são representados por *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), como *S. epidermidis* e *S. caprae*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium* spp. Enquanto que os agentes ambientais são transmitidos antes e após as ordenhas e incluem principalmente as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klesbsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*), *Nocardia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, fungos e algas (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007).

Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* têm merecido atenção especial, pois esta bactéria é responsável por dois tipos graves de mastite, a mastite gangrenosa e a mastite subclínica, sendo o tratamento difícil, devido à elevada resistência *S. aureus*, produção de toxina, o que contribui na patogênese da mastite e ter papel em intoxicações alimentares, mesmo no leite pasteurizado (Contreras et al., 2007).

O uso de antimicrobianos ou outras drogas de bovinos em pequenos ruminantes, ou até mesmo o uso de produtos indicados para ovinos em caprinos, constituem um alto risco devido à segurança e eficácia destes produtos em cada espécie, por serem em grande parte desconhecidos (Mavrogianni et al., 2004).

O uso excessivo de antimicrobianos favorece o evento da resistência antimicrobiana, o que tem se tornado um problema tanto para animais como para humanos (Contreras et al., 2007).

Relatos de testes de susceptibilidade confirmaram que nas últimas décadas, patógenos isolados de casos de mastite têm permanecido susceptíveis aos agentes

antimicrobianos, entretanto, o sucesso da terapia desaponta em muitos casos, não melhorando a saúde do úbere, e as contagens de células somáticas continuam altas ou, se diminuem, retornam a aumentar em um curto espaço de tempo (Eskine et al., 2002).

O fenômeno, denominado persistência bacteriana, foi relatado pela primeira vez para infecções estafilocócicas tratadas com penicilina e tem sido observada em muitas espécies bacterianas. Apesar de ser observado quase Há 60 anos, o mecanismo por trás da persistência continua sendo um enigma (Lewis, 2000).

A persistência das infecções intramamárias causadas por *S. aureus* deve-se a habilidade intrínseca de se adaptar ao hospedeiro, contribuindo para um quadro persistente da doença (Bayles et al., 1998; Buzzola et al., 2007). Infecções causadas por *S. aureus* são geralmente refratárias a tratamentos com antibióticos (Witte et al., 2008). Muitas espécies bacterianas diferentes são capazes de causar mastite. A interação inicial do patógeno invasor com o sistema imune do hospedeiro, a resposta imune inata, é importante para o desfecho da infecção. Os mediadores da inflamação são conhecidos por desempenhar papéis críticos na resposta imune inata a infecção intramamária (Zbinden et al., 2014).

*Staphylococcus aureus* geralmente é capaz de evitar uma resposta inflamatória aguda porque não induz a liberação das principais citocinas pró-inflamatórias (Bannerman, 2009). Invasão de *S. aureus* geralmente resulta em infecção (sub)clínico persistente que permanece no úbere por muito tempo através da adesão às células epiteliais, da sobrevivência intracelular e da formação de micro abscessos, protegendo-os da eliminação pelo sistema imunológico e antibióticos (Almeida et al., 1996).

Embora existam diferenças claras entre as espécies bacterianas na sua capacidade de causar infecções persistentes, esta não é uma história em preto e branco. Dentro das mesmas espécies bacterianas, as cepas diferem em sua capacidade de causar infecção persistente (Haveri et al., 2007).

Infecções persistentes causadas por *S. aureus* podem ser uma preocupação, tornam-se mais difíceis de curar, desencadeiam temporariamente a mastite clínica e se tornam uma fonte potencial de infecção para os indivíduos do rebanho. O efeito da terapia prolongada de mastite clínica persistente não foi encontrado na mastite com *S. aureus* como agente etiológico, sendo benéfico para certas cepas dentro de uma espécie bacteriana, isto é, para *S. aureus*  $\beta$ - lactamase negativa (Sol et al., 2000).

## Referências

- Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J., Oliver, S.P., 1996. Staphylococcus aureus Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells. J. Dairy Sci. 79, 1021–1026.
- Bannerman, D.D., 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. J. Anim. Sci. 87, 10–25.
- Bayles, K.W., Wesson, C. a, Liou, L.E., Lawrence, K., Bohach, G. a, Trumble, W.R., Fox, L.K., 1998. Intracellular Staphylococcus aureus Escapes the Endosome and Induces Apoptosis in Epithelial Cells Intracellular *Staphylococcus aureus* Escapes the Endosome and Induces Apoptosis in Epithelial Cells. Infect Immun 66, 336–342.
- Bergonier, D., Crémoux, R. de, Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X., 2003. Mastitis of Dairy small ruminants. Vet. Res. 33, 239–250.
- Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscher, L.P.N., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvino, L., Sordelli, D.O., 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. Infect. Immun. 75, 886–891.
- Climent, S., Sarasa, M., Muniesa, P. y Latorre, R. 2005. Manual de Anatomía y Embriología de los Animales Domésticos. Acribia. Zaragoza. 433 pp.
- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J., Gonzalo, C., 2007. Mastitis in small ruminants. Small Rumin. Res. 68, 145–153.
- Contreras, G.A., Rodríguez, J.M., 2011. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 16, 339–356.
- Eskine, R.J., Walker, R.D., Bolin, C.A., Bartlett, P.C., White, D.G., 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci. 85, 1111–1118.
- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., Pyörälä, S., 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. J. Appl. Microbiol. 103, 993–1000.

- Klein, B.G., 2014. A Glândula Mamária, in: Elsevier (Ed.), Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária. Rio de Janeiro, p. 239.
- Lewis, K., 2000. Programmed Death in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 503–514.
- Mavrogianni, V.S., Alexopoulos, C., Fthenakis, G.C., 2004. Field evaluation of flunixin meglumine in the supportive treatment of caprine mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 373–375.
- Pantoja, J.C.F., Reinemann, D.J., Ruegg, P.L., 2009. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. *J. Dairy Sci.* 92, 4978–4987.
- Peixoto, R. de M., Mota, R.A., da Costa, M.M., 2010. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 754–762.
- Pugh, D.G., Baird, A.N., 2012. *Sheep and goat Medicine*, second ed. ed. Maryland Heights, Missouri.
- Smith, M.C., Smith, M.C., Sherman, D.M., Sherman, D.M., 2009. *Goat Medicine*, 2nd Edition [Hardcover].
- Sol, J., Sampimon, O.C., Barkema, H.W., Schukken, Y.H., 2000. Factors Associated with Cure after Therapy of Clinical Mastitis Caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 83, 278–284.
- Witte, W., Cuny, C., Klare, I., Nubel, U., Strommenger, B., Werner, G., 2008. Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 365–367.
- Zbinden, C., Stephan, R., Johler, S., Borel, N., Bünter, J., Bruckmaier, R.M., Wellnitz, O., 2014. The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PLoS One*.

## OBJETIVOS

- Revisar a literatura científica quanto aos tratamentos para mastite caprina encontrados até o presente momento.
- Fazer o levantamento das bactérias obtidos de leite de animais com mastite em cabras leiteiras e caracterizar-lás quanto ao perfil de resistência.
- Caracterizar o perfil das propriedades e determinar os fatores de risco associado a esta enfermidade na Zona da Mata de Minas Gerais.
- Identificar alterações genotípicas e fenotípicas em *S. aureus* isolados de cabras com mastite persistente antes e após o tratamento.
- Avaliar a diversidade de *Esherichia coli* isolados de cabras leiteiras com mastite clínica, subclínica e persistente.

## **Capítulo I: Tratamento da mastite caprina- Uma revisão sistemática**

(Artigo a ser submetido a Small Ruminant Research)

## Tratamento da mastite caprina- Uma revisão sistemática

Magna C. Lima<sup>1</sup>, José D. Ribeiro Filho<sup>2</sup>, Maria A. S. Moreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Doenças bacterianas (LDBAC), Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Avenue PH Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, MG. 36570-900, Brazil. \* Autor para correspondência: [masm@ufv.br](mailto:masm@ufv.br)

<sup>2</sup> Setor de Clínica Médica de Ruminantes e Equinos, Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

**Resumo:** A mastite constitui o principal problema sanitário devido à alta prevalência e ligação direta com custos na linha de produção, saúde do rebanho e do consumidor. Apesar da importância da caprinocultura no mundo, poucas substâncias são licenciadas especificamente para o tratamento das doenças nos caprinos. A maioria dos medicamentos utilizados no tratamento da mastite caprina geralmente é testada e registrada para uso em bovinos, o que pode ser um problema em relação a eficácia, período de carência e segurança. A presente revisão objetivou fazer um levantamento dos tratamentos usados para mastite caprina encontrados na literatura científica até o presente momento. Foram pesquisados todos os estudos sobre tratamento da mastite caprina, independentemente da data da publicação nas bases indexadoras: Agris, Lilacs, Science direct databases, Scielo, Scopus, PubMed e Google acadêmico. Somente artigos originais publicados em revistas indexadas foram incluídos na revisão. Foram encontrados 33 artigos que abordaram tópicos relacionados ao tratamento da mastite caprina, como: diferentes vias de aplicação de drogas, única e/ou em combinação (sistêmica e intramamária); terapia associada com anti-inflamatórios e tratamentos alternativos a base de compostos bioativos e tratamento cirúrgico, além de estudos envolvendo a farmacocinética e farmacodinâmica das substâncias. Verificou-se um baixo número de artigos científicos voltados para essa temática e devido a relevância da atividade da caprinocultura leiteira, há necessidade de mais estudos com objetivo de desenvolvimento e validação de drogas específicas para caprinos bem como a alertar a indústria farmacêutica para o problema.

### 1. Introdução

A produção de leite de cabra faz parte da indústria mundial de laticínios e concorre com leite e derivados de vacas, búfalas e ovelhas. O leite de cabra possui

ainda uma pequena participação no mercado mundial de leite, embora seja o suprimento básico de leite em muitos países em desenvolvimento produzidos para subsistência ou suprindo o comércio local. Paradoxalmente nos países desenvolvidos a maior parte da produção leite caprino é destinado para produção de derivados com alto padrão de qualidade, como a produção de queijos finos (Dubeuf et al., 2004). A produção de leite de cabra vem crescendo continuamente nos últimos 20 anos, devido ao reconhecimento do valor nutricional e propriedades nutracêuticas (Kumar et al., 2016).

Entre os continentes, a Ásia é o maior produtor de leite de cabra (58,35%), seguida da África (24,14%), Europa (14,21%) e Américas (3,31%). Na Ásia, os maiores produtores de leite de cabra são: Índia, Bangladesh, Paquistão e Turquia, entre os países africanos são: Sudão, Mali, Somália, Quênia e a Argélia. Na Europa os maiores produtores são França, Espanha e Grécia, enquanto no continente americano são: Jamaica, México e Brasil (FAO, 2013).

Em rebanhos leiteiros, a mastite constitui o principal problema sanitário devido à alta prevalência e ligação direta com custos na linha de produção, saúde do rebanho e do consumidor levando a redução na produção de leite e de seus derivados, além do risco potencial à saúde pública, seja pela presença dos patógenos e/ou toxinas liberadas, assim como resíduos de antimicrobianos (Contreras et al., 2007).

Apesar da importância da caprinocultura no mundo, poucas substâncias são licenciadas especificamente para o tratamento das doenças nos caprinos. As empresas farmacêuticas são, em geral, relutantes em desenvolver e registrar drogas para cabras, principalmente porque o mercado global parece ser pequeno e suas despesas não seriam justificadas. Consequentemente, muitos médicos veterinários utilizam nas cabras medicamentos licenciados para ovelhas ou mesmo de vacas, com a crença de que sua segurança e eficácia são semelhantes (Dubeuf et al., 2004).

A maioria dos medicamentos utilizados no tratamento da mastite caprina geralmente é testada e registrada para uso em vacas, esta situação leva frequentemente a utilização de protocolos estabelecidos e testados para vacas, o que pode ser um problema em relação a eficácia terapêutica, bem como o período de carência e eliminação do medicamento, essas extrapolações na maioria das vezes não são válidas para cabras (Ferrini et al., 2010).

Há poucos dados disponíveis de ensaios clínicos sobre a eficácia no tratamento da mastite caprina, isto é cura clínica e bacteriológica, resultantes da terapia

antimicrobiana pela via parenteral ou intramamária em caprinos. A presente revisão objetivou fazer um levantamento dos tratamentos para mastite caprina encontrados na literatura científicas até o presente momento.

## **2. Métodos**

Foram pesquisados todos os estudos sobre tratamento da mastite caprina, independentemente da data da publicação nas bases indexadoras: Agris, Lilacs, Science direct databases, Scielo, Scopus, PubMed e Google acadêmico. Somente artigos originais publicados em revistas indexadas foram incluídos na revisão (Fig.1).

As palavras-chave utilizadas para esta pesquisa foram as seguintes: “tratamento da mastite caprina”, “terapia da mastite caprina”, “treatment goats mastitis”, “treatment caprine mastitis”, “therapy mastitis goat”, “tratamiento mastitis caprina” e “terapia mastitis caprina”. Estas palavras chave foram escritas nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola.

## **3. Resultados e Discussão**

Não foram encontrados artigos relativos a tratamentos da mastite caprina na língua espanhola. Foram encontrados somente 33 artigos relacionados com a proposta da presente revisão (Figura 1). Os artigos selecionados abordaram diferentes tópicos relacionados ao tratamento da mastite caprina, como: diferentes vias de aplicação; antibioticoterapia sistêmica, intramamária e a combinação das duas; terapia associada com anti-inflamatórios e tratamentos alternativos a base de compostos bioativos. Também foram selecionados artigos discutindo tratamentos utilizando mastectomia em conjunto com a antibioticoterapia, além de trabalhos relacionados a farmacocinética e farmacodinâmica de drogas visando o uso na mastite caprina.

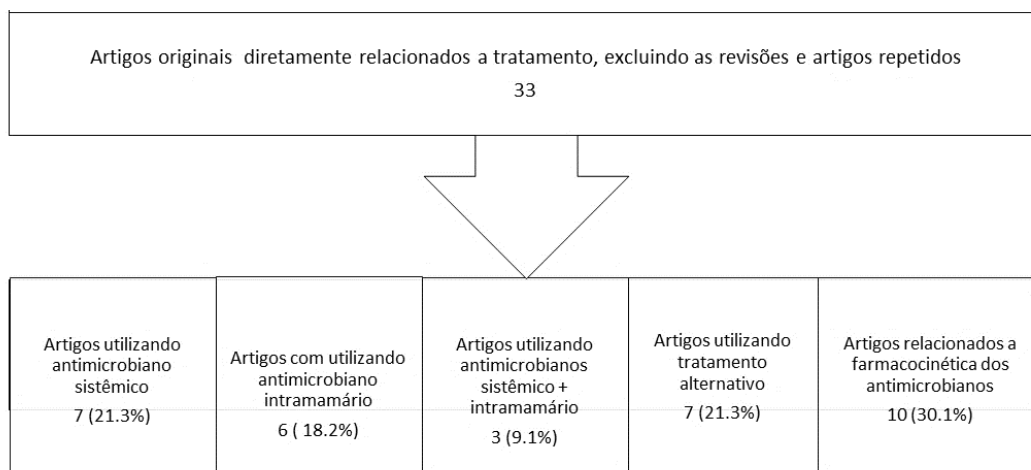


Figura 1: Fluxograma dos artigos selecionados para o trabalho.

Na tabela 1 encontra-se o resumo de todos artigos selecionados para o estudo em ordem cronológica, focando os tipos de mastite, agente etiológico, tratamento realizado e os resultados, além dos respectivos autores.

O primeiro estudo que se tem relato tratando diretamente a mastite caprina, foi um estudo indireto, onde utilizou-se a cabra como modelo animal para tratamento de mastite bovina. Derbyshire (1964) infectou cabras com *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, e os animais apresentaram mastite clínica e subclínica. Iniciou o tratamento com penicilina G procaína (sensível *in vitro*) pela via intramamária (IMM), 1, 9 e 47 dias após a infecção. Observou-se que nos animais infectados com *S. agalactiae*, o tratamento foi eficiente, resultando em cura bacteriológica, porém não houve retorno da produção de leite comparando com a produção antes da infecção. Na mastite causada por *S. aureus*, houve sucesso na terapia antimicrobiana para os animais que apresentaram a mastite subclínica, porém houve falha no tratamento dos animais com mastite clínica, mesmo tratados um dia após a infecção (Derbyshire, 1964).

Tabela 1: Lista de trabalhos científicos incluídos na revisão sistemática.

Autor / data da publicação	País	Tipo de mastite	Agente etiológico	Tratamento realizado	Resultado
Derbyshire / 1964	EUA	Mastite clínica e subclínica induzidas	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	100.000 UI de penicilina G procaína, via IMM. Com aplicação a cada 48 h durante 6 dias.	<i>S. agalactiae</i> houve cura bacteriológica nos animais tratados 1 ou 9 dias após a infecção; <i>S. aureus</i> houve falha no tratamento (1 ou 9 dias após a infecção).
Kutushev et al./ 1978	Rússia	Mastite clínica aguda *	<i>S. aureus</i>	Gammaglobulina antiestafilocócica heteróloga (200 mg /dia, durante 5 dias.	Redução da intoxicação, fatores de proteção não específicos, e diminuição dos fenômenos de autossensibilização.
Buswell et al./ 1989	Reino Unido	*	**	Amoxicilina + clavulanato e prednisolona, IMM, por 3 dias.	Manteve por até 112 horas no leite após a última infusão.
Fox et al. / 1992	EUA	Mastite subclínica	<i>Staphylococcus coagulase negativos</i> (SCN), <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Corynebacterium bovis</i> e <i>Pseudomonas spp</i>	Tratamento no momento da secagem com 300mg cefapirina benzatina via IM.	Obteve sucesso na terapia antimicrobiana no período seco
Niutta / 1994	Itália	Mastite clínica aguda e subaguda	<i>Staphylococcus spp.</i> e <i>Mycoplasma</i>	Enrofloxacina, 2.5 mg/kg/dia por via IM por 5 dias.	Sucesso na terapia.
Ameh et al. / 1994	Nigéria	Mastite gangrenosa	<i>E. coli</i>	Penicilina + estreptomicina na dose de 20 mg / kg IM por 7 d. dexametasona foi administrada intramamária por 1 dia. A ferida foi deixada aberta para drenagem, e realizado o tratamento com oxitetraciclina aplicada até a cura total.	Houve melhora dos sinais clínicos após 3 dias de tratamento, a ferida na glândula mamária restante curou-se por segunda intenção.
Ziv et al./1995	Israel	*	**	apramicina, 20 mg/kg por via IV.	Baixas concentrações no soro e no leite. A MIC90 foi 16 µg/mL para

Autor / data da publicação	País	Tipo de mastite	Agente etiológico	Tratamento realizado	Resultado
Mercier /1999	França	Mastite clínica e subclínica	SCN - <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. caprae</i> e <i>S. chromogenes</i>	Período seco – via IMM Formulação para bovinos a base de benzilpenicilina e estreptomina	<i>Staphylococcus</i> e 50 µg/mL para <i>Pasteurella multocida</i> . 93.5% dos animais tratados foram curados. O tratamento com antibióticos foi eficaz para infecções por <i>S. aureus</i> com 73% de cura. Sucesso na terapia
Mavograni /2004	Grecia	Mastite clínica	<i>S. aureus</i> , SCN, <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus spp.</i> <i>Actinomyces pyogenes</i>	Cefuroxima (250 mg) IMM quatro aplicações com intervalos de 12 h (2 dias). E associado a flunexin meglumine 100 mg (2,22-2,86 mg/kg de PV) por via IM em duas aplicações a cada 24 h (2 dias). Farmacocinética - uma única de Ceftriaxona IV e IM de 20 mg/kg PV.	Foi detectado em baixas concentrações no leite de cabras em lactação.
Ismail/ 2005	Egito	*	**		
Karzis, Donkin e Petzer / 2007	África do Sul	Mastite clínica e cabras sem mastite	Não informado	Curaclox® (Cloxacilina Benzatina 600mg, Ampicilina Trihidratada 300mg) Spectrazol (Cefuroxime 250mg); Rilexine (Cefalexina 100 mg, neomicina 100 mg e prednisolona 10 mg) Todos os antimicrobianos foram aplicados pela via IMM.	Em cabras sem mastite clínica, Spectrazol causou menor irritação tecidual seguida de Rilexine e Curaclox. Nas cabras com mastite clínica, o Rilexine 200 LC causou menos irritação, seguido de Curaclox LC, enquanto a Spectrazol causou maior irritação. Spectrazol foi encontrado na circulação após 122 h.
Marín et al / 2007	Espanha	*	**	Farmacocinética - Difloxacina 5 mg/kg IM, IV e SC.	Absorção do sangue para o leite foi extensa e rápida, e a droga foi detectada por 36 h após aplicação IV e SC e por 72 h após a administração IM.
Peer e Bhattacharyya / 2007	Sudão	Mastite gangrenosa	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Nocardia spp.</i> e <i>Escherichia coli</i> .	Gentamicina a 4 mg/kg PV por via IM e 60 ml de formaldeído a 5% pela via IMM uma vez por dia, durante 5-7 dias.	Nenhuma das cabras respondeu aos tratamentos e posteriormente foi submetida a mastectomia.
Escudero / 2007	Espanha	*	**	Farmacocinética - Danofloxacina a 18% - 6 mg/kg, nas vias IV e SC.	Ampla absorção, alta disponibilidade sistêmica e alta distribuição no úbere resultando em maiores concentrações de fármaco no leite que no plasma.

<b>Autor / data da publicação</b>	<b>País</b>	<b>Tipo de mastite</b>	<b>Agente etiológico</b>	<b>Tratamento realizado</b>	<b>Resultado</b>
Burgos et al / 2008	Brasil	Mastite gangrenosa	<i>Staphylococcus</i> spp.	Mastectomia parcial; curativo com povidine tópico a 10% e pomada à base de calêndula ( <i>Calendula officinalis</i> ). oxitetraciclina na dose 33,3 mg/kg por via IM a cada 48 horas, por 4 dias.	Houve restabelecimento da produção fisiológica de leite da glândula mamária não mastectomizada.
Fontequ e al. / 2010	Brasil	Mastite induzida	<i>S. aureus</i>	Suplementação com 2.000 UI de vitamina E no dia do parto e 7 dias após o parto em cabras.	Foi efetiva aumentando a produção de imunoglobulinas e diminuir a produção de proteínas de fase aguda, evidenciando seu efeito protetor na glândula mamária durante a mastite.
Ferrini et al / 2010	Itália	*	**	Ampicilina de ação prolongada a 15 mg/kg PV, duas aplicações por via IM com intervalo de 72 h.	Eliminação lenta da maior que para vacas e ovelhas.
Dogruer et al. / 2010	Turquia	Mastite subclínica	SCN	Ampicilina dicloxacilina (IMM); Amoxicilina + ácido clavulânico IM; e a combinação de ampicilina dicloxacilina IMM e amoxicilina + ácido clavulânico via IM.	Amoxicilina dicloxacilina (IMM) apresentou as melhores taxas de cura. A combinação IMM e IM foi bem sucedida; A amoxicilina + ácido clavulânico pela via IM foi ineficaz.
Digraskar et al. / 2011	Índia	Mastite clínica	Não informado	Gel tópico a base de plantas (Mastilep®) antioxidante-mineral oral (Uniselit®) com e sem antibiótico (AmoxicilinaCloxacilina) 10 mg/kg de PV via IM, terapia de suporte com NSAID por 5 dias.	Amoxicilina+ Cloxacilina obteve eficácia de 71.42 %; Gel tópico a base de plantas + antioxidante-mineral oral Eficácia de 83.33%; O tratamento combinado amoxicilina + Cloxacilina + Gel tópico a base de plantas + antioxidante-mineral oral obteve eficácia de 100 %;
Escudero / 2011	Espanha	*	**	Difloxacina em uma formulação de gel de poloxâmero pela via SC, 15 mg / kg	A dose estudada efetiva contra patógenos de mastite com uma concentração inibitória mínima (MIC) < 0.12 mg/L.
Thoria et al. / 2011	Sudão	Mastite clínica induzida	<i>S. aureus</i>	Extrato metanólico de <i>Terminalia brownii</i> , 25 mg/ml, na dose de 1,5 ml diariamente pela via IMM durante 12 dias.	Sucesso no tratamento, retorno do número de leucócitos no leite ao nível normal e na ausência de colônias de <i>S. aureus</i> .
Dumka et al. / 2013	Índia	*	**	Sulfato de cefaquinoma (2.5%,) 2 mg/kg PV a cada 24 h pelas vias IM ou IV.	Não houve diferença na via de aplicação. Foram mantidos os níveis

Autor / data da publicação	País	Tipo de mastite	Agente etiológico	Tratamento realizado	Resultado
Sreeja et al. / 2013	Índia	Mastite clínica e subclínica	<i>S. aureus</i>	ceftriaxona 10 mg / kg durante 5 dias, via IM.	plasmáticos foram mantidos na MIC ≤ 0,39 µg/mL. 97% de sensibilidade <i>in vitro</i> . A cura clínica foi de 58,33% e a cura bacteriológica foi de 50%.
Kumar et al. / 2014	Índia	Mastite crônica	Não informado	ceftriaxona + tazobactama (562.50 mg) via IM por 7 dias; penicilina G procaína 1,00,000 U+ sulfato de estreptomicina 100 mg+ sulfamerazina 500 mg + 20 mg de hidrocortisona, IMM duas vezes ao dia por 7 dias e 15 mg de meloxicam IM por 5 d.	Os animais apresentaram melhora acentuada após 7 dias de tratamento.
Garrett, Dirikolu e Grover / 2015	EUA	*	**	125 mg de ceftiofur via IMM, com intervalo de 24 h entre infusões, 2 infusões.	Manteve a concentração do ceftiofur no leite acima do MIC90 para <i>Staphylococcus</i> spp. o tempo de eliminação de ceftiofur da glândula mamária foi de 4,7 h.
Sabuncu / 2015	Turquia	Mastite gangrenosa	<i>S. aureus</i>	Mastectomia unilateral	A cabra foi totalmente recuperada uma semana após a cirurgia
El-Badawy et al. / 2015	Egito	Mastite clínica durante a lactação induzida	<i>S. aureus</i>	cefquinoma 3mg/kg, via IV dose única + 75 mg de cefquinoma IMM;	A concentração no leite foi abaixo da MIC (0,25 µg/mL) não foi eficaz no tratamento da mastite clínica aguda.
Peixoto et al. / 2015	Brasil	Mastite subclínica infectadas induzida	<i>S. aureus</i>	Pomada de extrato de jatobá ( <i>Hymenaea martiana</i> ) a 5% (2,5 g, lanolina 15,0 g e vaselina sólida q.s.p.50,0 g) 5 mL via IMM uma vez ao dia durante seis dias.	Sucesso na terapia e redução significativa na UFC/ml,
Dash et al. / 2016	Índia	Mastite crônica (>30 dias)	<i>S. aureus</i>	ceftriaxona pela via IV (20 mg/kg duas vezes ao dia durante 4 dias) suco da folha de Manjeriçao ( <i>Ocimum sanctum</i> )	A concentração plasmática de ceftriaxona aumentou e os valores da MIC diminuiu demonstrando efeito

Autor / data da publicação	País	Tipo de mastite	Agente etiológico	Tratamento realizado	Resultado
Lorenzutti et al / 2017	Espanha	*	**	Marbofloxacina (5 mg/kg, durante 7 dias), IV e IM	sinérgico da folha de manjerição e a ceftriaxona. Não foi observada diferenças na concentração da droga via de aplicação (IV ou I)
Rosa et al. / 2017	EUA	Mastite subclínica induzida	<i>S. uberis</i>	Testar atividade de 2,4- Thiazolidinedine, receptor gama ativador/proliferador de peroxisomo (PPAR $\gamma$ ), foi utilizado 8/kg de PV por via IV, durante 20 dias.	Melhorou a resposta a infecção e teve efeito positivo na contagem de células somáticas.

\* Animais saudáveis em lactação; \*\* livre de patógenos; IM: via de aplicação intramuscular; IMM: via de aplicação intramamária; SC: via de aplicação subcutânea; IV: via de aplicação intravenosa; MIC90: Concentração inibitória mínima que elimina 90% das bactérias.

O tratamento da mastite aguda e subaguda em cabras causada por *Staphylococcus* e *Mycoplasma* usando a enrofloxacin (2.5 mg/kg/dia) pela via IMM foi eficiente, com retorno do aspecto normal do úbere de 4 a 5 dias de tratamento. A droga foi bem tolerada em todos os animais e não apresentaram efeitos colaterais As quinolonas possuem ampla distribuição no úbere e apresentam normalmente sensíveis nos testes *in vitro* realizados com isolados de mastite caprina (Nietta et al., 1994).

Verificou-se um aumento na taxa de cura dos animais com mastite causada por *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) ou *Corynebacterium* spp., utilizando associação dos antimicrobianos: ampicilina e cloxacilina em cabras com mastite subclínica no início da lactação. No entanto, quando infectadas com *S. aureus*, *Streptococcus uberis* ou *E. coli*, o tratamento não foi eficiente, não havendo efeito na produção de leite, na redução da CCS ou na sobrevivência da cabra ( McDougall et al., 2010).

Kumar e colaboradores (2014) trataram cabras com mastite crônica combinando antimicrobianos sistêmicos (ceftriaxone + tazobactama) pela via intramuscular (IM), antimicrobianos intramamários (IMM) composto de penicilina G procaína + sulfato de estreptomicina + sulfamerazina + hidrocortisona e anti-inflamatório não esteroide (meloxicam) durante sete dias obtendo sucesso com esse protocolo.

Mavrogianni et al., (2004) também associaram o anti-inflamatório flunixin meglumine, com o antibiótico cefuroxime pela via IMM no tratamento da mastite clínica em cabras durante a lactação. Eles verificaram que a adição do flunixin reduziu os sinais clínicos no segundo dia após o início do tratamento, isso se deve as propriedades anti-inflamatória, antipirética e analgésica, apresentando resultado positivo.

Três protocolos de tratamento para mastite subclínica em cabras durante a lactação foram comparados em um trabalho realizado por Doğruer e colaboradores (2010). Ampicilina dicloxacilina via IMM; Amoxicilina + ácido clavulânico intramuscular (IM) e a combinação de ampicilina dicloxacilina IMM e amoxicilina + ácido clavulânico via IM. A utilização de amoxicilina dicloxacilina pela via IMM apresentou as melhores taxas de cura, mas a combinação de antibióticos pelas vias IMM e IM também apresentou sucesso terapêutico. A amoxicilina + ácido clavulânico pela via IM não foi

eficaz. Os autores concluem que a mastite subclínica em cabras pode ser tratada com sucesso durante lactação.

Kutushev et al. (1978) testaram a eficácia da gamma globulina anti-estafilocócica heteróloga (200 mg/dia durante 5 dias) em 67 cabras com mastite aguda causada por *S. aureus* durante a lactação. O tratamento resultou na redução dos sinais clínicos.

Existe controvérsia quanto ao benefício da terapia antimicrobiana nos casos de mastite por coliformes. Acredita-se que as bactérias são eliminadas do úbere mais rapidamente e que os sinais clínicos são resultantes da liberação de endotoxinas. Os antimicrobianos intramamários podem, portanto, ser pouco benéfico (Dhondt et al., 1977). Embora a etiologia da mastite por coliformes seja muito comum em vacas, esses microrganismos não são comumente isolados na mastite caprina, essa baixa prevalência provavelmente ocorre pela diferença na consistência fecal. As cabras apresentam fezes mais secas e o tipo de instalação mais utilizadas para caprinos, o piso ripado, diminuírem o contato dos animais com as fezes, diminuindo assim as chances de contaminação do úbere.

A mastectomia é indicada como tratamento da mastite gangrenosa, e pode também ser indicada nos casos de mastite crônica supurativa, obstrutiva, úbere penduloso ou injúrias crônicas irreversíveis (Ribeiro et al., 2007). Na mastite gangrenosa a mastectomia é eficaz devido a evolução da doença no úbere tornando-o cianótico, frio, com linha de demarcação do tecido afetado, desenvolvimento de abscesso e drenagem de pus. Se não realizada rapidamente a mastectomia, a doença avança em curso clínico fatal devido a septicemia e/ou toxemia (El-Maghraby, 2001).

Por outro lado, Peer and Bhattacharyya (2007), na Índia, realizaram o tratamento com uso de antimicrobianos da mastite gangrenosa em cabras. Foram isolados do leite: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Nocardia* spp. e *E. coli*. Os isolados apresentaram a maior sensibilidade contra gentamicina (60%), ampicilina/cloxacilina (20%), amoxicilina (13,33%) e penicilina (11,33%). Com base nestes resultados, as cabras foram tratadas com gentamicina a 4 mg/kg de peso corporal por via intramuscular durante 5-7 dias, e foi utilizado 60 ml de formaldeído a 5% pela via intramamária, uma vez por dia. Nenhuma das cabras respondeu aos tratamentos e posteriormente foi submetida a mastectomia.

O uso da terapia antimicrobiana no momento da secagem é uma prática amplamente difundida na bovinocultura leiteira. Entretanto, em caprinos, Fox e colaboradores.(1992) e Mercier (1999) relatam não possuir ação profilática, haja vista que as taxas reinfecção dos animais tratados e não tratados são similares.

Fox et al., (1992) utilizando formulação comercial para bovinos a base cefapirina benzatina pela via IMM em animais com cultura positiva para *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN), *S. uberis*, *Corynebacterium bovis* e *Pseudomonas* spp. observaram que houve sucesso na terapia, entretanto não obtiveram êxito na profilaxia da mastite.

Outro trabalho realizado por Mercier (1999), avaliou a eficácia de antimicrobiano intramamário formulado para bovinos, composto de benzilpenicilina e estreptomicina, em cabras durante o período seco. A eficácia do tratamento foi medida em termos de efeito terapêutico (efeito sobre as infecções mamárias já presentes) e seu efeito preventivo (incidência de novas infecções durante o período seco). O tratamento com antibióticos foi particularmente eficaz para infecções por *S. aureus*, onde 73% das cabras tratadas recuperaram. O tratamento durante o período seco também levou a reduções significativas no número de infecções e contagem de células somáticas no início da próxima lactação.

Na produção animal os antimicrobianos são extensivamente utilizados na profilaxia das doenças e e como promotores de crescimento dos animais. A utilização de antimicrobianos animais destinados à alimentação e na medicina humana, levando ao risco real de surgimento e disseminação de bactérias resistentes, incluindo aquelas capazes de causar infecções em animais e humanos. A importância dos animais como reservatórios de patógenos humanos resistentes está bem documentada. A disseminação de genes resistentes a partir de bactérias de origem animal para bactérias humanas é outro perigo potencial.

Na prática a terapia antimicrobiana durante o periodo seco não é muito utilizada em cabras leiteiras, contrariamente do que é realizado em vacas sendo uma pratica corriqueira em todas as fazendas. Isso é um ponto positivo pois segue as novas recomendações realizadas pela organização mundial de saúde, de não utilizar antimicrobianos como profilaxia devido ao risco de aumento da resistência ou mesmo resíduos de antimicrobianos no leite

Geralmente a via de administração mais utilizada nas cabras, assim como nas vacas é a via intramamária e na prática clínica normalmente há muitas dúvidas em relação a dosagem, muitos dos produtores e médicos veterinários possuem receio em administrar a dose total do produto devido ao tamanho reduzido das cabras e a formulação utilizada para vacas, utilizando assim a metade da dose, entretanto essa prática se torna uma preocupação pois muita das vezes não se fraciona de maneira adequada, pois no aplicador não há divisão. Outro fator relevante é o risco de contaminação pois a ponta do aplicador é introduzida no teto contaminado e como as glândulas não se comunicam o animal pode ter mastite nas duas metades mamárias por agentes etiológicos distintos. Como esse aplicador é guardado para aplicação na próxima ordenha pode haver o risco de contaminação por outros microrganismos ambientais.

Trabalhos que pesquisam padrões de sensibilidade aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite caprina são de relevância. Sreeja e colaboradores, em 2013, verificaram que embora os isolados de *S. aureus* mostraram 97% de sensibilidade à ceftriaxona *in vitro*, entretanto os resultados *in vivo* foram diferentes. Os animais foram tratados com ceftriaxona 10 mg / kg IM durante 5 dias, mas a cura clínica foi em apenas 58,33% e a cura bacteriológica foi de 50%. A sensibilidade *in vitro* nem sempre é um indicativo de cura especialmente nos isolados de *S. aureus*. Estudo realizado por McDougall et al. (2010) demonstrou que *S. aureus* mesmo sensíveis a penicilina e oxacilina *in vitro*, a taxa de cura das cabras com mastite foi baixa. As baixas taxas de cura clínica podem estar relacionadas aos fatores de virulência dos patógenos como *S. aureus*, que são invasivos ou criam microabcessos através de acúmulo de fibrina que interfere na distribuição de drogas infundidas no local da infecção especialmente quando utilizada a via de aplicação intramamária (Constable and Morin, 2003; Eskine et al., 2003). Além disso, a duração normalmente utilizada na terapia da mastite de 24 horas a 36 horas para infusões intramamárias, limita o tempo de concentração efetiva na glândula necessária para eliminar as bactérias de perfis crônicos ou invasivos. É por estas razões que a administração sistêmica de antibacterianos recebeu atenção. Esta via de administração é apropriada quando o alvo terapêutico inclui o segundo compartimento, o tecido profundo da glândula, para consideração farmacológica. A administração sistêmica é tipicamente indicada para esses casos (Constable and Morin, 2003; Eskine et al., 2003).

A via utilização da via sistêmica no tratamento de enfermidades infecciosas nos caprinos, principalmente na mastite é uma opção, entretanto é necessário o conhecimento da farmacocinética e farmacodinâmica destas drogas. Alguns antimicrobianos não apresentam diferenças na via de aplicação (IM e IV) como a apramicina (Ziv et al., 1995), ceftriaxona (Ismail, 2005) e o sulfato de cefquinoma (Dumka et al., 2013) atingiram a concentração plasmática na concentração inibitória mínima para maioria das bactérias causadoras de mastite caprina, sendo estas opções para serem utilizadas no tratamento sistêmico da mastite caprina.

Há pouca informação sobre as características farmacocinéticas dos antimicrobianos no úbere e o no leite, normalmente os veterinários quando utilizam antimicrobianos sistêmicos não conhece a dose adequada para caprinos, ou mesmo a dose que atingirá a concentração inibitória mínima. Sendo assim muitas das vezes utilizam antimicrobianos que não possuem boa distribuição no úbere como a utilização de cefatiofur pela via sistêmica ou mesmo a utilização de doses menores já que a maioria dos antimicrobianos não são indicados na bula para caprinos, utilizam normalmente a metade da dose para bovinos.

Artigos que tratam de temas relacionados ao tratamento da mastite caprina, como, farmacocinética e farmacodinâmica dos antimicrobianos também foram considerados nesta revisão. Tratamento durante a lactação das cabras são importantes visto que o objetivo da terapia é atingir concentrações efetivas do fármaco no local da infecção, e a glândula mamária inflamada é um alvo difícil. Para atingir concentrações efetivas no alvo características da droga como solubilidade lipídica, grau de ionização, extensão da ligação ao soro e proteínas do leite e o tipo de veículo são importantes (Erskine et al., 2003).

As fluorquinolonas conhecidas pela boa distribuição no úbere de vacas. Em estudos utilizando cabras saudáveis e em lactação foi avaliado a farmacocinética da danofloxacin pelas vias intravenosa (IV) e subcutânea (SC) (Escudero et al., 2007), da difloxacin pela via SC (Escudero et al., 2011) e da marbofloxacin pelas vias IM e IV (Lorenzutti et al., 2017) demonstraram ampla absorção, altas concentrações no leite e disponibilidade no úbere, não apresentando diferenças nas vias de aplicação. Ferrini et al., (2010) utilizando a ampicilina de longa ação pela via intramuscular observaram uma taxa lenta de eliminação do antimicrobiano, em até 13 ordenhas após o término do tratamento. Mais estudos devem ser realizados para conhecer a

eficácia e o tempo de eliminação de resíduos de antimicrobianos utilizados para tratamento de bovinos no leite de caprino, haja vista que os estudos realizados até o momento mostram que as cabras normalmente possuem eliminação lenta destes produtos, podendo ser uma importante fonte de alergias para os consumidores, além de dificultar a produção de derivados (De Novaes et al., 2017). Conforme relatado por Buswell et al. (1989), compostos intramamário, de uso bovino, a base de amoxicilina, clavulanato e prednisolona, quando usados em cabras em lactação, por infusões intramamárias e durante três dias consecutivos, observaram resíduos do medicamento no leite em até 112 horas após o término do tratamento

Garrett et al. (2015) realizaram estudo com objetivo de avaliar a farmacocinética do cefatofur (125 mg) administrado pela via IMM. Nas cabras em lactação o antimicrobiano foi capaz de manter a concentração no leite acima da MIC90 para *Staphylococcus* spp. durante 24 horas. A administração de antibióticos pela via IMM pode ser ineficaz em ruminantes com mastite clínica, devido a inadequada distribuição das drogas no local da infecção, além de ocorrer perda substancial da dose administrada no momento da ordenha.

Um problema relacionado aos estudos da farmacocinética é que normalmente são realizados em animais saudáveis não refletindo a realidade encontrada nos animais doentes (Constable and Morin, 2003; Eskine et al., 2003; Ruegg, 2003; Barkema et al., 2006).

Estudos com objetivo de conhecer a farmacocinética e farmacodinâmica dos antimicrobianos são realizados com animais saudáveis e isso limita a utilização desses dados com segurança no tratamento da mastite, pois há alterações na fisiologia da glândula mamária inflamada, bem como limitações relacionadas a fibrose e formação de abscessos que dificultam a distribuição do medicamento no úbere especialmente quando os antimicrobianos são aplicados pela via IMM. Por isso são necessários mais estudos objetivando a terapêutica da mastite caprina haja vista que é um tema pouco explorado na literatura científica.

Nos últimos tempos, tratamento de doenças infecciosas usando fitoterápicos em associação com os antimicrobianos tem sido estudado no sentido de diminuir a resistência antimicrobiana e tentar garantir êxito na terapia. Alawa et al. (2000) descreveram que medicamentos à base de plantas que tem atividade sinérgica com os antimicrobianos podem desempenhar um papel importante para manter as

concentrações terapêuticas e para exercer um melhor efeito antibacteriano dos antibióticos, melhorando a sua biodisponibilidade na glândula mamária

Dash e colaboradores (2016) com objetivo de testar o efeito sinérgico da folha de manjeriço (*Ocimum sanctum*) com ceftriaxona no tratamento da mastite crônica (>30 dias) ocasionada por *S. aureus* em cabras durante a lactação. Houve efeito sinérgico do os valores da MIC contra *S. aureus* foram reduzidos.

Peixoto e colaboradores (2015) avaliaram a atividade *in vivo* de uma pomada à base de extrato de Jatobá (*Hymenaea martiana*) a 5% (2,5g de extrato de *H. martiana*, 15,0 g de lanolina e 50,0 g de vaselina sólida q.s.p.) utilizando 5 mL da pomada pela via intramamárias das cabras experimentalmente infectadas com *S. aureus*. Houve cura dos animais, devido a atividade antibacteriana pode estar relacionada às classes de metabólitos secundários encontrados nesta planta (Peixoto et al., 2015) este estudo confirmou os resultados *in vitro*, onde as melhores atividades inibidoras frente aos *Staphylococcus* spp. onde *H. martiana*, inibiu 99,4% dos isolados ( Peixoto et al., 2016a). Além de não afetar a qualidade do leite, sendo capaz de manter constante os teores de gordura, proteína e sólidos totais antes, durante e após a terapia, mostrando-se segura e não alterando a composição do leite (Peixoto et al., 2016 b) .

Os estudos envolvendo a utilização de tratamentos alternativos são validos no sentido de tentar freiar o fenômeno da resistência antimicrobiana. A resistência antimicrobiana é ameaça à saúde pública devido ao crescimento da resistência é impulsionada tanto pelo uso adequado como inadequado de medicamentos antimicrobianos utilizados na saúde humana e animal bem como na produção de alimentos e, ainda, com medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções.

A organização mundial da saúde enfatiza que é necessário a criação de estratégias e tecnologias inovadoras que variem desde a área científica até os aspectos financeiros e reguladores, para minimizar a escassez de novos antibióticos e outros produtos destinados a limitar a resistência antimicrobiana.

#### **4. Conclusões**

Nas últimas duas décadas, houve um aumento considerável no conhecimento da mastite em caprinos, particularmente em relação aos agentes infecciosos, como estudos do perfil de sensibilidade *in vitro*, entretanto há ainda grandes lacunas no

conhecimento da mastite caprina e que devem continuar a ser abordado. Em particular, a escassez de informações publicadas sobre o tratamento da mastite nesta espécie.

Mais estudos são necessários para validar a eficácia dos antimicrobianos utilizando antimicrobianos formulados para o tratamento da mastite bovina em caprinos, além do tempo de eliminação de resíduos no leite; ou mesmo a formulação de antimicrobianos específicos para esta espécie.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil). Moreira é apoiada financeiramente pelo CNPq.

## 6. Referências

- Alawa, J.P., Ngele, M.B., Ogwu, D., 2000. Chronic caprine mastitis in Nigerian goat breeds: Microbiological flora and histopathological findings. *Small Rumin. Res.* 35, 203–207.
- Buswell, J.F., Knight, C.H., Barber, D.M.L., 1989. Antibiotic persistence and tolerance in the lactating goat following intramammary therapy. *Vet rec.* 1425, 301–303.
- Constable, P.D., Morin, D.E., 2003. Treatment of clinical mastitis: Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *Vet. Clin. NA Food Anim. Pract.* 19, 139–155.
- Dash, J.R., Sar, T.K., Samanta, I., Mandal, T.K., 2016. Effects of herbal extract of *Ocimum sanctum* as supportive therapy with intravenous ceftriaxone in experimentally induced staphylococcal chronic mastitis in goat. *Small Rumin. Res.* 137, 1–8.
- De Novaes, S.F., Schreiner, L.L., Silva, I.P., Franco, R.M., 2017. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. *Cienc. Rural St. Maria* 47, 2–6. doi:10.1590/0103-8478cr20170215

- Derbyshire, J.B., 1964. Treatment of Experimental Streptococcal and Staphylococcal Mastitis in the Goat with Penicillin. *J. Comp. Pathol. Ther.* 74, 31–IN3.
- Dhondt, G., Burvenich, C., Peeters, G., 1977. Mammary blood flow during experimental *Escherichia coli* endotoxin induced mastitis in goats and cows. *J. Dairy Res.* 44, 433–40.
- Doğruer, G., Sarıbay, M.K., Ergün, Y., Aslantaş, Ö., Demir, C., Ateş, C.T., 2010. Treatment of subclinical mastitis in Damascus goats during lactation. *Small Rumin. Res.* 90, 153–155.
- Dubeuf, J.P., Morand-Fehr, P., Rubino, R., 2004. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Rumin. Res.* 51, 165–173.
- Dumka, V.K., Dinakaran, V., Ranjan, B., Rampal, S., 2013. Comparative pharmacokinetics of cefquinome following intravenous and intramuscular administration in goats. *Small Rumin. Res.* 113, 273–277.
- El-Maghraby, H.M., 2001. Comparison of two surgical techniques for mastectomy of goats. *Small Rumin. Res.* 40, 215–221.
- Erskine, R.J., Wagner, S., DeGraves, F.J., 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 19, 109–138.
- Escudero, E., Cárceles, C.M., Fernandez-Varon, E., Marin, P., Benchaoui, H., 2007. Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 572–577.
- Escudero, E., Marín, P., Cárceles, C.M., Ramírez, M.J., Fernández-Varón, E., 2011. Pharmacokinetic and milk penetration of a difloxacin long-acting poloxamer gel formulation with carboxy-methylcellulose in lactating goats. *Vet. J.* 188, 92–95.
- Ferrini, A.M., Trenta, S., Mannoni, V., Rosati, R., Coni, E., 2010. Depletion of long-acting ampicillin in goat milk following intramuscular administration. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12199–12203.
- Fox, L.K., Hancock, D.D., Horner, S.D., 1992. Selective intramammary antibiotic therapy during the nonlactating period in goats. *Small Rumin. Res.* 9, 313–318.
- Ismail, M.M., 2005. Pharmacokinetics Urinary and Mammary Excretion of Ceftriaxone in Lactating Goats 358, 354–358.
- Kumar, S ; Shekhar,S., Praveen ,P Dalai,K N ; Dewangan, B.K., 2014. Treatment of

- Black Bengal doe suffering from chronic mastitis. *Indo-Am. J. Agric. Vet. Sci.* 2, 3–6.
- Kumar, H., Yadav, D., Kumar, N., Seth, R., Goyal, A.K., 2016. Nutritional and nutraceutical properties of goat milk - a review. *Indian J. Dairy Sci.* 69, 513–518.
- Kutushev, Fk., Shubik lu, G., Libov, A.S., Andreev, A. V, 1978. Use of heterologous antistaphylococcal gamma-globulin in treating suppurative mastitis. *Vestn Khir Im I I Grek* 121, 3–6.
- Lorenzutti, A.M., Litterio, N.J., Himelfarb, M.A., Zarazaga, M. d. P., San Andrés, M.I., De Lucas, J.J., 2017. Pharmacokinetics, milk penetration and PK/PD analysis by Monte Carlo simulation of marbofloxacin, after intravenous and intramuscular administration to lactating goats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1–12.
- Mavrogianni, V.S., Alexopoulos, C., Fthenakis, G.C., 2004. Field evaluation of flunixin meglumine in the supportive treatment of caprine mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 373–375.
- McDougall, S., Supré, K., De Vliegher, S., Haesebrouck, F., Hussein, H., Clausen, L., Prosser, C., 2010. Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in early lactation in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 93, 4710–4721.
- Mercier, P., 1999. Mastitis : antibiotic treatment at drying off is effective . *Chèvre* 26–30.
- Niutta, P.A., Giudice, P.P.N.F., 1994. Enrofloxacin use by supramammary inoculation in infectious ovine-caprine mastitis. *O&DV. Obiettivi e Doc. Vet.*
- Peer, F.U., Bhattacharyya, H.K., 2007. Studies on caprine gangrenous mastitis. *Indian J. Small Ruminants* 13, 92–94.
- Peixoto, R. de Moraes, Araújo, R. D. M. P., Bomfim, S. A. G., da Silva, T. M. G., Silva, T. M. S., da Silva Almeida, J. R. G., ... & da Costa, M. M. 2015. Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. *Small Rumin. Res.* 130, 229–235.
- Peixoto, R. de M., Araújo, R. de M.P., Silva Peixoto, L.J., Rocha, W.S., De Sá, M. da C.A., Da Costa, M.M., 2016. Composição do leite de cabras saanen infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus* e submetidas a dois protocolos de tratamento. *Cienc. Anim. Bras.* 17, 449–458.

- Peixoto, R.D.E.M., Erasmo, W., Silva, L.E., Guedes, J.R., 2016. Antibacterial potential of native plants from the Caatinga biome against *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminants. *Rev. Caatinga* 29, 758–763.
- Ribeiro, M. g., Lara, G.H.B., Bicudo, S.D., SOUZA, A.V.G., Salerno, T., Siqueira, A.K., Geraldo, J.S., 2007. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* Co-infection. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.* 59, 810–812.
- Sreeja, S.; Bineesh, P. P.; Vijayakumar, K.; Saseendranath, M.R. 2013. Comparative study of in vivo and in vitro efficacy of ceftriaxone in goats mastitis. *Indian J. Anim. Res.* 47, 75–78.
- Ziv, G., Kurtz, B., Risenberg, R., Glickman, A., 1995. Serum and milk concentrations of apramycin in lactating cows, ewes and goats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18, 346–351.

**Capítulo II: Mastitis in dairy goats from the State of Minas Gerais, Brazil:  
Profiles of properties, risk factors and characterization of bacteria**

Artigo submetido a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

## **Mastitis in dairy goats from the State of Minas Gerais, Brazil: Profiles of properties, risk factors and characterization of bacteria<sup>1</sup>**

Magna C. Lima<sup>2</sup>, Marina C. C. de Souza<sup>2</sup>, Isis F. Espeschit<sup>2</sup>; Pedro A. C. C. Maciel<sup>2</sup>, Jéssica E. de Sousa<sup>1</sup>, Geórggio F. de Moraes<sup>2</sup>, José D. Ribeiro Filho<sup>3</sup>, Maria A. S. Moreira<sup>2\*</sup>

<sup>2</sup> Laboratório de Doenças bacterianas (LDBAC), Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Avenue PH Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, MG. 36570-900, Brazil. \* Autor para correspondência: [masm@ufv.br](mailto:masm@ufv.br)

<sup>3</sup> Setor de Clínica Médica de Ruminantes e Equinos, Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

**ABSTRACT.** - Lima, M.C., Souza, M.C.C., Espeschit, I.F., Maciel, P.A.C.C., Sousa, J.E., Moraes, G.F., Ribeiro Filho, J.D., Moreira, M.A.S. **Mastitis in dairy goats from the State of Minas Gerais, Brazil: Profiles of properties, risk factors and characterization of bacteria.** Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Laboratório de Doenças bacterianas (LDBAC), Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Avenue PH Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, MG. 36570-900, Brazil. [masm@ufv.br](mailto:masm@ufv.br) The Southeast region of Brazil leads the national production of goat milk. The Zona da Mata of Minas Gerais has a specialized goat milk production chain. Goat's milk is superior in quality compared with milk of other domestic species, and the demand for milk and milk products from the public has increased. Data on dairy goat breeding in Minas Gerais are scarce and relatively old, and this lack of information has limited the implementation of prophylactic measures, especially for mastitis, which represents the biggest sanitary problem for dairy herds. It also causes socioeconomic problems and market issues for dairy goat farming. A total of 539 lactating goats were examined and 268 individual samples (one for each half udder) were collected from animals positive for strip cup test or the California Mastitis Test (CMT). Microbiological cultures were carried out on blood agar medium and the bacteria were subjected to phenotypic, genotypic and antimicrobial susceptibility tests. The prevalence of subclinical mastitis was 28.0% and the clinical prevalence was 2.8%. Bacterial multiplication was obtained in 62.0% of samples. One hundred eighty seven total bacteria were identified. The most common species identified was *Staphylococcus aureus* (60,4%), followed *Staphylococcus epidermidis* (9.1%), *Escherichia coli* (6.9%), *Staphylococcus saprophyticus* (5.9%) e *Staphylococcus caprae* (4,3%) in descending order. Bacteria of the genus *Staphylococcus* presented a profile of resistance to

antimicrobials belonging to the beta-lactam class — penicillin, ampicillin and oxacillin — in addition to tetracycline, in contrast to the other antimicrobials tested. Twelve percent of multidrug resistance (MDR) were found in five microregions. Among the bacteria with the highest prevalence of MDR, 38.5% were *E. coli* and 10.6% were *S. aureus*. The producers of the Zona da Mata of Minas Gerais are technicians who work with specialized dairy breeds and practise good management. However, some measures related to prophylaxis and control of diseases, such as vaccination, have low adherence or are not performed due to a lack of veterinary assistance. Risk factors: manual milking, utilization of bed, low frequency of cleaning two drinkers, interval between parturition less than 12 months. This is the first study focusing on this region, which is highly prominent in goat milk production in Brazil. It provides important information that can help in the implementation of measures for the prophylaxis and control of diseases, and for maintenance of a constant supply of products in sufficient quantities and of a quality suitable for the consumer population. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Avenue PH Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, MG. 36570-00, Brazil. E-mail: [masm@ufv.br](mailto:masm@ufv.br)

INDEX TERMS: *Staphylococcus aureus*, intramammary infection, small ruminants, antimicrobials.

**Resumo - [Mastite em cabras leiteiras no Estado de Minas Gerais, Brasil: Perfis das propriedades, fatores de risco e caracterização das bactérias.]** A região Sudeste do Brasil lidera a produção nacional de leite de cabra. A Zona da Mata de Minas Gerais possui uma cadeia especializada de produção de leite de cabra. O leite de cabra é superior em qualidade em comparação com o leite de outras espécies domésticas, e a demanda por leite e produtos lácteos do público tem aumentado. Os dados sobre o sistema de criação de cabras leiteiras em Minas Gerais são escassos e relativamente antigos, e essa falta de informação limita a implementação de medidas profiláticas, especialmente para a mastite, que representa o maior problema sanitário nos rebanhos leiteiros. Isso também causa problemas socioeconômicos e problemas de mercado para a criação de cabras leiteiras. Um total de 539 cabras em lactação foram examinados e 268 amostras individuais (uma para cada meia viga) foram coletadas de animais positivos no teste da caneca de fundo escuro ou Califórnia Mastitis teste (CMT). As culturas microbiológicas foram realizadas em meio agar de sangue e as bactérias foram submetidas a testes fenotípicos, genotípicos e testes de

susceptibilidade antimicrobiana. A prevalência de mastite subclínica foi de 28,0% e a prevalência clínica foi de 2,8%. A multiplicação bacteriana foi obtida em 62,0% das amostras. Um total de Cento e oitenta e sete bactérias foram identificadas. As espécies mais identificadas foram: *Staphylococcus aureus* (60,4%), seguida de *Staphylococcus epidermidis* (9.1%), *Escherichia coli* (6.9%), *Staphylococcus saprophyticus* (5.9%) e *Staphylococcus caprae* (4,3%) em ordem decrescente. As bactérias do gênero *Staphylococcus* apresentaram um perfil de resistência aos antimicrobianos pertencentes à classe de beta-lactâmicos - penicilina, ampicilina e oxacilina - além da tetraciclina, em contraste com os outros antimicrobianos testados. Doze por cento dos isolados apresentaram resistência múltipla a antibióticos (MDR) e foram encontrados em cinco microrregiões. Entre as bactérias com maior prevalência de MDR, 38,5% foram *E. coli* e 10,6% *S. aureus*. Os produtores da Zona da Mata de Minas Gerais são tecnificados, trabalham com raças leiteiras especializadas praticam e possuem bom manejo. No entanto, algumas medidas relacionadas à profilaxia e ao controle das doenças, como a vacinação, têm baixa adesão ou não são realizadas por falta de assistência veterinária. Os fatores de risco: ordenha manual, utilização de cama, baixa frequência de limpeza dos bebedouros, intervalo entre partos menor de 12 meses. Este é o primeiro estudo com foco nesta região, que possui grande relevância na produção de leite de cabra no Brasil, fornecendo informações importantes que podem auxiliar na implementação de medidas de profilaxia e controle das doenças, e na manutenção de um fornecimento constante de produtos em quantidade e qualidade suficientemente adequada para a população consumidora.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Staphylococcus aureus*, infecção intramamária, pequenos ruminantes.

## 1. Introduction

The world production of goat's milk is around 18.4 million tons per year contributing 2% of total milk production (FAO 2016). Brazil has a low production of about 35 million liters. The Northeastern region has the largest goat population in the country (92.6%), however, it produces less than 45% of the national total and consumption occurs predominantly in the producing areas (IBGE 2006). Production has been stimulated through the establishment of government programs for the purchase and

pasteurization of goat's milk, with commercialization at or near the producer center (Gomes 2016).

The Southeast region produces most of the nation's goat milk, with more than 50% of the total, and its supply is concentrated in the states of Minas Gerais, São Paulo and Rio de Janeiro (Nogueira Filho et al. 2010). Minas Gerais produced three million liters in the year 2006, from 5835 milked goats (IBGE 2006). Current data shows that about 50,000 liters per day are produced in each state. However, since the supply is localized and quantities per producer are small, most producers market the food directly to the consumer, mainly in the form of milk and gourmet cheeses (Guimarães & Cordeiro 2017).

The Zona da Mata of Minas Gerais, composed of seven microregions, hosts approximately 20% of the national herd, and has animals specialized for milk production, obtained by the import of animals and semen, resulting in the most specialized goat milk production chain in Brazil (Fonseca & Bruschi 2009).

Goat milk is superior in quality compared with milk of other domestic species, and consumption by the public has increased considerably due to its nutritional properties. Goat's milk has a higher content of proteins, minerals and vitamin A, and presents smaller fat globules, facilitating the digestion process (Nogueira Filho et al. 2010).

However, some factors limit this activity, especially mastitis which represents the major sanitary problem for dairy herds. In a study carried out by Gouveia et al. (2015), the prevalence of mastitis in dairy goats in the state of Minas Gerais was 41.7%.

Data on dairy goat breeding in Minas Gerais are scarce and relatively old; this restricted information has limited the implementation of prophylactic, socioeconomic and market measures in the industry (Gouveia et al. 2015).

Studies involving the etiology of caprine mastitis and resistance profiles of bacteria isolated from animals suffering the disease are scarce. Therefore, this study is necessary to better understand the factors inherent to the microorganisms that may be involved in the development of the disease. The objective of this work was to characterize mastitis and bacteria associated with it in milking goats in the Zona da Mata of Minas Gerais.

## 2. Material and Methods

**Ethics statement.** The project was approved by the Committee of Ethics and Use of Animals of the Federal University of Viçosa, CEUA / UFV, with the number 42/2014.

**Selection of farms and animals.** The collections were carried out from April to August 2014. Ten properties were sampled in six micro-regions, since there were no dairy goats in one micro-region (Ponte Nova) at the time of collection. Twenty four percent of the properties with dairy goats in each microregion were selected and sampled used the Open Epi® program (<http://www.openepi.com>) (Fig. 1.). All animals in lactation were examined.

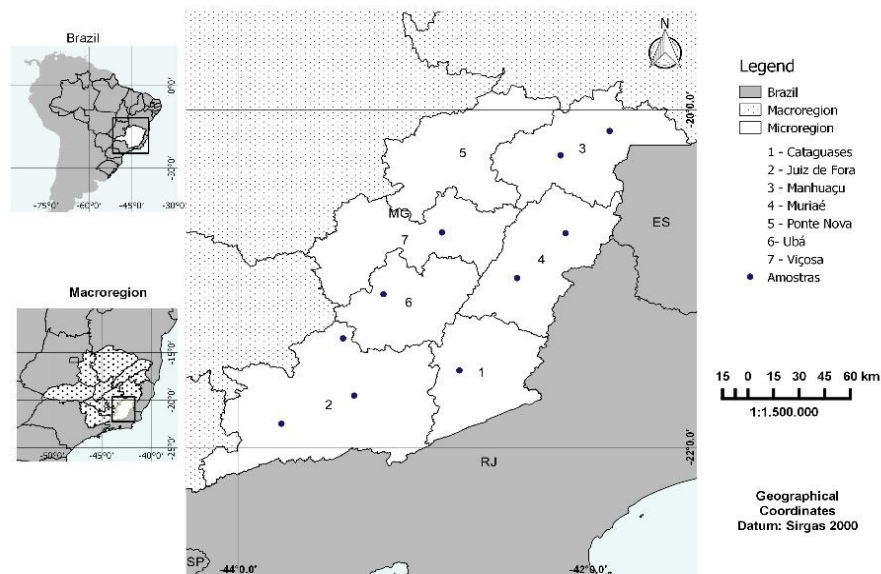


Figure 1. Location of the mesoregion Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil, with microregions. The black dots show the locations of sample collection. A microregion of Ponte Nova (5) is not marked with black dots because there were no lactating goats at the time of collection.

**Profile of properties and risk factors.** A questionnaire was used to characterize the farm properties and to determine the risk factors. The questionnaire was applied with consent of the owner and the interviewee was always the person responsible for the management of the animals.

**Mastitis prevalence.** The frequencies of positive and negative samples were tabulated in order to verify the association of the results using the chi-square test. To calculate the prevalence, the number of existing cases of mastitis (clinical and subclinical (CMT associated for lacto culture)), divided by the total number of animals examined (total lactating females) was used.

**Diagnostic.** For detection of clinical mastitis were performed physical examination and the strip cup test. For detection subclinical mastitis were used the California Mastitis Test (CMT) score on a scale of 2, or 3 (Lima Junior et al. 1995).and was collected samples for confirmation by lacto culture one for each half udder

**Isolation and phenotypic identification of bacteria.** All of the milk samples were obtained from cases of clinical and subclinical mastitis. After discarding a few first streams, about 15 mL of milk individual sample were collected from each half udder as recommended by the National Mastitis Council (2001). For the isolation and identification of the bacteria, 100 µL samples of pre-homogenized milk were inoculated into Petri dishes containing 5% sheep blood agar using the surface scattering technique. These plates were then incubated at 37 °C, and readings were performed after 24, 48 and 72 hours. The bacteria were later identified by their morphological, dyeing and biochemical characteristics (Quinn et al. 2011). The sample was considered positive for mastitis when three or more identical colonies were identified from an individual milk sample from a farm building (Buelow et al. 1996).

**Genetic identification.** For DNA extraction, the Promega® kit was used, following the manufacturer's protocol. PCR was performed using the primers and amplification conditions described in Table 1. The amplified fragments were sent to MacroGen Corporation (Seoul, South Korea) for sequencing.

Table 1: Oligonucleotides used to identify bacteria isolated from goat milk with clinical and subclinical mastitis.

Gene	Oligonucleotides	Product (bp)	Bacteria	Reference
<i>se1</i>	5'-ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA-3'	124	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(Martineau et al., 1996)
<i>se2</i>	5'-CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA-3'			
<i>femA-1</i>	5' –AAAAAGCACATAACAAGCG-3'	132	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Martineau et al., 1998)
<i>femA-2</i>	3' – GATAAAGAAGAAACCAGCAG-5'			
<i>616V</i>	5'- AGAGTTTGATYMTGGCTCA-3'	1530	rDNA 16S	(Sterr et al., 2009)
<i>630R</i>	5'-AAGGAGGTGATCCARCC-3'			
<i>uspa1</i>	5'-CCGATACGCTGCAATCAGT-3'	884	<i>Escherichia coli</i>	(Chen and Griffiths, 1998)
<i>uspa2</i>	5'-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT-3'			

**Resistance profile.** Thirteen antimicrobials normally prescribed in the treatment of mastitis: ampicillin (10 µg), neomycin (30 µg), oxacillin (10 µg), penicillin G (10 IU), enrofloxacin (10 µg), ciprofloxacin (10 µg), gentamicin (30 µg), ceftiofur (30µg), sulfadiazine+trimethoprim (20µg) + (1.25µg), cephalixin (30µg), cefepime (30µg), and

cefaperazone (75 µg) were used. The Kirby-Bauer methodology was used following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) was followed. Multidrug resistant isolates (MDR) were those that showed resistance to three or more classes of antimicrobials (Magiorakos et al. 2012).

**Statistical analyses.** For the microbiological data, descriptive statistics were used to show the distributions of relative and absolute frequencies. For the analysis of the data related to risk factors for bacterial mastitis, association between the variables was tested using univariate and multivariate analysis.

In the univariate analysis, each independent variable was tested with the dependent variable (infection of the mammary gland). A 95% confidence interval was adopted using the EpiInfo program version 3.5.4.

For multivariate analysis, logistical regression was used. The response variables were the number of clinical and subclinical mastitis cases and the number of lactating females (trials). The explanatory variables were grouped according to their characteristics (related to hygiene, facilities, production and reproductive management, and the number of animals). Redundant explanatory variables were eliminated from the analysis to avoid severe multicollinearity. Only explanatory variables with significance at 10% probability were maintained in the final model.

### 3. Results

**Animals.** A total of 539 lactating goats totaling 1078 half udder were examined, and 268 individual milk samples (one per farm building) were collected.

**Property profile.** The farm properties had mechanical (60%) and manual (40%) milking systems, housing 22 to 108 lactating goats. The animals were of the Saanen and Alpine breeds. Ten people were interviewed, 70% (7/10) were owners, 20% were tenants (2/10) and 10% (1/10) were employees. Their average age was 42 years and all were males. Sixty percent of the interviewees had worked with goats for more than 12.9 years and 40% for less than 10 years.

All respondents (10/10) had at least completes elementary education, while 40% (4/10) had started and 30% (3/10) had completed higher education. Goat farming was considered the main activity for 50% (5/10) of the interviewees. Other concomitant activities observed were the production of cachaça, coffee and cow's milk. In this study, the farms were predominantly small properties, 80% (8/10) had an average of 10

hectares. All of the sampled properties were focused on the production of goat milk and sold the milk to a dairy or directly to the market / consumer (milk or milk products). The average price was R\$ 1.67 per liter (in 2014). In all of the properties the animals were raised in an intensive system. Dairy goats were considered profitable by 70% (7/10) of the interviewees. There was at least one employee on 60% of the properties.

The main breed found in the herds studied was Saanen (90%), and in three farms there were also Alpine goats. One farm (10%) owned exclusively brown animals. There were, on average, 60 lactating goats per farm. The mean lactation period was 282.5 days, with 70% of the properties keeping the animals in production for at least 300 days. The overall average milk yield was 140.25 liters and the average daily production was 2.55 L / animal / day. Saanen goats averaged 2.73 L / animal and Alpine goats averaged 2.3 L / animal. All of the properties subjected the animals to two milkings per day.

The lactating animals were housed in suspended slat facilities in 70% of the properties while 30% used beds, where sawdust was used in 20% and sugarcane bagasse in 10% of properties. In 90% (9/10) of the properties, the animals were individually identified, with 44% wearing collars, 22% being tattooed, 11% wearing earrings, and in 22% of the properties a combination of tattoos and collars were used.

In all of the properties, newborn animals were fed with goat's milk (40%), cow's milk (40%), milk powder of both species (10%) or a substitute (10%). The navel was healed in 90% of the properties, using 10% iodine solution. Only in 20% of the properties did the water used for the consumption of the animals come from the public supply system. In the rest of the properties, alternative sources of water were used: 30% from artesian wells, 20% from mine water, 20% from semi-artesian wells and 10% from springs. Cleaning of drinking fountains was carried out on all properties, with varying frequencies. Only 10% of drinking water of animals were cleaned daily, 30% were cleaned once a week and 30% were cleaned twice a week, and 30% were not cleaned or the interviewees did not know how to frequency of clean.

Manual milking was performed in 40% of the properties, of which 20% did not perform hygiene using pre- and post-dipping solutions, and one of them did not use a milking parlor, the animals being milked inside the stalls. All properties that performed mechanical milking (60%) maintained a hygiene routine with pre- and post-dipping solutions.

Ninety percent of the properties did not have veterinary assistance. The animals were vaccinated in only 40% of the properties: 10% used only the vaccine against clostridiosis, 20% inoculated against clostridiosis and rabies, and 10% used three vaccines, against clostridiosis, rabies and leptospirosis. No properties used the vaccine against caseous lymphadenitis, and the disease was reported in 70% of the properties. An isolation area for diseased animals was absent in 30% of the establishments.

Cleaning of the facilities with slatted floors was performed using a broom to remove the feces. Exchanging the bedding on beaten floors was carried out in conjunction with the disinfection of the premises. These hygiene procedures occurred at varying frequencies among the properties: in 40% (4/10) they were carried out every two months, in 20% (2/10) every six months, and in 10% (1/10) every 12 months. In 10%, the procedures were performed once a week or twice a month, and one respondent was not able to answer. The most commonly used disinfection method was the use of a lime-associated fire broom (60%). Other methods used were: lime only (10%), fire broom only (20%) and lime associated with quaternary ammonia solution (10%).

**Prevalence of mastitis.** One hundred and sixty-six animals were positive for mastitis, representing 62.0% (166/268) of the samples obtained (i.e. with bacterial multiplication, and three or more identical colonies (Buelow et al. 1996). Of these, 91.0% (151/166) were cases of subclinical mastitis and 9.0% (15/166) were clinical mastitis. In 38.0% (102/268) of the samples there was no bacterial multiplication, and they were considered negative for mastitis.

The prevalence of subclinical mastitis in properties housing dairy goats in the Zona da Mata of Minas Gerais was 28.0% (151/539), and the prevalence of clinical mastitis was 2.8% (15/539). The prevalence of subclinical mastitis per microregion varied between 17.0% and 59.0% (Table 3). Clinical mastitis was detected in only four microregions, where the prevalence ranged from 1.3% to 11.1% (Table 2).

Table 2: Prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy goats, by microregion that compose the mesoregion of the Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil.

Microregion	Nº of Properties	Nº of animals examined	% animals subclinical mastitis	% animals clinical mastitis
Viçosa	01	108	28 % (30/108)	11.1 % (12/108)
Ubá	01	34	53 % (18/34)	2.9 % (1/34)

Juiz de Fora	03	219	17 % (37/219)	—
Manhuaçu	02	77	30 % (23/77)	1.3% (1/77)
Muriaé	02	78	38 % (30/78)	1.3% (1/78)
Cataguases	01	22	59 % (13/22)	—
TOTAL	10	539	28 % (151/539)	2.8 % (15/539)

In properties where manual milking was performed the prevalence of mastitis was 53.2%, while in those that used mechanical milking the prevalence was 25.5%. The prevalence of mastitis was lower when milking was performed on a platform (27.5%), whereas in those properties where the animals were milked in the corral itself, a higher frequency of positive animals (59%) was found.

**Risk factors.** The frequency of cleaning of drinking fountains, the type of flooring, an interval between deliveries (<12 months), the percentage of lactating females, and manual milking all had significant effects on the prevalence of mastitis (Table 3).

Table 3 :Multivariate analysis with the distribution of variables related to management and associated with risk factors for mastitis in dairy goats from the Zona da Mata of Minas Gerais.

Explanatory variables	Subclinical mastitis			Clinical mastitis		
	<i>P</i> <sup>a</sup>	RC <sup>b</sup>	IC <sup>c</sup>	<i>P</i> <sup>a</sup>	RC <sup>b</sup>	IC <sup>c</sup>
Frequency of cleaning of drinking fountains (more vs less than 2 times per week)	<.0001	2.755	1.675-4.532	0.0395	8.612	1.109-66.853
Type of milking (manual vs. mechanical)	<.0001	4.933	2.762-8.813	NS	-	-
Installation (floor vs bed)	0.0010	1.980	1.318-2.976	0.0645	0.352	0.117-1.065
Interval between births (< 12 meses vs >12 meses)	NS	-	-	0.0046	6.579	1.789-24.390
Age at first birth (in months)	<.0001	1.499	1.258-1.789	NS	-	-
Percentage of lactating females	<.0001	6.289	2.778-14.286	NS	NS	NS

<sup>a</sup> value of *P*; <sup>b</sup> odds ratio; <sup>c</sup> confidence interval with 95%; NS = not significant (*P* > 0.10).

Cleaning of drinking water fountains less frequently (<2 times a week) increased the risk of subclinical mastitis by 2.75 times and the risk of clinical mastitis by 8.61 times. Properties where manual milking was performed were 4.93 times more likely to have cases of subclinical mastitis. The type of facility used for lactating females was a risk factor for clinical and subclinical mastitis in this study.

The use of slatted flooring increased the risk of subclinical mastitis 1.98 times, whereas the use of bedrock increased the risk of clinical mastitis 2.83 times. Manual

milking was shown to be a risk factor for subclinical mastitis in multivariate analysis, while an effect of the type of milking on clinical mastitis was not observed.

**Identification of bacteria.** One hundred and eighty-seven isolates were identified. Of subclinical mastitis and 15 of clinical mastitis. The most prevalent genus was *Staphylococcus*, and a predominance of Gram-positive bacteria over Gram negative bacteria was also observed. *Staphylococcus aureus* was the most commonly identified species (60.4%, 113/187), followed by the coagulase negative *Staphylococcus* species (CNS) identified in 32.1% of cases: *S. epidermidis* (9.1%, 17/187), *S. saprophyticus* (5.9%, 11/187), *Staphylococcus* spp. (4.3%, 8/187), *S. caprae* (4.3%, 8/187), and *S. lugdunensis* (1.6%, 3/187). Other species of Gram positive bacteria were also identified: *Bacillus* spp. (0.5%, 1/187), *Bacillus vietnamensis* (0.5%, 1/187) and *Enterococcus faecalis* (0.5%, 1/187).

Among Gram-negative bacteria four members of the family Enterobacteriaceae were identified: *Escherichia coli* (6.9%, 13/187), *Klebsiella* spp. (2.1%, 4/187), *Klebsiella oxytoca* (0.5%, 1/187), *Enterobacter aerogenes* (2.1%, 4/187) and *Leclercia adecarboxylata* (0.5%, 1/187). Two other species, *Mannheimia glucosida* (0.5%, 1/187) from the family Pasteurellaceae, and *Acinetobacter* spp. (0.5%, 1/187) of the Moraxellaceae family were also found. In clinical mastitis, two species were identified: *S. aureus* in 86.7% of cases (13/15) and *E. coli* in 13.3% (2/15).

Figure 2 shows the bacteria isolated and identified in the studied microregions. In all microregions the genus *Staphylococcus* predominated. *S. aureus* was the most isolated species in each microregion, with the exception of the Cataguases microregion where 70.0% of the isolates were coagulase negative staphylococci (CNS).

In the microregions of Ubá and Cataguases, only bacteria of the genus *Staphylococcus* were found, while in the microregions of Viçosa, Juiz de Fora, Manhuaçu and Muriaé, other species were found including members of the family Enterobacteriaceae (Fig. 2.).

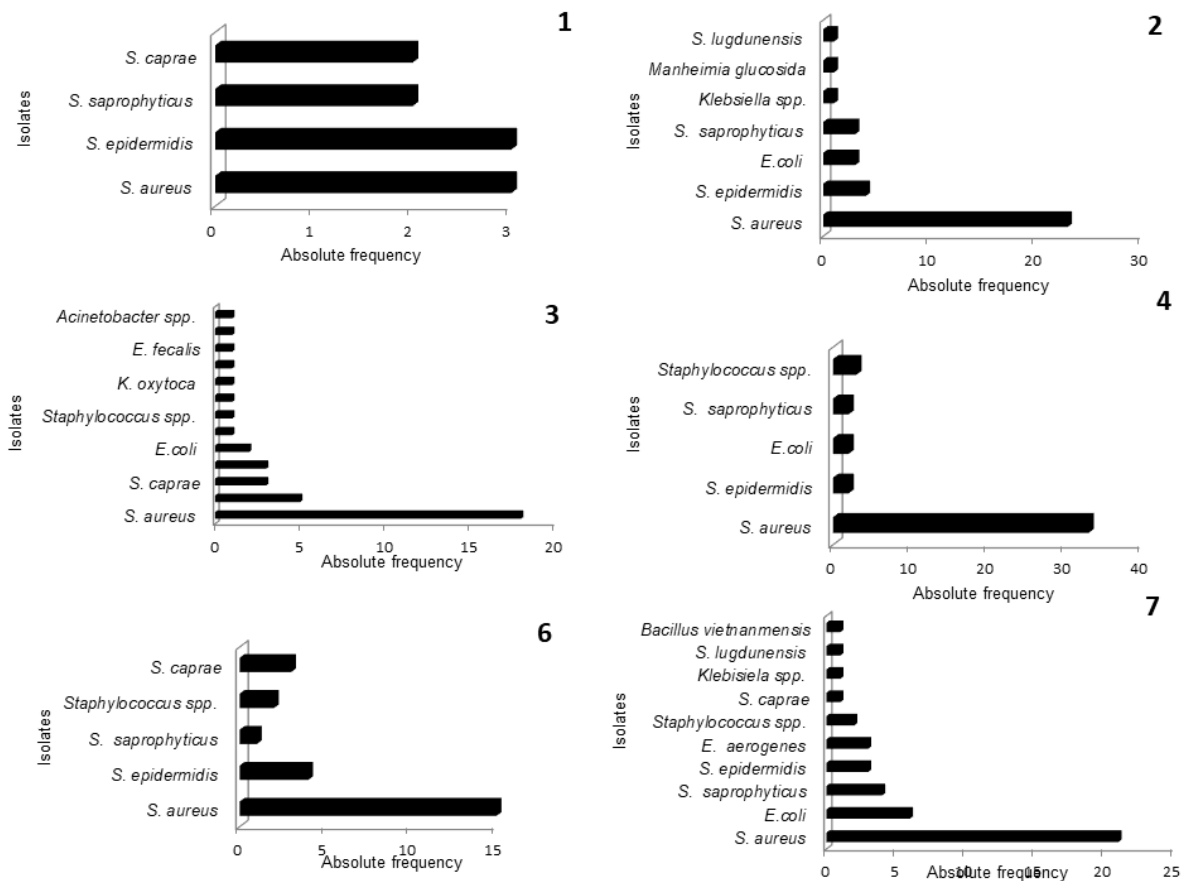


Figura 2. Distribution of bacterial species obtained from dairy goats with mastitis of mesoregion of Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil, by microregion. Microregions: Cataguases (1); Juiz de Fora (2); Manhuaçu (3); Muriaé (4); Ubá (6) and Viçosa (7). The number five (5) represents the microregion of Ponte Nova which was not collected samples.

**Antimicrobial resistance profile.** Table 3 shows the profiles of antimicrobial resistance of *Staphylococcus*. In the Cataguases microregion, a *S. saprophyticus* MDR isolate with resistance to beta-lactams (oxacillin, penicillin and ampicillin), tetracyclines (tetracycline), and cephalosporins (cefoperazone and cefepime) was found. In the Manhuaçu microregion *S. aureus* and *E. coli* MDR isolates were found. There were two *S. aureus* MDR isolates resistant to four classes: aminoglycosides (neomycin), quinolones (ciprofloxacin), beta-lactams (penicillin and oxacillin), and cephalosporins (cephalexin).

*Bacillus* spp., *Bacillus vietnamensis*, *Mannheimia glucoside* and *Enterococcus faecalis* isolates showed 100% sensitivity to all tested antimicrobials.

Twelve (12.0%, 20/166) of multi-resistant drug (MDR) isolates were found in five microregions. Among the bacteria with the highest prevalence of MDR 10.6% were *S. aureus* and 38.5% were *E. coli*.

An *E. coli* MDR isolate showed resistance to four classes: sulfonamides (sulfadiazine+trimethoprim), quinolones (enrofloxacin), tetracyclines (tetracycline), and cephalosporins (cefatiofur, cephalexin and cefepime).

In the Muriaé microregion, with two farms, MDR isolates of the species *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli* were found. Five *S. aureus* MDR isolates were found that were resistant to three classes: aminoglycosides (gentamicin), beta-lactams (penicillin and oxacillin), and cephalosporins (cephalexin). A MDR isolate of *S. epidermidis* was resistant to three classes: tetracyclines (tetracycline), beta-lactams (penicillin, ampicillin and oxacillin), and cephalosporins (cefepime). An *E. coli* MDR isolate was resistant to five classes: aminoglycosides (gentamicin and neomycin), tetracyclines (tetracyclines), cephalosporins (cefatiofur), quinolones (enrofloxacin) and sulphonamides (sulfadiazine+trimethoprim).

In the micro-region of Juiz de Fora, three MDR isolates were found. An *E. coli* isolate was resistant to four classes: beta-lactams (ampicillin), cephalosporins (cefepime, cefatiofur and cephalexin), quinolones (enrofloxacin) and sulphonamides (sulfadiazine+trimethoprim). An *S. epidermidis* isolate was resistant to four classes: aminoglycosides (gentamicin and neomycin), tetracyclines (tetracyclines), beta-lactams (ampicillin, penicillin and oxacillin), and cephalosporins (cefatiofur). An isolate of *S. saprophyticus* was resistant to four classes: aminoglycosides (gentamicin), tetracyclines (tetracyclines), beta-lactams (ampicillin, penicillin and oxacillin), and cephalosporins (cefepime).

In the micro-region of Viçosa, five MDR *S. aureus* isolates were found that were resistant to four classes: aminoglycosides (gentamicin and neomycin), tetracyclines (tetracyclines), beta-lactams (penicillin and oxacillin), quinolones (ciprofloxacin) and cephalosporins (cephalexin). No MDR isolates were found in the Ubá micro-region.

Table 4. Distribution of Gram positive bacteria obtained from dairy goats with mastitis of mesoregion of Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil.

Antimicrobial class	Antimicrobial	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>S. saprophyticus</i>			<i>Staphylococcus spp.</i>			<i>S. caprae</i>			<i>S. legdunensis</i>		
		N° of isolates (%)			N° of isolates (%)			N° of isolates (%)			N° of isolates (%)			N° of isolates (%)					
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Beta-lactâmicos	PEN	43 (38.0)	–	70 (62.0)	9 (53.0)	–	8 (47.0)	4 (40.0)	–	6 (60.0)	1 (12.5)	–	7 (87.5)	3 (37.5)	–	5 (62.5)	2 (66.6)	1 (33.33)	–
	AMP	30 (26.5)	–	83 (73.5)	3 (17.6)	–	14 (82.4)	–	–	10 (100)	–	–	8 (100)	1 (12.5)	–	7 (87.5)	–	–	3 (100)
	OXA	29 (25.6)	–	84 (74.4)	3 (17.6)	–	14 (82.4)	–	–	10 (100)	1 (12.5)	–	7 (87.5)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
Aminoglicosídeo	GEN	14 (12.3)	–	99 (87.7)	2 (11.8)	–	15 (88.2)	1 (10.0)	–	9 (90.0)	–	–	8 (100)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
	NEO	10 (8.8)	2 (1.8)	101 (89.4)	3 (17.6)	–	14 (82.4)	2 (20.0)	–	8 (80.0)	–	–	8 (100)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
	ENRO	–	–	113 (100.0)	–	–	100.0)	–	–	10 (100.0)	–	–	8 (100)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
Quinolonas	CIP	10 (8.8)	–	103 (91.2)	–	–	17 (100.0)	–	–	10 (100.0)	–	–	8 (100)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
	CFX	11 (9.7)	–	102 (90.2)	7 (41.2)	–	10 (58.8)	–	–	10 (100)	–	–	8 (100.0)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
Cefalosporina 1ª geração	CFT	3 (2.7)	5 (4.4)	105 (92.9)	2 (11.8)	–	15 (88.2)	–	–	10 (100)	–	–	8 (100)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
	CFP	4 (3.5)	5 (4.4)	104 (92.1)	2 (11.8)	–	15 (88.2)	–	–	10 (100)	–	–	8 (100)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
Cefalosporina 3ª geração	CFM	2 (1.8)	–	111 (98.2)	–	–	17 (100)	–	–	10 (100)	1 (12.5)	–	7 (87.5)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
	SUT	11 (9.7)	1 (0.9)	101 (89.4)	–	–	17 (100.0)	1 (10.0)	–	9 (90.0)	–	–	8 (100)	–	–	8 (100)	–	–	3 (100)
Cefalosporina 4ª geração	TET	19 (16.8)	–	94 (83.2)	6 (35.3)	–	11 (64.7)	3 (30.0)	–	7 (70.0)	2 (25.0)	–	6 (75.0)	2 (25.0)	–	6 (75)	3 (100)	–	–

PEN: Penicilin; AMP: Ampicilin; OXA: Oxacilin; GEN: Gentamicin; NEO: Neomicin; ENRO: Enrofloxacin; CIP: Ciprofloxacin; CFX: Cephalexin; CFT: Ceftiofur; CFP: Cefoperazone; CFM: Cefepime; SUT: Sulfadiazine + Trimethoprim; TET: Tetracycline; R: resistance; S: sensible; I: intermediary.

## Discussion

Mastitis is an important disease in livestock farming systems, especially in dairy animals, due to the damages it causes by reducing the production and quality of the milk produced, as well as incurring the costs of treatment, labor and milk disposal (Contreras et al. 2007). The high prevalence of *S. aureus* in goat's milk may pose a risk to the health of consumers. It is known that *S. aureus* produces large amounts of exotoxins known to cause staphylococcal food poisoning, and it may be involved in other types of infections in humans and animals. Since many traditional products originating from goats are not subjected to pasteurization, this may be a potential source of food poisoning (Merz et al. 2016).

The CMT is an indirect method of counting somatic cells (CCS), being the method of diagnosis of subclinical mastitis most used, due to the low cost and ease of (Mota 2008). As a result of the greater number of somatic cells in the milk of goat females, studies indicate a greater reliability of the CMT as to its sensitivity from the 2+ level. The scores (traits and 1+) should be interpreted as negative (Lima Junior et al., 1995; Contreras et al., 1996 and Almeida 2009). However association with lactoculture is important because it is considered the gold standard for the diagnosis of mastitis.

Samples of milk from goats positive in the CMT test but without bacterial isolation, must be carefully analyzed during the diagnosis of subclinical mastitis in goats to minimize false-positive reactions (Bianchini et al. 2010). The presence of other etiological agents that cannot be isolated in culture medium normally used for routine microbiological examinations, such as *Mycoplasma* (Kinde et al., 1994) and non-bacterial infectious agents like caprine arthritis encephalitis virus (CAE) (Gregory et al. 2009) and fungi (Jensen et al., 1996) must be considered.

The state of Minas Gerais pioneered dairy goat farming in Brazil by importing specialized breeds from different European countries, the United States and Canada, to improve the genetic potential and milk production in local herds (Fonseca & Bruschi 2009). The Zona da Mata of Minas Gerais is a mesoregion of great importance in the production of goat's milk in the Southeast, due to its high productivity and use of technology comparing to other states of Brazil.

In this study, the most commonly identified bacteria belonged to the genus *Staphylococcus*, with *Staphylococcus aureus* being the most frequently isolated species. This was similar to studies carried out in other countries, where animals are bred in similar conditions in Pakistan (Najeeb et al., 2013) and in Italy (Ceniti et al., 2017).

In this study, we found 27.7% (46/166) of CNS isolates, and differing from studies performed in other regions of Brazil, where they found CNS in 83.3% (Neves et al., 2010) and 79.7% of isolates in the Northeast region (Cavalcante et al., 2013), and 62.2% (Almeida et al., 2013) and 90.5% (Gomes et al., 2014) in the Southeast region. In Brazil, only phenotypic methods have been used in the identification of bacterial species from caprine mastitis samples in the studies published so far. Genotypic methods have a higher degree of discrimination (Ruegg, 2009), which may explain the differences found in this study, since we used PCR and sequencing in addition to phenotypic tests.

Mastitis was considered the main sanitary and economic problem by producers in 30% of the dairy goat properties in the Zona da Mata of Minas Gerais, and we detected a similar prevalence of mastitis in the microregions studied; however, in some microregions the prevalence of mastitis was above that threshold. This may be because most mastitis manifests in the subclinical form and the producers do not detect it. In the properties where manual milking was carried out, the prevalence of mastitis was higher, so we can infer that type of milking may be a problem. This information is important for planning measures to control mastitis in dairy herds, such as improvement in the hand hygiene of milkers.

In a study conducted by Salaberry et al. (2016) in relation to the resistance profile, *Staphylococcus* isolates from goats with mastitis in the Southeast region of Brazil presented greater resistance to penicillin (81.8%), oxacillin (60.0%) and ampicillin (55.5%) in agreement with the data obtained in this study. A study conducted by Teshome et al. (2016) in dairy goats in Ethiopia similarly found 78.9% of *S. aureus* samples were penicillin resistant.

França et al. (2012) also studied *Staphylococcus* spp. finding that isolates were more resistant to amoxicillin (50.0%), streptomycin (43.4%), tetracycline (40.5%), oxacillin (16.7%) in sheep and goat mastitis samples from the Northeast region of Brazil.

There has greater resistance to gentamicin (7.62%) in goat isolates compared to sheep isolates.

The most commonly used antimicrobials in the farms studied were oxytetracycline, penicillin and enrofloxacin. And they presented a considerable resistance profile as there was no veterinary assistance in most of the properties there were often inappropriate use in these, probably increasing the selection pressure, resulting in multiple resistance profile.

Although the results in relation to the resistance profile found in this study are in general agreement with previous research, comparison between different studies is difficult due to different methods of susceptibility testing and the interpretative criteria used to categorize isolates as susceptible or resistant. Antimicrobial tests are useful for detecting the most efficient drugs, although several factors may influence the general susceptibility pattern of mastitis pathogens (Oliver et al. 2011).

In this study was found the low percentage of MDR strains (12%) in relation to other studies was found. Even so, this data is relevant because it can interfere in the treatment of mastitis, besides the possibility of transfer of resistance genes to other bacteria. In a study carried out with several bacteria from caprine mastitis samples in Pakistan, 44% were MDR, considering two classes of antibiotics (Naajeb et al. 2013). In a study conducted in China, 39.7% of MDR *S. aureus* isolates obtained from goat's milk were resistant to four antimicrobials. In Ethiopia high MDR (69.2%) rates were found in *S. aureus* isolates from goat milk, that were resistant to two classes of antimicrobials (Teshome et al. 2016). The likely explanation for the high degree of multidrug resistance found in these studies is the repeated use of antibiotics in animals and humans in those regions and countries.

The prevalence of subclinical mastitis found in this study was 28%, in agreement with other study conducted in Brazil, the Southeast region by Gomes et al. (2014) and the northeastern region by Bianchini et al. (2010) and Peixoto et al. (2012). In Italy, Dore et al. (2016) also found the similar prevalence. All of these studies were performed with goats of the same breeds and with a similar breeding system.

However Neves et al. (2010) found the prevalence of subclinical mastitis (11.49%) lower than in this study, possibly due to the different production system (extensive) where the possibility of contamination is minor

Clinical mastitis occurred in only four microregions, and in three the prevalence was 1.3%, being within the 5% limit considered acceptable (Contreras et al. 2007). This was similar to recent studies carried out in the northeastern region of Brazil, where the prevalence of reported clinical mastitis was 3.4% in goats bred for meat and milk (Cavalcante et al. 2013) and 0.15% in goats of the same breeds and breeding system as the present study (Bianchini et al. 2010).

In only one microregion was the prevalence of clinical mastitis (11.1%) above the acceptable limit (5.0%). However, although this property used mechanical milking, it have turnover of employees could explain the difficulty of standardization of mastitis control and prophylaxis measures.

The risk factors found for mastitis in this study differed from those found in the few similar studies done in Brazil (Gomes et al. 2014, Peixoto et al. 2012, Neves et al. 2010). These studies relate to risk factors for caprine mastitis in the northeast region of the country, where the breeds, management and climatic conditions are different. This makes it difficult to compare the frequencies of bacterial isolation and risk factors with other Brazilian regions. In the southeast region, differently from the northeast, the animals tend to be raised in a more intensive regime with greater use of technology.

In this study, although the producers are well educated, and work with animals of breeds specialized for milk production using good management, some measures, mainly related to prophylaxis and control of the diseases have low adherence or are not yet established. This is likely due to the lack of veterinary assistance, as there are few veterinarians specializing in goats in the region.

The lack of veterinary assistance is reflected in the prophylactic management of diseases, since only 40% of the properties vaccinated their animals. Although the producers have a good level of education the majority do not have training in the area, and this makes it difficult for them to understand the importance of measures such as vaccination. We found similar data to those found by Gouveia et al. (2015) in a study conducted in the State of Minas Gerais, where 50% of dairy farmers used some type of vaccine, 48% used a clostridial vaccine, 1.2% vaccinated against caseous lymphadenitis, and 23.8% against rabies. However, no properties in the present study used the foot-and-mouth disease vaccine in the Zona da Mata of Minas Gerais, while Gouveia and collaborators (2015) found that 20.2% of properties used this vaccine, ignoring the prohibition of goat vaccination by the Ministério da Agricultura Pecuária e

Abastecimento (MAPA). In this study, no property used the vaccine against caseous lymphadenitis, a disease reported in 70% of the properties. This is probably due to a lack of information, or even inadequate use of the vaccine in animals that already have the disease in their internal lymph nodes or are in the incubation period, and thus present the symptoms of the disease after vaccination.

Most of the properties had at least one employee, which demonstrates the ability of the of dairy goat to generate jobs and commercialize the milk, showing the economic importance of dairy goat for the mesoregion.

## **5. Conclusions**

Foi possível observar bactérias com perfil de multiresistencia, sendo importante o controle do uso indiscriminado dos antimicrobianos, além da adoção de um programa de monitoramento com a realização de diagnóstico precoce da mastite nas propriedades, utilizando a identificação bacteriana e teste susceptibilidade aos antimicrobianos, visando o conhecimento da situação sanitária do rebanho e medidas de manejo necessárias para o controle como: aumento da frequência de limpeza dos bebedouros, estimular as medidas higienico sanitarias pelos ordenhadores e a adoção de ordenha mecanica.

## **Acknowledgements**

The authors acknowledge financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil). Moreira is supported by CNPq. The authors thank Professor Marcelo Teixeira Rodrigues (DZO / UFV), Paulo Celes Cordeiro (Caprilat) and producers of dairy goats from the Zona da Mata of Minas Gerais, for their participation and immense contribution to this study.

## **6. References**

Almeida, J.F., Aquino, M.H.C., Magalhães, H., Nascimento, E.R., Pereira, V.L.A., Ferreira, T. & Barreto, M.L. 2013. Principais alterações no leite por agentes

- causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Arq. Inst. Biol. 80: 13–18.
- Bianchini, S., da Silva, L.B.G., Silva, A.P., Lima, J.C.O., & Falcão, D.P. 2010. Frequência e etiologia da mastite caprina na região do Cariri paraibano. Med. Vet. 4: 1–5.
- Buelow, K.L., Thomas, C.B., Goodger, W.J., Nordlund, K. V. & Collins, M.T. 1996. Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. Prev. Vet. Med. 26: 1–8.
- Cavalcante, M.P., Filho, F.A., Silva, N.S., Almeida, M.G. a R., Barros, C.G.G. & Silva, M.C. 2013. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabras da Região de Salvador, Bahia. Arq. Inst. Biol. 80: 19–26.
- Ceniti, C., Britti, D., Michele, A., Santoro, L., Musarella, R., Ciambrone, L., Casalnuovo, F. & Costanzo, N. 2017. Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in dairy animals 6: 1–11.
- CLSI, 2013. Document VET01-S2: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Clin. Lab. Stand. Inst. 7, 74.
- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J. & Gonzalo, C. 2007. Mastitis in small ruminants. Small Rumin. Res. 68: 145–153.
- Dore, S., Liciardi, M., Amatiste, S., Bergagna, S., Bolzoni, G., Caligiuri, V., Cerrone, A., Farina, G., Montagna, C.O., Saletti, M.A., Scatassa, M.L., Sotgiu, G. c Cannas, E.A. 2016. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. Small Rumin. Res. 141: 91–93.
- FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistics. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>> Acesso em 15 out.2017.
- Fonseca, J. F. da & Bruschi, J.H., 2009. Produção de caprinos na região da Mata Atlântica. Embrapa Gado de Leite; Sobral: Embrapa Caprinos. Sobral - Ce, 272 p.
- França, C.A., Peixoto, R.M., Cavalcante, M.B., Melo, N.F., Oliveira, C.J.B., Veschi, J.A., Mota, R.A., Costa, M.M., Peixoto, R.M., Cavalcante, M.B., Melo, N.F., Oliveira, C.J.B. & Veschi, J.L.A. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp . from small ruminant mastitis in Brazil. Pesqui. Veterinária Bras. 32: 747–

753.

- Gomes, B.V. 2016. Conjuntura Trimestral Caprino-Ovinocultura Pernambuco. Nota Téc. 1, Conab, Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_07\\_29\\_16\\_55\\_32\\_caprinoovinocultura\\_-\\_jun\\_2016\\_-\\_sureg\\_pe.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_29_16_55_32_caprinoovinocultura_-_jun_2016_-_sureg_pe.pdf)> Acesso em 10 set. 2017.
- Gomes, V., Matazo, M.P., Da Costa E Silva, C.P., Baldacim, V.A.P., Novo, S.M.F., Baccili, C.C. & Melville, P.A., Benites, N.R. 2014. Etiologia e fatores de risco para a infecção mamária de cabras leiteiras do Estado de São Paulo. Semin. Agrar. 35: 2551–2562.
- Gouveia, A.M.G., Silva, M.X., Gouveia, G.C., Brandão, H.M., Mendonça, L.C. & Guimarães, A.D.S., 2015. Zoo-sanitary aspects of goat husbandry in Southeastern Brazil. Semin. Agrar. 36: 277–284.
- Gregory, L., Birgel Junior, E.H., Lara, M.C.C.S.H., Angelini, M., Araújo, W.P., Rizzo, H., Maiorka, P.C., Castro, R.S., Kiraly, A.C.M., Benesi, F.J. & Birgel, E.H. 2009. Clinical features of indurative mastitis caused by caprine arthritis encephalitis virus. Brazilian J. Vet. Pathol. 2: 64–68.
- IBGE 2006. Censo agropecuário: Brasil, Grandes regiões e unidades da Federação, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro\\_2006.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf)> Acesso em 10 ago. 2017.
- Jensen, H.E., Espinosa de los Monteros, A. & Carrasco, L. 1996. Caprine mastitis due to aspergillosis and zygomycosis: A pathological and immunohistochemical study. J. Comp. Pathol. 114: 183–191.
- Kinde, H., DaMassa, a J., Wakenell, P.S. & Petty, R. 1994. Mycoplasma infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). J. Vet. diagnostic Investig. 6: 423–427.
- Lima Júnior A.D., Nader Filho A. & Vianni M.C.E. 1995. Fatores condicionantes da mastite subclínica caprina
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. & Monnet, D.L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant

- bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 268–281.
- Merz, A., Stephan, R. & Johler, S., 2016. *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. *Front. Microbiol.* 7:1–7.
- Mota, R.A., 2008. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. *Tecnol. Ciência Agropecuária* 2: 57–61.
- Najeeb, M.F., Anjum, A.A., Ahmad, M.U.D., Khan, H.M., Ali, M.A. & Sattar, M.M.K. 2013. Bacterial Etiology of Subclinical Mastitis in Dairy Goats and Multiple Drug Resistance of the Isolates. *J. Anim. Plant Sci.* 23: 1541–1544.
- Neves, P.B., Medeiros, E.S., Sá, V. V., Camboim, E.K.A., Garino, F., Mota, R.A. & Azevedo, S.S. 2010. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesqui. Vet. Bras.* 30: 379–384.
- NMC, 2001. Guidelines on normal and abnormal raw milk based on somatic cell counts and signs of clinical mastitis, National Mastitis Council. p. 11–13.
- Nogueira Filho, A., Figueiredo Júnior, C.A., & Yamamoto, A. 2010. Mercado de Carne, leite e pele de caprinos e ovinos No Nordeste. *Série Doc. do Etene Fortaleza*, 128 p.
- Oliver, S.P., Murinda, S.E. & Jayarao, B.M. 2011. Impact of Antibiotic Use in Adult Dairy Cows on Antimicrobial Resistance of Veterinary and Human Pathogens: A Comprehensive Review. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 337–355.
- Peixoto, R. de M., de França, C.A., de Souza Júnior, A.F., Veschi, J.L.A. & da Costa, M.M. 2010. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesqui. Vet. Bras.* 30: 735–740.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. & Hartigan, P.J. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2 th ed, Iowa , USA.
- Ruegg, P.L., 2009. The quest for the perfect test: Phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative *staphylococci* associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 134: 15–19.
- Salaberry, S.R.S., Saidenberg, A.B.S., Zuniga, E., Gonsales, F.F., Melville, P.A. & Benites, N.R. 2016. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do

*Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. Arq. Bras. Med.Vet.Zootec. 68: 336–344.

Teshome, B., Tefera, G., Belete, B. & Mekuria, A. 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* from raw camel and goat milk from Somali region of Ethiopia. African J. Microbiol. Res. 10: 1066–1071.

## ANEXOS

**ANEXO 1:** Questionário aplicado nas propriedades de caprinos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais.

Nome: \_\_\_\_\_ Propriedade: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
Contato: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

### I- Características do entrevistado

O entrevistado é: proprietário  arrendatário  funcionário

Há quanto tempo o entrevistado trabalha com caprinos? \_\_\_\_\_

A caprinocultura é sua atividade principal?  Sim  Não

Está associado a alguma cooperativa?  Sim  Não

Qual o grau de escolaridade do entrevistado?

Ensino fundamental incompleto

Ensino fundamental completo

Ensino médio incompleto

Ensino médio completo

Ensino superior incompleto

Ensino superior completo

### II- Características da propriedade

Qual a área da propriedade?  < 100ha  100-500ha  > 500ha

Qual a área utilizada com caprinos? \_\_\_\_\_ 8- Tem energia elétrica?  Sim  Não

Há outras espécies animais na propriedade?  Sim  Não

Bovinos \_\_\_\_\_

Ovinos \_\_\_\_\_

Equinos \_\_\_\_\_

Cães \_\_\_\_\_

Gatos \_\_\_\_\_

Há quanto tempo cria caprinos? \_ 11- Tipo de exploração:  Carne  Leite  Mista

Qual o regime de criação?  Confinamento  Extensivo

Qual o número total de animais? \_\_\_\_\_

Fêmeas adultas \_\_\_ Machos adultos \_\_\_ Cabritas \_\_\_ Cabritos \_\_\_

### III- Aspectos econômicos

A caprinocultura é rentável economicamente?  Sim  Não

Há empregados na propriedade?  Sim  Não \_\_\_\_\_

O leite é vendido para consumo?  Sim  Não

Por quanto o litro do leite é vendido? \_\_\_\_\_ 18- Qual o lucro por litro de leite? \_\_\_\_\_

### IV- Aspectos produtivos

19- Há identificação dos animais?  Sim  Não Qual? \_ 20- Qual a raça?

Qual o tipo de instalação?  Piso suspenso ripado  Chão batido  Uso de cama

Qual o material da cama? \_\_\_\_\_ 23- Qual a origem da cama? \_\_\_\_\_ 24- No

período de um ano: Quantos animais nascem? \_\_\_\_\_ Quantos animais morrem?

Tem tanque de resfriamento?  Sim  Não

Qual o número total de animais em lactação? \_%: \_\_\_\_\_ 27- Qual o período médio de

lactação dos animais? \_\_\_\_\_ Qual a produção total de leite por dia? \_

29- Quantas ordenhas são realizadas por dia?

Animal/dia:  Uma (1)  Duas (2)  Uma ou duas, dependendo da estação do ano

#### V– O leite

O leite é consumido em casa?  Sim  Não

Faz algum tratamento antes do consumo?  Sim  Não Qual? \_\_\_\_

#### VI– Aspectos sanitários

Tem sala de ordenha?  Sim  Não

A ordenha é:  mecânica  manual

Realiza a higiene na ordenha?  Sim  Não

A água utilizada para o consumo dos animais é de qual origem?

Realiza a limpeza dos bebedouros?  Sim  Não Frequência: \_\_\_\_ 37- Tem

assistência veterinária?  Sim  Não  Já teve Com que frequência? \_\_\_\_

Realiza vacinação?  Sim  Não \_\_\_\_ Para aplicação de medicamentos, realiza a troca de agulhas?  Sim  não

Realiza vermifugação?  Sim  Não Via: \_\_\_\_ Frequência: \_ 42- Quais são os principais problemas sanitários encontrados?

Anemia ; Edema de barbela ; Diarreia ; Aborto ; Mastite ; Caroço (Linfadenite Caseosa) ; Outros: \_\_\_\_; Tem área de isolamento para animais doentes?  Sim  Não

Realiza a cura do umbigo ao nascimento?  Sim  Não Como? \_\_\_\_

Realiza a limpeza e desinfecção das instalações?  Sim  Não com que frequência: \_\_\_\_ Como \_\_ Qual o destino dos esterco? \_\_\_\_

Realiza o descarte de animais?  Sim  Não

Qual o manejo com animais mortos? \_\_\_\_

Realiza a secagem dos animais?  Sim  Não ; Como? \_\_\_\_

#### VII– Aspectos nutricionais

Produz ou compra alimentos para os animais?  Produz  Compra

O que é fornecido para aleitamento? \_\_ Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

O aleitamento é:  natural  artificial

O colostro é tratado?  Sim  Não \_\_\_\_

Qual o tipo de instalação de comedouro?  fora da instalação  dentro da instalação

#### VIII– Aspectos reprodutivos

Qual a idade ao primeiro parto? \_

Qual o tempo de intervalo entre partos?  < 12 meses  12 meses  > 12 meses

Qual o sistema de reprodução?  Monta controlada  Inseminação artificial

Qual a origem do reprodutor?  Compra  Da propriedade

Há separação dos animais perto do parto?  Sim  Não

Quais antimicrobianos utilizados na propriedade? \_\_\_\_\_

## **ANEXO 2: Termo de consentimento livre e esclarecido**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA DEPARTAMENTO DE VETERINÁRIA**

**Projeto: Paratuberculose e Mastite em propriedades leiteiras do Estado de Minas Gerais: identificação, determinação dos fatores de risco e ações interventivas/participativas**

**Professores responsáveis:**

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira – Telefone: (31) 3899-1470  
Abelardo Silva Júnior – Telefone: (31) 3899-1471

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_ eu, \_\_\_\_\_, carteira de RG \_\_\_\_\_, fui procurado(a) por \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_ participante do presente estudo, no endereço \_\_\_\_\_

Na ocasião fui solicitado(a) a colaborar para com o projeto acima referido, permitindo a realização de entrevista para preenchimento de questionário sobre temas relacionados à produção de caprinos leiteiros em minha propriedade e a coleta de material fecal, leite e sangue de meus animais, com o objetivo de identificar possíveis agentes causadores de doenças. A partir dessas informações será verificada a existência de associação entre os fatores da propriedade e a infecção por microrganismos eventualmente identificados.

Conforme esclarecimento dos pesquisadores, os resultados dos exames serão informados única e exclusivamente aos envolvidos. No caso de ocorrerem resultados positivos, em qualquer coleta, serei orientado(a) a procurar o serviço veterinário para orientação sobre o tratamento ou manejo do(s) animal(is) afetado(s).

A participação no estudo é voluntária, portanto não existe remuneração ou vínculo empregatício, e poderei me recusar a participar ou me retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo ou justificativa. Qualquer enfermidade ocorrida durante a pesquisa não é de responsabilidade da equipe, uma vez que os procedimentos

adotados não estão associados a qualquer dano à saúde. Assim, a equipe de trabalho fica isenta da obrigação de tratamento de enfermidade durante o estudo. Terminado o trabalho de coleta dos dados, e tendo garantido o material necessário ao desenvolvimento do projeto, foi-me garantido que toda e qualquer referência que permita a identificação da propriedade será destruída, garantindo assim sigilo absoluto das informações. Os resultados da pesquisa serão analisados e foi-me assegurada total privacidade. Em contrapartida, cedo aos pesquisadores o direito de utilizar as informações prestadas e os resultados para a realização e publicação do trabalho, direito limitado única e exclusivamente para este fim, sem qualquer tipo de identificação, não sendo permitido qualquer outro tipo de uso das mesmas.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do(a) entrevistado(a)

---

Responsável pela aplicação do questionário

**Table 1: Profile of antimicrobial resistance of Gram positive bacteria**

Microregion	Antimicrobial	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>S. saprophyticus</i>			<i>Staphylococcus spp.</i>			<i>S. caprae</i>			<i>S. legdunensis</i>			<i>Bacillus spp.</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)					
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Viçosa	Penicilina	11 (33.4)	—	22 (66.6)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ampicilina	10 (30)	—	23 (69.7)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	3 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Oxacilina	17 (51.5)	—	16 (48.5)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	2 (100)	1(33)	—	2 (67)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Gentamicina	9 (27)	—	24 (72.7)	1 (50)	—	1 (50)	1 (50)	—	1 (50)	1(33)	2 (33.3)	3(33)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Neomicina	9 (27)	2 ( 6)	22 (66.8)	1 (50)	—	1 (50)	2(100)	—	—	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	enrofloxacina	—	—	33 (100)	—	—	2 (100)	—	—	—	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ciprofloxacina	7 (21)	1 (3)	25 (75.8)	—	—	2 (100)	—	—	—	—	—	3 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefalexina	10 (30)	—	23 (69.7)	1 (50)	—	1 (50)	1(50)	—	1 (50)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefatiofur	3 (9.1)	5 ( 15.1)	25 (75.8)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	—	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefoperazona	3 ( 9.1)	5 ( 15.1)	25 (75.8)	1 (50)	—	1 (50)	1 (50.0)	—	1 (50)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefepime	2 (6)	—	31 (94)	—	—	2 (100)	—	—	—	1 (33.3)	—	2 (67)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sufila+trimetropim	11 (33.4)	1 (3.0)	21 (63.6)	—	—	2 (100)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Tetraciclina	16 (48.5)	4	17 (51.5)	2 (100)	—	—	2 (100)	—	—	1 (33.3)	—	2 (67)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Penicilina	4 (22.2)	—	14 (78)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	—
Ampicilina	4 (22.2)	—	14 (77.8)	1 (50)	—	1(100)	—	—	—	—	—	1(100)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	1(100)	1(100)	—	—	—	—	1(100)	
Oxacilina	1 (5.5)	—	17 (94.5)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	—	
Gentamicina	—	—	18 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	
Neomicina	1 (5.5)	—	17 (94.5)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	
enrofloxacina	—	—	18 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	
Ciprofloxacina	1 (5.5)	—	17 (94.5)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	
Cefalexina	—	—	18 (100)	—	—	3 (100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	
Cefatiofur	—	—	1(100)	—	—	3 (100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	
Manhuaçu	Penicilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ampicilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Oxacilina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Gentamicina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Neomicina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	enrofloxacina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ciprofloxacina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefalexina	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Microregion	Antimicrobial	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>S. saprophyticus</i>			<i>Staphylococcus spp.</i>			<i>S. caprae</i>			<i>S. legdunensis</i>			<i>Bacillus spp.</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)					
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Ubá	Cefoperazona	—	—	18 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Cefepime	—	—	18 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Sufila+trimetropim	—	—	18 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Tetraciclina	—	—	18 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	1(100)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	1(100)	1(100)	—	—	—	—	1(100)
	Penicilina	10 (66.6)	—	5 (33.4)	4(100)	—	—	—	—	—	1 (50)	—	1 (50)	3 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ampicilina	1 (6.7)	—	14 (93.3)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Oxacilina	1 (6.7)	—	14 (93.3)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Gentamicina	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Neomicina	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	enrofloxacina	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ciprofloxacina	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefalexina	—	—	15 (100)	4 (100)	—	—	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefatiofur	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefoperazona	—	—	15 (100)	—	—	4 (10)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefepime	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sufila+trimetropim	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Tetraciclina	—	—	15 (100)	—	—	4(100)	—	—	—	—	—	2 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cataguases	Penicilina	2 (66.6)	—	1 (33.4)	1 (50)	—	1 (50)	1(50)	—	1 (50)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—
Ampicilina		3 (100.0)	—	—	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Oxacilina		1 (33.4)	—	2 (66.6)	—	—	2 (100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gentamicina		—	—	3(100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Neomicina		—	—	3(100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
enrofloxacina		—	—	3(100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ciprofloxacina		1(33)	—	2(67)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Microregion	Antimicrobial	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>S. saprophyticus</i>			<i>Staphylococcus spp.</i>			<i>S. caprae</i>			<i>S. legdunensis</i>			<i>Bacillus spp.</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)					
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
	Cefalexina	—	—	3(100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefatiofur	—	—	3 (100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefoperazona	—	—	3 (100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefepime	—	—	3 (100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sufla+ trimetropim	—	—	3 (100)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Tetraciclina	2 (67))	—	1 (33)	—	—	2(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Penicilina	7(33)	—	14 (67)	1 (33.3)	—	2(67)	1 (25)	—	3 (75)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—
	Ampicilina	4 (19)	—	17 (81)	1(33)	—	2(67)	—	—	3 (75)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	1(100)	—	—	—
	Oxacilina	6 (28)	—	15 (71)	1 (33)	—	2(67)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	1 (50)	—	1 (50)	—	—	1(100)	—	—	—
	Gentamicina	—	—	17 (81)	—	—	3(100)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	1 (50)	—	1 (50)	1(100)	—	—	—	—	—
	Neomicina	—	—	21 (100)	1(33)	—	2(67)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	1 100)	—	—	—	—	—
Muriaé	enrofloxacina	—	—	21 (100)	—	—	3(100)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—
	Ciprofloxacina	—	1 (4.8)	20 (95)	—	—	3(100)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—
	Cefalexina	6 (29)	—	15 (71)	1(33)	—	2(67)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—
	Cefatiofur	—	1 (4.8)	20 (95.2)	1(33)	—	2(67)	—	—	3 (75)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—
	Cefoperazona	—	2 (9.6)	19 (90.4)	1(33)	—	2(67)	—	—	4 (100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—

Microregion	Antimicrobial	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>S. saprophyticus</i>			<i>Staphylococcus spp.</i>			<i>S. caprae</i>			<i>S. legdunensis</i>			<i>Bacillus spp.</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)					
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
	Cefepime	—	—	21 (100)	1(33.3)	—	2(67)	—	—	4 (100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—
	Sufla+ trimetropim	—	—	21 (100)	1(33)	—	2(7)	—	—	4 (100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	2(100)	—	—	1(100)	—	—	—
	Tetraciclina	—	—	21(100)	3(100)	—	—	1 (25)	—	3 (75)	1 (50)	—	1 (50)	1 (100)	—	—	2 (100)	—	—	—	—	1(100)	—	—	—
	Penicilina	9 (39)	—	14 (61)	2 (50)	—	2 (50)	2(67)	—	1 (33)	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ampicilina	8 (35)	—	15 (66)	1 (25)	—	3 (75)	—	—	2 (100)	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Oxacilina	3 (13.)	—	20 (87)	1 (25)	—	3(75)	—	—	2 (100)	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Gentamicina	2 (8.6)	1 (4.4)	20 (87)	1 (25)	—	3(75)	—	—	2 (100)	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Neomicina	—	—	23 (100)	1 (25)	—	3(75)	—	—	2 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—
Juiz de Fora	enrofloxacina	—	—	23 (100)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—
	Ciprofloxacina	1 (4.4)	—	22 (96)	1(25)	—	3(75)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefalexina	1 (4.4)	—	22 (96)	1 (25)	—	3 (75)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—
	Cefatofur	—	—	23(100)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefoperazona	1(4.4)	—	22 (96)	—	—	4(100)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefepime	—	—	23 (100)	—	—	4 (100.)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Microregion	Antimicrobial	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>S. saprophyticus</i>			<i>Staphylococcus spp.</i>			<i>S. caprae</i>			<i>S. legdunensis</i>			<i>Bacillus spp.</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)					
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
	Sufla+ trimetropim	—	—	23(100)	—	—	4(100.)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—
	Tetraciclina	1 (4.4)	—	22(96)	1 (25)	—	3 (75)	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—

**Table 2: Profile of antimicrobial resistance of Gram negatives bacterias**

Microregion	Antimicrobial	<i>Esherichia coli</i>			<i>Klebsiella spp.</i>			<i>Enterobacter aerogenes</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>			<i>Manheimia glycosida</i>			<i>Leclercia adecarboxilata</i>		
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)					
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Viçosa	Ampicilina	1 (50)	—	1 (50)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Gentamicina	—	—	2 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Neomicina	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	enrofloxacina	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ciprofloxacina	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefalexina	1 (50)	—	1 (50)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefatofur	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefoperazona	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefepime	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sufla+trimetropim	—	—	2(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Manhuaçu	Tetraciclina	1 (50)	—	1 (50)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ampicilina	1(50)	—	—	—	—	2 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—
	Gentamicina	—	—	2(100)	—	—	2 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—

Microregion	Antimicrobial	<i>Esherichia coli</i>			<i>Klebsiella spp.</i>			<i>Enterobacter aerogenes</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>			<i>Manheimia glycosida</i>			<i>Leclercia adecarboxilata</i>			
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)						
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
Muriaé	Neomicina	—	—	2(100)	—	—	2 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	
	enrofloxacina	—	—	2(100)	—	—	2 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—	
	Ciprofloxacina	—	—	2(100)	—	—	2 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	1(100)	—	—	—	—	—	—	
	Cefalexina	1(50)	—	1(50)	—	—	2 (1)	—	—	1(100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	
	Cefatiofur	—	—	2(100)	—	—	2 (100)	—	—	1(100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	
	Cefoperazona	—	—	2(100)	—	—	2 (100)	—	—	1(100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	
	Cefepime	1(50)	—	1(50)	—	—	2 (100)	—	—	1(100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	
	Sufila+trimetropim	1(50)	—	1(50)	—	—	2 (100)	—	—	1(100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	
	Tetraciclina	1(50)	—	1(50)	—	—	2 (100)	—	—	1(100)	—	—	1 (100)	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	
	Ampicilina	1 (17)	—	5(83)	1(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—
	Gentamicina	—	—	6(100)	—	—	1(100)	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Neomicina	—	—	6(100)	—	—	1(100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	enrofloxacina	—	—	6 (100)	—	—	1 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Ciprofloxacina	—	—	6 (100)	—	—	1 (100)	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Cefalexina	2 (33.4)	—	4 (67)	—	—	1 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Cefatiofur	—	—	6(100)	—	—	1 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Cefoperazona	—	—	6(100)	—	—	1 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Cefepime	—	—	6(100)	—	—	1 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Sufila+trimetropim	—	—	6(100)	—	—	1 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)
	Tetraciclina	1 (17)	—	5 (83)	—	—	1 (100)	—	—	3(100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1(100)

Microregion	Antimicrobial	<i>Esherichia coli</i>			<i>Klebisiella spp.</i>			<i>Enterobacter aerogenes</i>			<i>Klebisiella oxytoca</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>			<i>Manheimia glicosida</i>			<i>Leclercia adecarboxilata</i>			
		Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)			Number of isolates (%)						
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
Juíz de Fora	Ampicilina	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Gentamicina	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Neomicina	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	enrofloxacina	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Ciprofloxacina	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Cefalexina	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefatiofur	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefoperazona	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cefepime	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sufila+trimetropim	—	—	—	—	—	1 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Tetraciclina	—	—	—	—	—	1(100.0)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

**Capítulo III –Infecção intramamária persistente por *Staphylococcus aureus*  
após o tratamento com enrofloxacina.**

(Artigo a ser submetido a Veterinary Microbiology)

## Infecção intramamária persistente por *Staphylococcus aureus* após o tratamento com enrofloxacina.

Magna C. Lima<sup>1</sup>, Thalita S. Moreira<sup>1</sup>, Richard C. Polveiro<sup>1</sup>, Laís K. de Castro<sup>1</sup>, Samuel H. S. Guimarães<sup>1</sup>, Sanelly da C. Lourenço<sup>1</sup>, Fernando A. Paolicchi<sup>2</sup>, Maria Aparecida S. Moreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de doenças bacterianas (LDBAC), Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-900, Viçosa-MG - Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA) - Grupo de Sanidad Animal, Balcarce – Argentina.

\* Autor para correspondência: [masm@ufv.br](mailto:masm@ufv.br)

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi identificar alterações genóticas e fenotípicas características da persistência de *S. aureus* em cabras com mastite após o tratamento com enrofloxacina. Doze animais que apresentaram mastite clínica, cujo agente etiológico foi *S. aureus*, foram tratados com Enrofloxacina (Kinetomax® - Bayer), 5 mg/kg a cada 24 h, pela via intramuscular durante sete dias, de acordo com o resultado do antibiograma (material suplementar). Os animais foram reexaminados 21 dias após o tratamento. Dois animais morreram em decorrência da mastite gangrenosa, um animal obteve cura clínica e bacteriológica e nove animais apresentaram a mastite persistente.

Assim, dos nove animais foram obtidos 18 isolados de *S. aureus* (nove antes do tratamento e nove após o tratamento). Para determinação do perfil de resistência das bactérias foram detectados genes de resistência e de sistema de efluxo multidrogas pela PCR, além da detecção da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando E-test®. Para determinação do perfil de virulência foram pesquisados 16 genes de virulência pela técnica de PCR. Para confirmação da identidade genética da persistência dos isolados foram realizadas as técnicas de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). As CIMs variaram de 0.13 a 125 µg/ml nos isolados antes do tratamento, enquanto que nos isolados após o tratamento variaram de 0.25 a 96 µg/ml. A maioria dos isolados (8/9) mesmo classificados como sensíveis a enrofloxacina, apresentaram um aumento nos valores de CIM. Fenômeno que também foi observado para outros antimicrobianos como ampicilina e gentamicina. Os genes de resistência aos antimicrobianos mais detectados foram o *blaZ*, *tetM*, *tetK* e *mecA*. Vale ressaltar que um dos isolados persistentes a enrofloxacina foi considerado MRSA. Não houve variação na presença

dos genes de resistência na maioria dos isolados obtido antes e após o tratamento. Em relação aos genes de do sistema de efluxo, os mais encontrados foram *tet38* e *norC*. O gene *norA* variou nos isolados obtidos antes e depois do tratamento, aumentando em 50% dos isolados após o tratamento, indicando uma alteração na plasticidade de genoma dos isolados, o que também é associada a persistência bacteriana. Na análise de MLST e dos pulsotipos, os isolados obtidos antes e depois do tratamento apresentaram-se idênticos ou estreitamente relacionados, confirmando a persistência dos mesmos. A persistência bacteriana é um fenômeno apenas recentemente descrito na terapia de enfermidades infecciosas e a ocorrência desta em isolados clínicos associados a mastite. Isto destaca a importância dos estudos desta natureza para um melhor planejamento da terapia antimicrobiana e do reflexo da persistência bacteriana para a saúde pública.

## 1. Introdução

As infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* merecem atenção especial, devido a alta prevalência e as diversas formas de apresentação da doença, sendo responsável tanto pela mastite clínica aguda (mastite gangrenosa) quanto pela mastite subclínica (Contreras et al., 2007; Contreras and Rodríguez, 2011).

Em geral, a terapia utilizada para mastite é o uso de antimicrobianos, entretanto, o sucesso da terapia desaponta em muitos casos, não melhorando a saúde do úbere, e as contagens de células somáticas continuam altas ou, se diminuem, retornam a aumentar em um curto espaço de tempo (Eskine et al., 2002). Na maioria das vezes a falha no tratamento é atribuída ao fenômeno da resistência antimicrobiana (Martins et al., 2015).

Contudo, recentemente os fenômenos de tolerância e persistência têm trazido maior complexidade a questão das falhas nas terapias antimicrobianas (Brauner et al., 2016). A persistência é associada a sobrevivência de micro-organismos sensíveis a determinada droga antimicrobiana pela evolução de subpopulações heterogêneas, mesmo em populações clonais associadas a produção de toxinas no meio intracelular, o que leva a superexpressão de bombas de efluxo, redução na multiplicação, dormência e fenômenos de HGT e mutações (Pu et al., 2016). Segundo Bojer et al.

(2018) o estudo da persistência, bem como dos mecanismos para sua erradicação são de grande interesse a comunidade científica.

Na medicina veterinária, algumas famílias são subutilizadas em comparação com o uso em humanos. Um número muito limitado de novas moléculas foi introduzido na medicina veterinária nas últimas décadas, incluindo a tiamulina, o florfenicol e as fluoroquinolonas. As fluoroquinolonas introduzidas recentemente, a enrofloxacin, a marbofloxacin, a difloxacin ou a danofloxacin são usadas na maioria dos países (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001)

O Sistema de efluxo multidrogas é um fenômeno relatado de forma crescente relacionado aos mecanismos de resistência, muito destes sistemas são capazes de extrudar várias classes antimicrobianas, promovendo fenótipos de resistência a múltiplos fármacos (Costa et al., 2013). Em *S. aureus* foram identificadas, até o momento, aproximadamente 21 sistemas de efluxo multidrogas, codificados no cromossomo ou em plasmídeos (Jang, 2016). A família MFS tem sido amplamente estudada entre os sistemas de efluxo de multidrogas estafilocócicas que inclui cinco sistemas de efluxo, *norA*, *norB*, *norC*, *ImrS* e *et38* descritos como os principais mecanismos de resistência (Costa et al., 2013; Floyd et al., 2010; Kaatz et al., 2005; Kaatz and Seo, 1997).

Nas últimas décadas, a genotipagem de *S. aureus* tem sido um auxílio importante nos estudos epidemiológicos da mastite e contribui para a compreensão da disseminação do patógeno (Castelani et al., 2013). Em estudos de genotipagem de *S. aureus* o método mais utilizado é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), considerado padrão ouro. Outra técnica também utilizada genotipagem é o *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e de grande valia na comparação de dados entre laboratórios, sendo utilizado em conjunto com o PFGE (Rodriguez et al., 2015; Trindade, et al., 2003; Turlej, Hryniewicz e Empel, 2011).

O presente estudo teve como objetivo identificar alterações genotípicas e fenotípicas em *S. aureus* isolados de cabras com infecção intramamária persistente após o tratamento com enrofloxacin.

## **2. Material e Métodos**

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA / UFV com o número 42/2014.

## 2.1. Animais e obtenção de *Staphylococcus aureus*

Foram examinados 108 cabras das raças Saanen e Parda Alpina, criados em regime intensivo, em uma propriedade localizada na mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil, região de grande importância na produção e comercialização de leite caprino do Sudeste (Cordeiro and Cordeiro, 2009). Doze animais que apresentaram mastite clínica, cujo agente etiológico foi *S. aureus*, foram tratados com Enrofloxacin (Kinetomax® - Bayer), 5 mg/kg a cada 24 h, pela via intramuscular durante sete dias, de acordo com o resultado do antibiograma (material suplementar). Os animais foram reexaminados 21 dias após o tratamento. Dois animais morreram em decorrência da mastite gangrenosa, um animal obteve cura clínica e bacteriológica e nove animais apresentaram a mastite persistente.

Assim, dos nove animais foram obtidos 18 isolados de *S. aureus* (nove antes do tratamento e nove após o tratamento). Os isolados foram identificados por métodos fenotípicos (morfotintorial e bioquímico) e genotípicos (PCR – gene *femA* e sequenciamento). No Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC), departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, os isolados de *S. aureus* foram armazenados a -80°C, em microtubos contendo caldo Infusão de Cérebro Coração (BHI) acrescido de 20% de glicerol.

## 2.2. Avaliação da persistência

Foram realizadas duas técnicas para avaliar a persistência da infecção, ou seja, para confirmar se foi o mesmo isolado antes e após o tratamento.

### 2.2.1. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

O MLST foi realizada através de reações de PCR, em cada reação contendo 25 µL de Green Master Mix 2X GoTaq® (Promega Corp.), 10 pmoles de cada *primer* (Tabela 1) e 2 µL (100ng/ µL) de DNA, completando o volume com água nuclease *free* obtendo um volume final de 50 µL. A PCR foi realizada uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 55°C durante 1 min, extensão a 72°C por 1 min, e desnaturação a 95°C durante 1 min, seguido de um passo de extensão final de 72°C para 5 min. Foi seguido o protocolo descrito por Enright e colaboradores (2000)

(Tabela 4). Os produtos amplificados foram enviados para o sequenciamento na empresa MacroGen Incorporation (Seoul, Coréia do Sul). As duas sequências de DNA foram trimadas no programa Geneious®, versão 10.2.3. As fitas foram alinhadas pelo método Clustal W e formada a fita consenso, com o programa MEGA, versão 7.0.21. E as sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados de *S. aureus* no site do MLST (<http://saureus.mlst.net/>).

Tabela 1. *Primers* utilizados para a detecção genes housekeeping de *Staphylococcus aureus* para realização da técnica de *Multi Locus Sequence Typing (MLST)*.

Gene	Sequencia	Produto (bp)
<i>arcC-f</i> - Carbamato quinase	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	456
<i>arcC-r</i> - Carbamato quinase	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE-f</i> - Desidrogenase do chiquimato	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
<i>aroE-r</i> - Desidrogenase do chiquimato	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
<i>glpF-f</i> - Glicerol quinase	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
<i>glpF-r</i> - Glicerol quinase	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>gmk-f</i> - Guanilato quinase	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
<i>gmk-r</i> - Guanilato quinase	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	
<i>pta-f</i> - Fosfato acetiltransferase	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
<i>pta-r</i> - Fosfato acetiltransferase	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi-f</i> - Triose-fosfato isomerase	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA C	402
<i>tpi-r</i> - Fosfato acetiltransferase	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL-f</i> - Acetil coenzima A acetil transferase	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
<i>yqiL-r</i> - Acetil coenzima A acetil transferase	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Fonte: Enright et al., 2000.

### 2.2.1. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As análises de macrorrestrição do DNA de *S. aureus* foram realizadas seguindo o protocolo descrito por André e colaboradores (2008), com algumas modificações. Para a confecção dos plugs dos 18 isolados de *S. aureus* (nove antes e nove após o tratamento), os isolados foram inoculados em caldo tripton de soja (TSB) e incubados a 37°C por 16 horas até a obtenção da densidade óptica (DO) de 1 ( $\lambda=590\text{nm}$ ). Após o ajuste da DO, 150  $\mu\text{l}$  da suspensão bacteriana foram transferidas para micro tubos e centrifugados a 16000Xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 150  $\mu\text{l}$  de solução Cell Suspension Buffer + 7  $\mu\text{l}$  de solução de lisostafina (1mg/ml) + 7  $\mu\text{l}$  de solução de lisozima (10mg/ml) + 150  $\mu\text{l}$  de agarose de baixo ponto de fusão a 1% e mantida a 50°C. Para a digestão enzimática, cerca de 1/5 do plug original foi seccionado e adicionado em micro tubos de 0,5 mL devidamente identificados. Os plugs foram submetidos à estabilização inicial em 200

µL do tampão da enzima (TE) 1X por 10 min. Após a retirada do tampão, 150 µL do TE 1X novamente adicionados, acompanhados de 20 U da enzima de restrição *Sma*I (Promega Corporation, Madison, EUA), seguido de incubação a 25 °C por 4 h.

O DNA presente nos plugs, foi separado utilizando o aparelho CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), seguindo o protocolo de corrida: 40-100s por 2 h, seguido de 2-35 s por 20 h, em ângulo de 120°, 6V/cm, em tampão TBE 0,5X mantido a 14 °C, Foi utilizada como marcador *Salmonella enterica* serotype Braenderup H9812 (CDC), restringidas com 20 UI de *Xba*I (Hunter et al., 2005) e adicionado em duas canaletas por gel realizado. Os géis obtidos foram revelados em banho de imersão com o corante intercalante UniSafe Dye® (Uniscience, Brasil) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados para análise posterior. As bandas obtidas foram analisadas usando o software BioNumerics v.6.6.4 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Para a análise e interpretação dos resultados foi construído um dendrograma através do método de agrupamento Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), usando o coeficiente de similaridade de 95% e com grau de tolerância e otimização de 5% cada. (Tenover et al., 1995).

## **2.2. Perfil de resistência**

### *2.2.1. Concentração inibitória mínima (CIM)*

As CIMs foram realizadas utilizando o método E-test® (bioMerieux) O inóculo bacteriano foi preparado em caldo Müeller-Hilton (MH) e a turbidez ajustada a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). O inóculo foi semeado em placa contendo ágar MH, e as fitas E-test® foram dispensadas sobre a superfície do ágar e em seguida as placas foram incubadas a 37° por 24 horas, após ao período de incubação foi feita a leitura das placas e a interpretação realizada seguindo as diretrizes e os pontos de corte do fabricante. Foram utilizados antimicrobianos presentes nos perfis de resistência dos 18 isolados determinados pelo método de difusão em disco (material suplementar) e pela disponibilidade comercial das fitas (penicilina, oxacilina, ampicilina, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina e vancomicina).

### *2.2.2. Extração de DNA*

A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®) seguindo o protocolo descrito para bactérias Gram positiva com modificações pela adição de 100µL de lisostafina ( $100\mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma®), e incubação a 37°C, em banho-maria, por 45 minutos na etapa de lise. O DNA extraído foi utilizado para os demais PCRs realizadas neste estudo.

### 2.2.3. Genes de resistência

Os genes de resistência foram detectados pela técnica da PCR (tabela 1) e selecionados de acordo com os perfis de resistência dos isolados previamente determinados.

A PCR foi realizada contendo 12,5 µL Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 10 µM de cada *primer*, 2 µL (aproximadamente 100 ng/µL) de DNA e completando o volume com água nuclease *free* até o volume final de 25 µL.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese horizontal em géis de agarose a 2% (p / v) em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5 x, foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb (Promega Corp.), os géis obtidos foram revelados em banho de imersão com intercalante UniSafe Dye® (Uniscience, Brasil) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

### 2.2.4. Sistema de Efluxo Multidrogas

A detecção de genes dos sistemas de efluxo multidrogas foi realizada pela técnica de PCR utilizando genes pertencentes as famílias (tabela 2) que transportam antimicrobianos presentes nos perfis de resistência encontrados nos isolados de *S. aureus*. A PCR foi realizada contendo 12,5 µL Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 10 µM de cada *primer* (tabela 2) e 2 µL (aproximadamente 100 ng/ µL) de DNA e completando o volume com água nuclease *free* 25 µL de volume final.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese horizontal em géis de agarose a 2% (p / v) em tampão TBE 0,5 x, foi utilizado marcador de peso molecular 100 pb (Promega Corp.), os géis obtidos foram revelados em banho de imersão com

o corante intercalante UniSafe Dye® (Uniscience, Brasil) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

## 2.3. Perfil de virulência

### 2.3.1. Detecção de genes de virulência

Foram pesquisados 16 genes de virulência. Os genes *seg+sei* e *seh+sej*, foram detectados utilizando PCR multiplex (Bania et al., 2006). Os demais foram detectados pela PCR convencional, utilizando *primers* com sequências descritas na literatura (tabela 3).

Em cada reação PCR convencional continha 12,5 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 8,5 µL de água nuclease *free*, 400 Nm de cada *primer* e 2 µL de DNA (aproximadamente 100 ng/ µL). Já as reações *multiplex* para a amplificação dos genes *seg+sei*, *seh+sej*, *sek+sel* e *sem+seo* eram constituídas de 12,5 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 8,5 µL de água nuclease *free*, 200 nM de cada primer e 2 µL do DNA totalizando 25 µL de volume final. As condições de amplificação para os genes *seg+sei*, *seh+sej* foram consideradas as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 52 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1,5 min; com extensão final a 72 °C por 5 min (Bania et al., 2006).

Cepas-referência de *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo, FRI 100 (*sea*); ATCC 14458 (*seb*); ATCC 19095 (*sec*, *seg*, *seh*, *sei*); FRI 472 (*sed*); FRI 326 (*see*) cedidas pela Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz-RJ).

Tabela 2. *Primers* utilizados na detecção de genes de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento através da técnica de PCR.

Gene	Sequência (5' - 3')	Produto (bp)	Resistência	Referência
<i>mecA - f</i>	CCTAGTAAAGCTCCGGAA	314	Meticilina	(Choi et al., 2003)
<i>mecA - r</i>	CTAGTCCATTCGGTCCA			
<i>Aac(6')/aph(2') - f</i>	GAAGTACGCAGAAGAGA	491	Aminiglicosídeo	(Choi et al., 2003)
<i>Aac(6')/aph(2') - r</i>	ACATGGCAAGCTCTAGGA			
<i>aph(3')-IIIa - f</i>	AAATACCGCTGCGTA	242	Aminiglicosídeo	(Choi et al., 2003)
<i>aph(3')-IIIa - r</i>	CATACTCTTCCGAGCAA'			
<i>ant(4')-Ia - f</i>	AATCGGTAGAAGCCCAA	135	Aminiglicosídeo	(Choi et al., 2003)
<i>ant(4')-Ia - r</i>	GCACCTGCCATTGCTA			
<i>tet(M) - f</i>	AGT GGA GCG ATT ACA GAA	360	Tetraciclina	(Ruegg et al., 2015)
<i>tet(M) - r</i>	CAT ATG TCC TGG CGT GCT TA			
<i>tet(K) - f</i>	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT	158	Tetraciclina	(Ruegg et al., 2015)
<i>tet(K) - r</i>	GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA			
<i>blaZ - f</i>	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC	173	B-lactâmicos	(Ruegg et al., 2015)
<i>blaZ - r</i>	TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC			
<i>ermA - f</i>	TAT CTT ATC GTT GAG AAG GGA TT	139	Macrolídeos	(Martineau et al., 2000)
<i>ermA - r</i>	CTA CAC TTG GCT TAG GAT GAA A			
<i>ermB - f</i>	CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT	142	Macrolídeos	(Martineau et al., 2000)
<i>ermB - r</i>	GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA			
<i>ermC - f</i>	CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C	299	Macrolídeos	(Martineau et al., 2000)
<i>ermC - r</i>	ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT C			

Tabela 3. *Primers* utilizados para detecção de genes de sistema de efluxo multidrogas de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento através da técnica de PCR.

Gene	Família	Sequência (5'-3')	Produto (bp)	Referência
<i>tet38 - f</i>		TTCAGTTTGGTTATAGACAA	200	(Truong-Bolduc et al., 2005)
<i>tet38 - r</i>	MFS	CGTAGAAATAAATCCACCTG		
<i>norA - f</i>		TGCAATTTTCATATGATCAATCCC	150	(Truong-Bolduc et al., 2003)
<i>norA - r</i>	MFS	AGATTGCAATTCATGCTAAATAT		
<i>norB - f</i>		ATAAGGTAAGATAACTAGCA	150	(Truong-Bolduc et al., 2006)
<i>norB - r</i>	MFS	ATCTCTATTTGCCTCCCTATA		
<i>norC - f</i>		AAA TGGTTCTAAGCGACCAA	200	(Truong-Bolduc et al., 2006)
<i>norC - r</i>	MFS	ATAAATACCTGA AGCAACGC		
<i>LmrS - f</i>		TAAAGTTGAATTAACAAC	180	(Floyd et al., 2010)
<i>LmrS - r</i>	MFS	GCGGATCCTTA AAATTTT		
<i>mgrA - f</i>		CGAATTCATTCATGATTT	200	(Truong-Bolduc et al., 2005)
<i>mgrA - r</i>	n.d.	AAAGTTGATTGTTTATTA		
<i>msrA - f</i>		TCC AAT CAT AGC ACA AAA TC	890	(Martineau et al., 2000)
<i>msrA - r</i>	ABC	AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT		

MFS: Major facilitator superfamily (Superfamília dos principais facilitadores); ABC: ATP-binding cassette (Casete ligador de ATP); n.d.: não classificado em família.

Tabela 4. *Primers* utilizados para detecção do perfil de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento através da técnica de PCR.

Gene	Sequencia (5' - 3')	Produto (bp)	Referência
<i>hla - f</i>	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	Jarraud et al. (2002)
<i>hla - r</i>	CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
<i>fnbA - f</i>	GTGAAGTTTTAGAAAGGTGGAAAGAITAG	643	(Tristan et al., 2003)
<i>fnbA - r</i>	GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC		
<i>fnbB - f</i>	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	524	(Tristan et al., 2003)
<i>fnbB - r</i>	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		
<i>eta - f</i>	ACT GTA GGA GCT AGT GCA TTT GT	190	Jarraud et al. (2002)
<i>eta - r</i>	TGG ATA CTT TTG TCT ATC TTT TTC ATC AAC		
<i>etb - f</i>	CAG ATA AAG AGC TTT ATA CAC ACA TTA C	621	Jarraud et al. (2002)
<i>etb - r</i>	AGT GAA CTT ATC TTT CTA TTG AAA AAC ACT C;		
<i>lukDE - f</i>	TGA AAA AGG TTC AAA GTT GAT ACG AG	269	Jarraud et al. (2002)
<i>lukDE - r</i>	TGT ATT CGA TAG CAA AAG CAG TGC A		
<i>tst - f</i>	TTC ACT ATT TGT AAA AGT GTC AGA CCC ACT	180	Jarraud et al. (2002)
<i>tst - r</i>	TAC TAA TGA ATT TTT TTA TCG TAA GCC CTT		
<i>sea - f</i>	ACGATCAATTTTTACAG	544	Mehrotra et al. (2000).
<i>sea - r</i>	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC		
<i>seb - f</i>	GAATGATATTAATTCGCATC	416	Mehrotra et al. (2000).
<i>seb - r</i>	TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC		
<i>sec - f</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	Mehrotra et al. (2000).
<i>sec - r</i>	AAATCGGATTAACATTATCCA		
<i>sed - f</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317	Mehrotra et al. (2000).
<i>sed - r</i>	TAATGCTATATCTTATAGGG		
<i>see - f</i>	TAGATAAAGTTAAAACAAG	170	Mehrotra et al. (2000).
<i>see - r</i>	TAACCTACCGTGGACCCTTC		
<i>seg - f</i>	GTTAGAGGAGGTTTTATG	198	Bania et al, (2006)
<i>seg - r</i>	TTCCTTCAACAGGTGGAGA		
<i>seh - f</i>	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	173	Bania et al, (2006)
<i>seh - r</i>	CCCAAACATTAGCACCA		
<i>sei - f</i>	GGCCACTTTATCAGGACA	328	Bania et al, (2006)
<i>sei - r</i>	AACTTACAGGCAGTCCA		
<i>selj - f</i>	GTTCTGGTGGTAAACCA	131	Bania et al, (2006)
<i>selj - r</i>	GCGGAACAACAGTTCTGA		

## 2.5. Análises estatísticas

As relações da presença/ausência dos genes de virulência, resistência e sistema de efluxo multidrogas (variáveis explicativas) com a mastite antes e após o tratamento (variável resposta) foram analisadas por regressão logística politômica. Inicialmente, foi realizada a análise de regressão logística univariada, os genes que apresentaram efeito significativo ( $P < 0.05$ ) foram analisados por regressão logística multivariada e somente os genes com efeito significativo a  $P < 0.05$  foram mantidos no modelo final. As variáveis explicativas que não apresentaram problemas de convergência na regressão logística foram avaliadas pelo teste de associação de Freeman-Halton.

## 3. Resultados

Analisando os alelos obtidos no MLST, foi encontrado somente um complexo clonal (CC), o CC 133, composto do tipo de sequência (ST) 133 (Tabela 6). No isolado obtido do animal 8 após o tratamento houve modificação no alelo correspondente ao gene *yqil* relacionado ao metabolismo da Acetyl coenzyme A acetiltransferase.

*S. aureus* isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento apresentaram cinco clusters (I-V) distintos que abrigavam de dois a cinco isolados simultaneamente (figura 1). Foram encontrados oito pulsotipos, três isolados não foram agrupados em nenhum *cluster*, destes, um isolado foi obtido de um animal (5) antes do tratamento e dois isolados foram obtidos de dois diferentes animais (8 e 101) após o tratamento.

Os isolados obtidos dos animais antes e após o tratamento apresentaram pulsotipos idênticos ou estreitamente relacionados diferindo por duas ou três bandas, confirmando a persistência do mesmo clone (Figura 1).

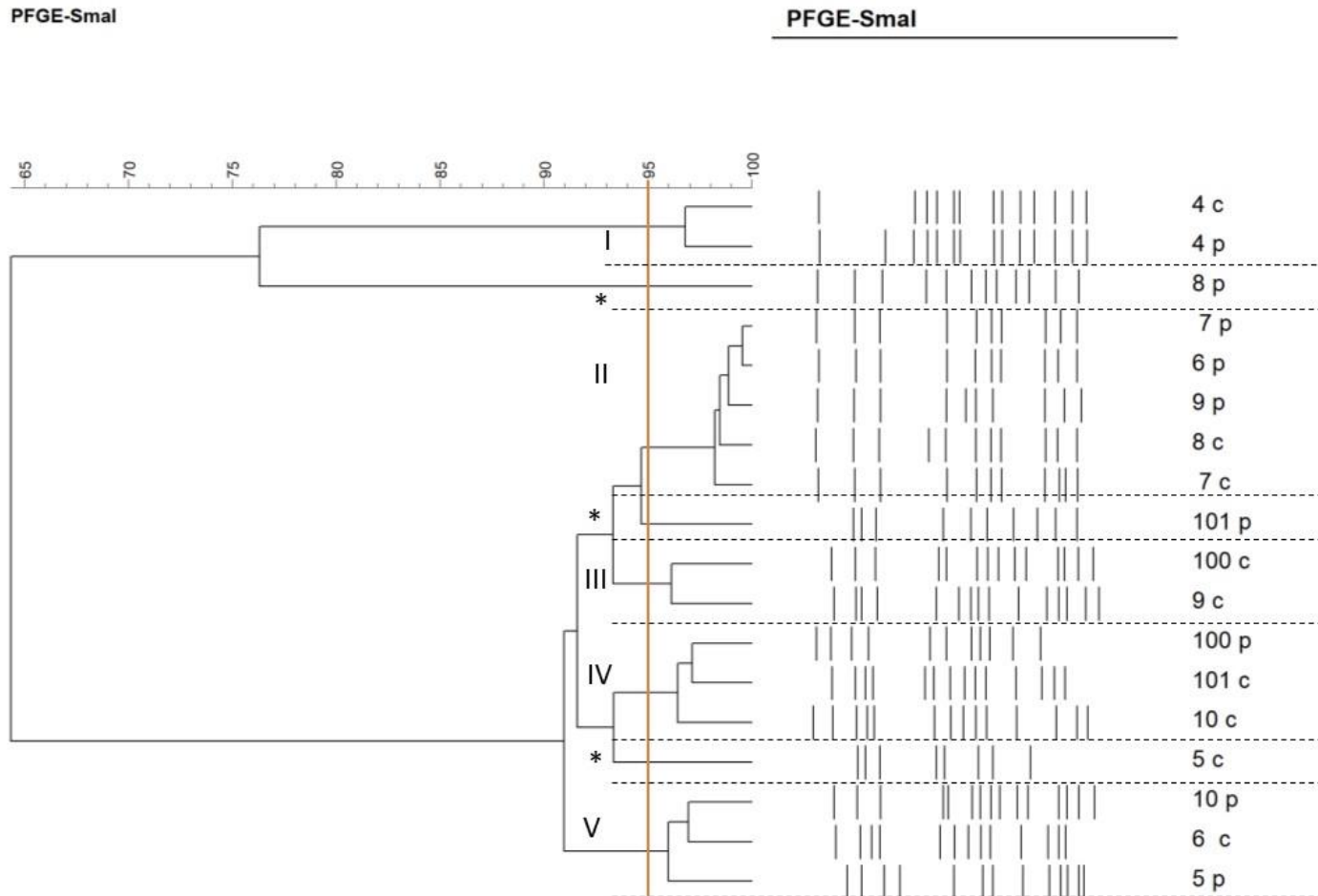


Figura 1. Dendrograma dos perfis de PFGE gerado pela análise UPGMA/Dice (Bionumerics, Applied Maths) dos 18 isolados de *Staphylococcus aureus* (com 95 % de similaridade e 5% de tolerancia e otimização). Isolados pertencentes aos *clusters* (I-V) separados por linhas pontilhadas;\* Isolados não agrupados em *clusters*, constituindo distintos *pulsotypes*. °: mastite clínica; °: mastite persistente.

### 3.1. Perfil de resistência

Os valores das CIMs estão apresentados na tabela 5. De acordo a CIM os isolados apresentaram resistência a: oxacilina, penicilina, ampicilina e tetraciclina. As MICs variaram de 0.13 a 125 µg/ml nos isolados antes do tratamento, enquanto que nos isolados após o tratamento as CIMs variaram de 0.25 a 96 µg/ml. As menores MICs observadas foram para enrofloxacina e ciprofloxacina enquanto que as maiores foram para a tetraciclina e penicilina.

Entre os isolados obtidos do mesmo animal antes e após o tratamento observou-se grande variações das CIMs. A maioria dos isolados após o tratamento aumentaram a MIC para os antimicrobianos enrofloxacino, ampicilina e gentamicina.

A maioria dos isolados obtidos após o tratamento mantiveram a CIM para os antimicrobianos ciprofloxacino, oxacilina, penicilina, tetraciclina e vancomicina.

Os animais que ocorreram maiores variações nas CIMs aos antimicrobianos testados frente aos isolados antes e após o tratamento foram o 8 e 6, variações em sete antimicrobianos. Com exceção do animal 101 onde observamos o mesmo perfil de resistência nos isolados obtidos antes e depois do tratamento embora apresentou um perfil de resistência múltipla (tabela 5).

Em seis isolados (33,3 %) apresentaram-se resistentes a vancomicina pela CIM, e em dois isolados obtidos de dois animais após o tratamento ocorreu o aumento CIM. E três isolados de *S. aureus* apresentaram perfil de resistência intermediário à vancomicina (VISA). Persistencia e caminhando para resistência.

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) ( $\mu\text{g/ml}$ ) de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento, utilizando o E-test (bioMerieux).

<i>S. aureus</i>	Antimicrobianos							
	ENO	CIP	PEN	AMP	OXA	VAN	GEN	TET
4 <sup>c</sup>	0,19	3	24	3	24	0,25	3	125
4 <sup>p</sup>	0,75	3	24	16	24	0,145	6	32
5 <sup>c</sup>	0,38	3	16	12	24	3	12	64
5 <sup>p</sup>	1,25	12	16	12	32	3	12	16
6 <sup>c</sup>	0,38	96	8	6	32	1,5	3	16
6 <sup>p</sup>	0,75	96	96	24	42	16	6	24
7 <sup>c</sup>	0,125	0,25	24	12	24	18	4	36
7 <sup>p</sup>	0,19	0,48	24	12	24	18	8	32
8 <sup>c</sup>	0,25	0,64	12	2	12	6	3	96
8 <sup>p</sup>	0,25	3	32	3	32	12	4	96
9 <sup>c</sup>	0,19	3	32	3	32	32	1	96
9 <sup>p</sup>	0,5	3	38	3	48	32	0,5	96
10 <sup>c</sup>	0,75	3	48	12	48	48	12	48
10 <sup>p</sup>	0,75	4	96	12	96	48	3	48
100 <sup>c</sup>	0,5	2	12	12	12	48	4	48
100 <sup>p</sup>	0,5	12	12	18	12	96	2	48
101 <sup>c</sup>	16	6	0,75	12	96	3	48	18
101 <sup>p</sup>	16	6	0,75	12	96	3	48	18

Os números na primeira coluna correspondem a identificação do animal; os números em negrito correspondem ao ponto de corte da concentração inibitória mínima. ENO = Enrofloxacina (**4  $\mu\text{g/ml}$** ), PEN = penicilina (**0,25  $\mu\text{g/ml}$** ); OXA = oxacilina (**4  $\mu\text{g/ml}$** ); AMP= ampicilina (**4  $\mu\text{g/ml}$** ); GEN = gentamicina (**16  $\mu\text{g/ml}$** ); TET = tetraciclina (**16  $\mu\text{g/ml}$** ); CIP = ciprofloxacina (**4  $\mu\text{g/ml}$** ) e VAN = vancomicina (**32  $\mu\text{g/ml}$** ). <sup>c</sup>: mastite clínica; <sup>p</sup>:mastite persistente.

### 3.2. Perfil de virulência

A detecção dos genes de virulência de *S. aureus* isolados antes e após o tratamento estão mostrados na tabela 6. Foram detectados somente nove genes (*hla*, *fnbA*, *fnbB*, *eta*, *etb*, *sea*, *sec*, *seh* e *sej*). Os genes mais detectados nos isolados obtidos de animais com mastite foram: *hla* (14/18) seguido dos *fnbB* (8/18) e *fnbA* (6/18).

Nos isolados obtidos do mesmo animal (4, 5, 9 e 100), antes e após o tratamento, somente quatro tiveram variações no perfil de virulência, alterando somente um gene em cada isolado. O gene *hla* não estava presente nos isolados obtidos dos animais 5 e 9 antes do tratamento, mas foi detectado após o tratamento, enquanto que nos isolados obtidos do animal 4 foi detectado o gene *eta*, e no isolado obtido do animal 100 o gene *etb*. Não houve diferenças estatísticas.

Tabela 6: Perfis de resistência, de virulência e clonal de *Staphylococcus aureus* isolados de cabras leiteiras com mastite antes e após o tratamento.

S. aureus	Perfil de resistência	Perfil de virulência	PFGE Cluster	Perfil clonal							
				MLST Genes housekeeping							ST
				arcc	aroe	glpf	gmk	pta	tpi	yqil	
4 <sup>c</sup>	<i>blaZ, ermA, mecA, tetK, tetM, lmrS, norA, norC, tet38.</i>	<i>fnbA, fnbB, hla.</i>	I	6	66	46	2	7	50	18	133
4 <sup>p</sup>	<i>blaZ, ermA, mecA, tetK, tetM, lmrS, norA, norC, tet38.</i>	<i>eta, fnbA, fnbB, hla.</i>	I	6	66	46	2	7	50	18	133
5 <sup>c</sup>	<i>ermA, tetK, tetM, norA, norC, tet38.</i>	<i>eta, fnbB, sea, sej.</i>	*	6	66	46	2	7	50	18	133
5 <sup>p</sup>	<i>ant, tetK, tetM, lmrS, norA, norC, tet38.</i>	<i>eta, fnbB, hla, sea, sej.</i>	V	6	66	46	2	7	50	18	133
6 <sup>c</sup>	<i>ant, blaZ, norA, tetM, tetK, norC, tet38.</i>	<i>etb, sej, sec</i>	V	6	66	46	2	7	50	18	133
6 <sup>p</sup>	<i>ant, blaZ, tetM, tetK, norA, norC, tet38.</i>	<i>etb, sej, sec.</i>	II	6	66	46	2	7	50	18	133
7 <sup>c</sup>	<i>blaz, norA, norC, tet38.</i>	<i>fnbA, fnbB, hla.</i>	II	6	66	46	2	7	50	18	133
7 <sup>p</sup>	<i>ant, blaz, ermB, tetM, tetK, lmrS, norA, norC, tet38</i>	<i>fnbA, fnbB, hla.</i>	II	6	66	46	2	7	50	18	133
8 <sup>c</sup>	<i>ermB, lmrS, norC, tet38</i>	<i>etb, hla.</i>	II	6	66	46	2	7	50	18	133
8 <sup>p</sup>	<i>ermB, lmrS, norC, tet38</i>	<i>etb, hla.</i>	*	6	66	46	2	7	50	5	133
9 <sup>c</sup>	<i>mecA, blaz</i>	<i>etb, sea,</i>	III	6	66	46	2	7	50	18	133
9 <sup>p</sup>	<i>mecA, blaz, tetM, tetK, norC, norA, tet38</i>	<i>etb, hla, sea,</i>	II	6	66	46	2	7	50	18	133
10 <sup>c</sup>	<i>ant, norC, tet38</i>	<i>hla, seh</i>	IV	6	66	46	2	7	50	18	133
10 <sup>p</sup>	<i>ant, norC, tet38</i>	<i>hla, seh</i>	V	6	66	46	2	7	50	18	133
100 <sup>c</sup>	<i>tetK, tetM, norC, tet38</i>	<i>fnbA, hla, sec.</i>	II	6	66	46	2	7	50	18	133
100 <sup>p</sup>	<i>tetK, tetM, norC, tet38</i>	<i>etb, fnbA, hla, sec</i>	IV	6	66	46	2	7	50	18	133
101 <sup>c</sup>	<i>ant, blaz, norA, tetM, tetK, norC, tet38</i>	<i>etb, fnbB, hla, sec</i>	IV	6	66	46	2	7	50	18	133
101 <sup>p</sup>	<i>ant, blaz, tetM, tetK, norA, norC, tet38</i>	<i>etb, fnbB, hla, sec</i>	*	6	66	46	2	7	50	18	133

<sup>c</sup>*Staphylococcus aureus* isolado de cabras com mastite clínica antes do tratamento; <sup>p</sup>*Staphylococcus aureus* isolado de cabras com mastite após o tratamento; ST: Sequence type; Cluster gerado por PFGE (I-V); \*: isolado não pertencente a nenhum cluster. <sup>c</sup>: mastite clínica; <sup>p</sup>: mastite persistente

## 5. Discussão

Analisando os dados da PFGE, somente quatro isolados antes e depois do tratamento obtidos de dois animais foram geneticamente indistinguíveis (figura 1). Tenover e colaboradores (1995) afirmaram que isolados que possuem pulsotipos indistinguíveis, é provável que não demonstre diferenças por outras técnicas de tipagem molecular. Isso foi, confirmado no presente estudo, onde não foram encontradas diferenças no MLST, apresentando o mesmo CC (133). Os demais isolados apresentaram o perfil clonal estreitamente relacionados pelo PFGE (figura 1). Segundo Tenover et al. (1995), um isolado é considerado estreitamente relacionado se o seu padrão PFGE difere do padrão inicial por mudanças resultantes de um único evento genético, ou seja, uma mutação pontual ou uma inserção ou supressão de DNA. Essas variações são observadas em alguns isolados quando cultivados repetidamente ao longo do tempo ou isolados várias vezes do mesmo paciente. Essas variações foram observadas no presente estudo demonstrado na figura 1. A persistência bacteriana é um fenômeno que envolve a emergência de subpopulações dentro de grupos bacterianos clonais ou isogênicos, que entram num estado de dormência e apenas retornam a sua multiplicação após a retirada da droga utilizada na terapia (Cohen et al., 2013; Pu et al., 2016). Este fenômeno já foi descrito em patógenos como *S.aureus* (Lechner et al., 2012) e *E. coli* (Hong et al., 2012) em infecções nos seres humanos.

Em estudo realizado por Mørk e colaboradores (2010) utilizando a técnica de PFGE a maioria de *S. aureus* isolados de mastite subclínica foram idênticos aos isolados obtidos de swabs vaginais, narinas e pele do teto de cabras. Houve diferença significativa nos perfis de *S. aureus* originados de mastite persistente e não persistente, demonstrando que a presença de *S. aureus* em diferentes sítios corporais pode contribuir para a disseminação da bactéria nos rebanhos e assim ser um problema para controlar a mastite caprina, pois os animais podem servir de reservatório deste patógeno.

A principal linhagem de *S. aureus* de ruminantes encontrada pelo MLST é CC133 e neste estudo, todos isolados pertenciam a esta linhagem. Aires-de-Sousa e colaboradores (2007) verificaram que o CC133 é o tipo predominante em pequenos ruminantes. Guinane et al. (2010) propuseram que os isolados do CC133 possam ter evoluído e se adaptado a pequenos ruminantes originados de humanos, devido a uma

diversificação adaptativa do genoma, resultando em variação alélica, perda de genes e aquisição horizontal de elementos genéticos móveis que contenham genes de virulência com atividade atenuada ou aprimorada em ruminantes.

Em um isolado após o tratamento houve modificação no alelo correspondente ao gene *yqil* relacionado ao metabolismo de Acetyl coenzyme A acetyltransferase, (tabela 6) como esse gene é housekeeping, altamente conservados.

As CIMs de *S. aureus* obtidos de animais com mastite após o tratamento, frente a maioria dos antimicrobianos, aumentaram, inferindo que apesar do curto espaço de tempo (21 dias) na presença do antimicrobiano na dose recomendada. Contudo, para enrofloxacin apenas um isolado foi classificado como resistente, o que foi observado antes e após o tratamento. Este fato reforça a hipótese da persistência dos isolados, as quais são associadas como parada na replicação, produção de biofilme, ativação de bombas de efluxo e estímulo aos eventos de mutação e HGT (Brauner et al., 2016; Waters et al., 2016). Estes fenômenos podem aumentar a emergência de isolados resistentes, o que foi observado no presente trabalho. Segundo Cohen et al. (2013) a persistência é um caminho para a resistência antimicrobiana.

Segundo Brauner et al. (2016) a persistência se difere da resistência onde mutações conferem resistência as drogas antimicrobianas, mesmo em concentrações elevadas. Diversos fatores podem causar resistência de uma infecção entre estes: (1) Seleção direta para o marcador de resistência na presença de altas concentrações de drogas acima da concentração inibitória mínima (CIM). A taxa aparente de bactérias resistentes a antimicrobianos em uma população susceptível será uma função das taxas combinadas de mutação de novo, que não precisam ser altas (O'ri'en & Hughes, 2006) e da transferência horizontal de genes (HGT) de determinantes de resistência. No entanto, a medida mais importante é a taxa em que as variantes resistentes existentes aumentam a frequência em função do nível de exposição ao fármaco em populações de patógenos (Bergman et al., 2004).

A medida mais importante é a taxa de resistência existente as variantes, estas aumentam a frequência em função do nível de exposição ao fármaco em populações de patógenos (Bergman et al., 2004). O último ponto é importante porque o grande reservatório de genes de resistência, mesmo dentro da comunidade microbiana, poderia potencialmente servir como doadores para transferência de resistência a patógenos humanos (Sommer et al., 2009).

A mensuração das CIMs permite a detecção de pequenas alterações na suscetibilidade que não conseguem ser mensuradas no antibiograma realizado pelo método de difusão em disco, além disso a determinação da CIM tem benefícios clínicos auxiliando na elaboração de regimes de dosagem baseados na aplicação dos princípios farmacocinéticos / farmacodinâmicos (Kruth, 2006).

Houve aumento da CIM para a enrofloxacin em seis isolados obtidos após o tratamento, enquanto que em três isolados, a CIM se manteve (tabela 6). O mecanismo de ação das fluoroquinolonas é inibir a DNA girase e, assim, inibir a divisão celular bacteriana. Para os beta-lactâmicos e as fluoroquinolonas a inibição da replicação tem papel central no desenvolvimento do fenômeno de persistência (Brauner et al., 2016). Além disto, os eventos de troca de genes podem ser aumentados em até 100 vezes em isolados de *S. aureus* persistentes (Lechner et al., 2012).

Um conjunto complexo de mudanças metabólicas pode ser induzido por uma variedade de antibióticos. Schelli e colaboradores (2017) utilizando antibióticos das classes: beta lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas em isolados de *S. aureus* verificaram alterações metabólicas em curto espaço de tempo (após 6 h) de co-incubação com os antimicrobianos em resposta ao estresse. As vias metabólicas importantes como metabolismo de pirimidina, metabolismo de aminoácidos e metabolismo de purina estavam entre as vias metabólicas mais significativamente alteradas.

No presente estudo foi detectado o gene *mecA* nos isolados de *S. aureus* obtidos de cabras com mastite antes e após o tratamento. A expressão deste gene confere resistência a metilina e a maioria dos beta-lactâmicos. *S. aureus* metilina resistente (MRSA) é um patógeno humano e animal importante que está ligado a diversas infecções além da mastite. Sua estratégia consiste na expressão de uma proteína ligadora de penicilina de baixa afinidade (PBP2a) que está envolvida na montagem do peptidoglicano na parede celular, esse gene está localizado no *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) integrado ao cromossomo de MRSA (Katayama et al., 2000; Lowy, 2003). Vale ressaltar que este isolado também foi classificado como persistente, o que pode indicar um grande risco a saúde pública.

Schelli e colaboradores (2017) também observaram que ocorrem diferentes respostas metabólicas de *S. aureus* sensível a metilina (MSSA) e *S. aureus*

resistente a meticilina (MRSA) para os mesmos antimicrobianos indicando que o mecanismo de resposta ao estresse MSSA e MRSA são diferentes e que o conhecimento do microrganismo é importante para traçar estratégias de tratamento com antimicrobianos para infecção por *S. aureus* e, eventualmente, auxiliar a descoberta futura de melhores abordagens terapêuticas.

A presença de isolados *S. aureus* vancomicina resistente (VRSA) é uma grande preocupação pois são amplamente distribuídos em infecções humanas especialmente em ambiente hospitalares, havendo risco de transferência destes genes ou mesmo a transferência destas bactérias a população humana (Lambert, 2005).

Os resultados deste estudo indicam que o principal mecanismo associado à resistência a beta-lactâmicos encontrada nos isolados de *S. aureus* causadores de mastite caprina, provavelmente ocorre pela produção de beta-lactamases codificada pelo gene *blaZ*, conforme relatado anteriormente em outros países por Pyörälä (2009) porém em *S. aureus* obtidos de bovinos leiteiros. Segundo McCarthy and Lindsay (2012), o gene *BlaZ* era comum em todas as linhagens de *S. aureus* de humanos, mas era raro em linhagens obtidas de animais, provavelmente ocorreu a aquisição de genes através de plasmídeos.

A resistência para macrolídeos, lincosamida e estreptogramina é determinada por uma família de genes chamados de *erithromycin ribosome methylase* (*ermA*, B e C). Estes genes estão amplamente distribuídos em isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de humanos e animais e estão localizados principalmente em plasmídeos (Hauschild et al., 2006). Neste estudo foram encontrados os genes *ermA*, B e C, entretanto variou sua quantidade, mostrando maior frequência dos genes *ermA*. A presença destes genes é preocupante devido a possibilidade de transferência desses genes para outras bactérias ou mesmo a contaminação de outros animais ou para humanos com bactérias multiresistentes. Os genes *ermA*, *ermB* e *ermC* também foram detectados em *Staphylococcus* obtidos de cabras com mastite na região Nordeste do Brasil (França et al., 2012)

O gene *tet (M)* foi encontrado em todos isolados de mastite persistente e em alta quantidade nos antes e depois do tratamento, possui uma ampla gama de hospedeiros, a associação com transposons conjugativos, favorece a transferência de genes para outras espécies (Roberts, 2005), essa transferência horizontal de genes poderia justificar a alta frequência desse gene, além da resistência fenotípica

encontrada no presente estudo. A classe das tetraciclinas é amplamente usada nas propriedades de cabras leiteiras da região estudada, isso poderia ser justificada pela a pressão de seleção.

O antimicrobiano usado no presente estudo para o tratamento das cabras foi uma fluoroquinolona (Kinetomax® – enrofloxacino) apesar da baixa resistência fenotípica verificada pelo antibiograma e CIM, houve falhas no tratamento e persistência da mastite na maioria dos animais tratados. A resistência às fluoroquinolonas ocorre tipicamente como resultado de alterações nas enzimas alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou sistema de efluxo multidrogas (Jacoby, 2005), este último foi detectado nos isolados obtidos de mastite persistente (tabela 6).

A superfamília dos facilitadores principais (MFS) é uma das mais antigas e diversificadas famílias de sistema de efluxo, possuindo mais de mil membros. Desde a sua descoberta, os transportadores MFS tornaram-se alvo de estudos, devido à capacidade de conferir resistência a múltiplas drogas (Kumar et al., 2013). A presença de sistemas de efluxo da família MFS é clinicamente relevante, principalmente em bactérias Gram-positivas como, por exemplo, *norA* em *S. aureus*, a expressão desse sistema confere resistência ao cloranfenicol e as fluoroquinolona (Pidcock, 2006). Para o sistema de efluxo multidrogas observou-se que os genes responsáveis pelo sistema de efluxo *norA*, *norC* e *lmrS* foram detectados de forma similar nos isolados de mastite depois do tratamento e pode ser um importante fator relacionados a falhas no tratamento da mastite e persistência da mastite caprina.

O sistema de efluxo *tet 38* é codificada por cromossomo e confere resistência à tetraciclina, compartilha 46% de similaridade com a proteína TETK que possui resistência à tetraciclina transportada em plasmídeos nos *S. aureus* (Truong-Bolduc et al., 2005)Entretanto, como o gene *mgrA* é um regulador negativo do *tet 38* esse gene provavelmente encontra-se ativo.

Os genes *norB*, *msrA* e *mgrA* não foram detectados neste estudo. O gene *mgrA* atua como um regulador global , regula alguns fatores de virulência como a síntese de cápsulas, e a expressão de genes de sistemas de efluxo multidrogas(Luong et al., 2003). *mgrA* atua como um regulador negativo de *norB* e *norC*, contribuindo na resistência à quinolonas (Truong-bolduc et al., 2006). Neste estudo não foi detectado a presença do gene regulador *mgrA*, sugerindo que o sistema de efluxo *norC* se encontra ativado.

Apesar de não serem encontradas diferenças estatísticas, foram encontradas diferenças biológicas, pois a presença de um gene de resistência ou de sistema de efluxo multidrogas pode estar relacionada ao insucesso no tratamento com a enrofloxacin, pois foi detectado genes relacionados a resistência a quinolonas, sistema de efluxo multidrogas, e com isso, a persistência da mastite. Entretanto, é importante destacar que o fenômeno da persistência tem implicações diretas sobre os mecanismos celulares de efluxo e a troca horizontal de genes (Pu et al., 2016), o que foi observado neste estudo.

De acordo com o presente estudo a detecção dos genes de virulência isolados de *S. aureus* obtidos de cabras leiteiras com mastite antes e após o tratamento não diferiram estatisticamente, porém diferiram biologicamente, pois a presença de genes de virulência e resistência confere ganhos evolutivos nestes isolados que podem estar envolvidos na persistência do patógeno na glândula mamária.

Os genes codificadores de enterotoxinas foram observados em *S. aureus* isolados de mastite antes e após o tratamento, entretanto Mørk e colaboradores (2010) observaram a presença desses genes em *S. aureus* obtidos em cabras saudáveis (71%) e com mastite (86%), mostrando que a presença dos genes codificadores de enterotoxinas é algo comum no *S. aureus*. A toxina SEC afeta a resposta imune bovina e pode contribuir para a persistência de *S. aureus* na glândula mamária. O gene *sec* foi encontrado neste estudo, sugerindo que este pode ter importante papel na patogenicidade de *S. aureus* na glândula mamária de cabras. Evidências mostram que atividade de superantígenos podem induzir imunossupressão em animais leiteiros e contribui para a patogênese da mastite (Ferens et al. 1998).

Observou-se a associação entre a presença dos genes *fbnA* e *fbnB* e a persistência da mastite. A presença de *fbnB* mostrou-se maior nos isolados obtidos nos animais com mastite após o tratamento, sugerindo que a adesão de *S. aureus* na glândula mamária caprina ocorre de forma semelhante a encontrada em bovinos, e a fibronectina desempenha um papel importante nas células eucarióticas mediando a adesão entre *S. aureus* e os tecidos (Ruoslahti et al., 1981), sendo assim um importante fator de virulência envolvido na persistência da mastite caprina.

A alfa-hemolisina codificada pelo gene *hla*, é uma proteína citolítica que atua formando poros nas células sanguíneas, hemácias e leucócitos, sendo uma das

toxinas bacterianas mais potentes conferindo importante fator de virulência em *S. aureus* (Callegan et al., 1994). Neste estudo o gene *hla* foi detectado de forma semelhante nos isolados obtidos dos animais com mastite antes e após o tratamento. A toxina esfoliativa é uma exotoxina produzida por estafilococos, são codificados pelos genes *eta* e *etb*. Esses foram detectados nos isolados antes e depois do tratamento, indicando conservação destes genes, indicando uma provável importância na patogênese e persistência da mastite caprina.

Houve poucas diferenças no perfil de virulência de *S. aureus* isolados de cabras com mastite antes e após o tratamento, sugerindo esta não ser provavelmente o fator predominante na persistência da mastite caprina, entretanto são necessários mais estudos para confirmar essa inferência.

## **6. Conclusão**

*S. aureus* obtidos da mastite após o tratamento com enrofloxacin alterou diversos padrões microbianos, como perfil de resistência as drogas antimicrobianas e a plasticidade de genes, principalmente aqueles relacionados aos genes do sistema de efluxo multidrogas. Isto é característicos de isolados persistentes, o que é descrito pela primeira vez em isolados obtidos de mastite caprina.

## **7 Agradecimentos**

The authors acknowledge financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil). Moreira is supported by CNPq

## **8. Referências**

André, M.C.D.P.B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, Á.B., 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *Sma*I digestion. *Food Control* 19, 200–207.

- Bania, J., Dabrowska, A., Bystron, J., Korzekwa, K., Chrzanowska, J., Molenda, J., 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 36–41.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320–330.
- Callegan, M.C., Engel, L.S., Hill, J.M., O'Callaghan, R.J., 1994. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: Roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. *Infect. Immun.* 62, 2478–2482.
- Castelani, L., Silva Santos, A.F., Miranda, M. dos S., Zafalon, L.F., Pozzi, C.R., Pozzi Arcaro, J.R., 2013. Molecular typing of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 4326–4333.
- Choi, S.M., Kim, S.H., Kim, H.J., Lee, D.G., Choi, J.H., Yoo, J.H., Kang, J.H., Shin, W.S., Kang, M.W., 2003. Multiplex PCR for the Detection of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance among *Staphylococcus* Species. *J. Korean Med. Sci.* 18, 631–636.
- Cohen, N.R., Lobritz, M.A., Collins, J.J., 2013. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 13, 632–642.
- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J., Gonzalo, C., 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 68, 145–153.
- Contreras, G.A., Rodríguez, J.M., 2011. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 339–356.
- Cordeiro, P.R.C., Cordeiro, A.G.P.C., 2009. A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado. X Encontro Caprinocultores do Sul Minas e Media Mogiana 1–7.
- Costa, S.S., Viveiros, M., Amaral, L., Couto, I., 2013. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol. J.* 7, 59–71.
- Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015.
- Eskine, R.J., Walker, R.D., Bolin, C.A., Bartlett, P.C.; White, D.G., 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.* 85, 1111–1118.

Ferens, W.A., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Park, Y.H., Deobald, C.F., Fox, L., Bohach, G., 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* 66, 573–580.

Floyd, J.L., Smith, K.P., Kumar, S.H., Floyd, J.T., Varela, M.F., 2010. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5406–5412.

França, C.A., Peixoto, R.M., Cavalcante, M.B., Melo, N.F., Oliveira, C.J.B., Veschi, J.A., Mota, R.A., Costa, M.M., A, A.F.C., Peixoto, R.M., Cavalcante, M.B., Melo, N.F., Oliveira, C.J.B., Veschi, J.L.A., 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. *Pesqui. Veterinária Bras.* 32, 747–753.

Guinane, C.M., Zakour, N.L.B., Tormo-Mas, M.A., Weinert, L.A., Lowder, B. V., Cartwright, R.A., Smyth, D.S., Smyth, C.J., Lindsay, J.A., Gould, K.A., Witney, A., Hinds, J., Bollback, J.P., Rambaut, A., Penadés, J.R., Fitzgerald, J.R., 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* 2, 454–466.

Hong, S.H., Wang, X., O'Connor, H.F., Benedik, M.J., Wood, T.K., 2012. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb. Biotechnol.* 5, 509–522.

Jacoby, G.A., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 2, S120-6. doi:10.1086/428052

Jang, S., 2016. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *J. Microbiol.* 54, 1–8.

Kaatz, G.W., Mcaleese, F., Seo, S.M., 2005. Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus* Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transport Protein Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus* Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin Extrusion ( MATE ) T. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1857–1864.

Kaatz, G.W., Seo, S.M., 1997. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2733–2737.

Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K., 2000. A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1549–1555.

Kumar, S., Mukherjee, M.M., Varela, M.F., 2013. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. *Int. J. Bacteriol.* 2013, 1–15. doi:10.1155/2013/204141

Kuusela, p., 1978. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature* 276, 718–720.

Lambert, P.A., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1471–1485.

Lechner, S., Lewis, K., Bertram, R., 2012. *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 22, 235–244.

Lowy, F., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111, 1265–1273.

Luong, T.T., Newell, S.W., Lee, C.Y., 2003. *Mgr*, a Novel Global Regulator in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185, 3703–3710.

Martineau, F., Picard, F.J., Lansac, N., Ménard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Michel, G., 2000. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 231–238.

Martins, K.B., Faccioli-Martins, P.Y., Riboli, D.F.M., Pereira, V.C., Fernandes, S., Oliveira, A.A., Dantas, A., Zafalon, L.F., de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, M., 2015. Clonal profile, virulence and resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. *Brazilian J. Microbiol.* 46. doi:10.1590/S1517-838246220131164

Mccarthy, A.J., Lindsay, J.A., 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiol.* 12.

Mørk, T., Kvitle, B., Mathisen, T., Jørgensen, H.J., 2010. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Vet. Microbiol.* 141, 134–141. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.019

Piddock, L.J. V., 2006. Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 629–636. doi:10.1038/nrmicro1464

Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Ke, Y., Zhu, Y., Chen, H., Baker, M.A.B., Ge, H., Sun, Y., Xie, X.S., Bai, F., 2016. Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Mol. Cell* 62, 284–294. doi:10.1016/j.molcel.2016.03.035

- Pyörälä, S., 2009. Treatment of mastitis during lactation. *Ir. Vet. J.* 62 Suppl 4, S40-44. doi:10.1186/2046-0481-62-S4-S40
- Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 195–203. doi:10.1016/j.femsle.2005.02.034
- Rodriguez, M., Hogan, P.G., Satola, S.W., Crispell, E., Wylie, T., Gao, H., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Burnham, C.A., Fritz, S.A., 2015. Discriminatory Indices of Typing Methods for Epidemiologic Analysis of Contemporary *Staphylococcus aureus* Strains. *Med.* 94, e1534. doi:10.1097/md.0000000000001534
- Ruegg, P.L., Oliveira, L., Jin, W., Okwumabua, O., 2015. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 4521–4534. doi:10.3168/jds.2014-9137
- Ruoslahti, E., Engvall, E.V.A., Hayman, E.G., 1981. Fibronectin : Current Concepts of its Structure and Functions. *Collagen Relat. Res. Clin. Exp.* 1, 95–128. doi:10.1016/S0174-173X(80)80011-2
- Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32, 201–225. doi:10.1051/vetres:2001120
- Sommer, M.O.A., Dantas, G., Church, G.M., 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science.* 325, 1128–1131.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Trindade, P.A., McCulloch, J.A., Oliveira, G.A., Mamizuka, E.M., 2003. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz.J.Infect.Dis.* 7, 32–43.
- Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., Lina, G., 2003. Use of Multiplex PCR To Identify *Staphylococcus aureus* Adhesins Involved in Human Hematogenous Infections Use of Multiplex PCR To Identify *Staphylococcus aureus* Adhesins Involved in Human Hematogenous Infections 41, 4465–4467.
- Truong-Bolduc, Q.C., Dunman, P.M., Strahilevitz, J., Projan, S.J., Hooper, D.C., 2005. MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 2395–2405.

- Truong-Bolduc, Q.C., Strahilevitz, J., David, C., Hooper, D.C., 2006. *NorC*, a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. 50, 1104–1107.
- Truong-Bolduc, Q.C., Strahilevitz, J., David, C., Hooper, D.C., Dunman, P.M., Strahilevitz, J., Projan, S.J., Hooper, D.C., Tsucmya, T., Reynolds, E., Ross, J.I., Cove, J.H., Piddock, L.J. V, Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2006. *NorC*, a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 50, 1104–1107.
- Truong-Bolduc, Q.C., Zhang, X., Hooper, D.C., 2003. Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185, 3127–3138.
- Turlej, A., Hryniewicz, W., Empel, J., 2011. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: An overview. *Polish J. Microbiol.* 60, 95–103.
- Waters, E.M., Rowe, S.E., O’Gara, J.P., Conlon, B.P., 2016. Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLoS Pathog.* 12, 2–6.

## ANEXO

Tabela 7: perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* frente a antimicrobianos pelo método de difusão em discos (Kirby-Bauer).

CEPA	Bactéria	Antimicrobianos															
		ENO	VAN	SUT	CFE	CIP	GEN	TET	AMP	CTF	NEO	CFX	NOV	PEN	CPM	CFP	OXA
4c	<i>S. aureus</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R
4p	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
5c	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
5p	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
6c	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
6p	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
7c	<i>S. aureus</i>	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
7p	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R
8c	<i>S. aureus</i>	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R
8p	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R
9c	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R
9p	<i>S. aureus</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R
10c	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R
10p	<i>S. aureus</i>	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R
100c	<i>S. aureus</i>	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R
100p	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
101c	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
101p	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

ENO = enrofloxacin, VAN = vancomicina, SUT: sulfadiazina + trimethoprim; CFX= cefalexina; CIP= ciprofloxacina; GEN = gentamicina; TET = tetraciclina; AMP= ampicilina; CFX: cefalexina; CFT: ceftiofur; NEO:neomicina; CFP: cefoperazona; CFM: cefepime PEN = penicilina OXA = oxacilina. R: resistente; S: sensível ; I:intermediário.

**Capítulo IV - Diversidade de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite.**

## Diversidade de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite

Magna Coroa Lima<sup>1</sup>, Sanely Lourenço da Costa<sup>1</sup>, Jéssica Lobo Albuquerque<sup>1</sup>, David Germano Gonçalves Schwarz<sup>1</sup>, Núbia Caroline Pifano<sup>1</sup>, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de doenças bacterianas (LDBAC), Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-900, Viçosa-MG - Brasil.

\* Autor para correspondência: [masm@ufv.br](mailto:masm@ufv.br)

Resumo: *Escherichia coli* não é um patógeno frequentemente isolado de cabras com mastite, no entanto estudos relatam a participação deste patógeno envolvido na mastite clínica e na mastite gangrenosa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade *Escherichia coli* isolados de diferentes tipos de mastite caprina. Foram selecionadas dez propriedades da Zona da Mata de Minas Gerais, distribuídas nas sete microrregiões que a compõem. Foi realizado o exame em todos os animais para o diagnóstico de mastite, os animais positivos foram coletadas amostras para exame microbiológico e posteriormente identificados fenotípica (morfotintoriais e bioquímicas) e genotípica (PCR). Nos animais com mastite clínica foi realizado o tratamento com enrofloxacino. Os animais que não obtiveram a cura foram considerados com mastite persistente e coletados novamente amostras e realizado o isolamento e identificação. O perfil de resistência foi determinado pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer utilizando 16 antimicrobianos usados no tratamento da mastite caprina. A Concentração inibitória mínima (MIC) foram realizadas utilizando E-test® e calculado o índice de resistência múltipla. Os isolados foram genotipados pela *Eletroforese em gel de campo pulsado* (PFGE). Para avaliar a capacidade de adesão e invasão foi utilizada células epiteliais mamária bovina (MAC-T). Foram encontrados 15 *Escherichia coli*, sendo: nove (60,0 %) de mastite subclínica, quatro (26,7 %) de clínica e dois (13,3 %) de persistente. Houve maior número de isolados apresentando resistência frente a cefatíofur, tetraciclina e cefalexina. Nas quatro microrregiões estudadas foram encontrados cinco isolados (33,3 %, 5/15) com índice de resistência múltipla (IRMA) variando de 0,3 a 0, 5. A MIC variou de 0,25 a 125 µg/mL. Os antimicrobianos que apresentaram a maior MIC frente a tetraciclina, cefoperazona e gentamicina. Os isolados obtidos de animais com mastite clínica a MIC foi maior para tetraciclina, ampicilina e gentamicina. Já os isolados de mastite persistente apresentaram valores maior da MIC frente a tetraciclina, ampicilina,

cefoperazona e ciprofloxacina. E os isolados obtidos de animais com mastite subclínica maiores MIC para tetraciclina e cefoperazona. Foram encontrados três *clusters* e oito *pulsotypes*, não houve associação entre o *cluster* e o tipo de mastite. *E. coli* isolados de cabras com mastite persistente possui maior capacidade de adesão e invadem as células epiteliais mamária in vitro em relação aos obtidos de mastite clínica e subclínica.

## 1. Introdução

*Escherichia coli* é um patógeno de grande importância na mastite bovina sendo frequentemente isolada causando a mastite aguda e persistente (Bradley and Green, 2001; Dogan et al., 2006a; Gröhn et al., 2005). Entretanto *E. coli* não é um patógeno frequentemente isolado de cabras com mastite, provavelmente devido a consistência das fezes e tipo de instalação utilizado. Há relato da participação de *E. coli* em conjunto com outros patógenos na mastite gangrenosa (Ribeiro et al., 2007).

Isolados patogênicos de *E. coli* podem ser classificadas em diferentes patótipos, onde cada patótipo causa uma doença distinta. Todos os patótipos podem ser divididos em dois grandes grupos: *E. coli* patogênica intestinal e *E. coli* patogênica extraintestinal (Kaper et al., 2004). A mastite causada por *E. coli* pode ser esporádica e os sinais clínicos podem ser localizados ou resultarem em sintomas clínicos severos com episódios fatais. A prevalência da mastite causada por coliformes varia entre os diferentes países sugerem que os isolados de *E. coli* obtidos de casos de mastite podem formar um novo patótipo - “mammary pathogenic *E. coli*” (MPEC) em virtude da semelhança entre as cepas obtidas de casos de mastite (Kaipainen et al., 2002; Shpigel et al., 1998).

É amplamente conhecido que a adesão dos microrganismos nas células do hospedeiro é o primeiro passo para colonização da superfície e estabelecimento de uma infecção (Finlay and Falkow, 1997). *E. coli* possui plasticidade genotípica que confere a esta bactéria uma fantástica e ampla gama de fatores de virulência que são essenciais para patogênese da mastite causada por este patógeno. A persistência do patógeno em um tecido geralmente envolve os mecanismos de adesão e invasão. A relação entre o tipo de mastite em cabras e as características dos microrganismos ainda não está clara.

A resistência antimicrobiana em *E. coli* foi relatada em todo o mundo. O tratamento para a infecção causada por esse patógeno tem sido cada vez mais complicado pelo surgimento de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos de primeira linha, incluindo fluoroquinolona (Sabaté et al., 2008)

Resistência antimicrobiana nos isolados de *E. coli* é particularmente preocupante porque é o patógeno Gram negativo mais comum em humanos. Uma vez que estes agentes patogênicos dos animais também podem ser transmitidos aos seres humanos através de produtos lácteos ou através do ambiente, é prudente conhecer os padrões de resistência aos antimicrobianos utilizados na medicina veterinária e humana (Rasheed et al., 2014).

Há poucos estudos sobre o impacto do uso terapêutico e profilático de antimicrobianos na seleção de resistência em *Escherichia coli*. a escassez de informações é ainda maior em relação a *E. coli* obtidos de mastite caprina.

O índice de Resistência Múltipla aos antimicrobianos (IRMA) idealizado inicialmente para avaliar a multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* visando identificar o risco de contaminação humano de isolados com potencial de resistência múltipla aos antimicrobianos (Krumperman, 1983).

O objetivo deste trabalho avaliar a diversidade de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com mastite clínica, subclínica e persistente.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Propriedades e obtenção das amostras*

Os isolados foram obtidos de cabras leiteiras com mastite clínica e subclínica e armazenados em tubos contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e 20% de glicerol a 80° C.

Três animais que apresentaram mastite clínica por *E. coli* foram tratados com Kinetomax (Bayer®), antibiótico a base de enrofloxacin, 5 mg/kg (Elmas et al., 2001) a cada 24 h, pela via intramuscular durante sete dias. Os animais foram reexaminados 21 dias após o tratamento. Os animais que apresentaram mastite após esse período foram classificados com mastite persistente e foi obtida novamente amostra de leite e realizado o isolamento e a identificação dos isolados.

## 2.2. Obtenção dos isolados e identificação

Para o isolamento foram inoculados 100 µL de leite, previamente homogeneizado, em placas de Petri contendo ágar Mac Conkey utilizando a técnica do espalhamento em superfície, as placas foram incubadas em aerobiose a 37°C. A leitura das placas foi realizada 24-48 horas, e posteriormente identificados fenotipicamente por meio de características morfotintoriais e bioquímicas (produção de indol, reações vermelho de metila e Voges - Proskauer, utilização de citrato, produção de urease e semeados em ágar “Triple Sugar Iron”) (Quinn et al., 2011).

Para identificação genotípica foi realizada a extração de DNA foi realizada utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®) seguindo o protocolo descrito para bactérias Gram negativas. A PCR foi realizada utilizando o primer *uspA* (5'-CCGATACGCTGCAATCAGT-3'-f e 5'-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT-3'-r) (Chen and Griffiths, 1998) Para amplificação foi seguido o programa: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min e subsequente amplificação de 30 ciclos, cada um consistindo a 94 °C por 2 min, 70 °C por 1 min e 72 °C por 1 min. O produto de PCR amplificado foi corrido o gel de agarose a 1% agarose em tampão 1×TBE. Após amplificação os *amplicons* foram enviados à empresa MacroGen Incorporation (Seoul, Coréia do Sul) para sequenciamento.

## 2.3. Perfil de resistência

A preparação do inóculo bacteriano foi realizada após o crescimento em caldo Müeller-Hilton (MH) por 18 horas. A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turbidez mensurada utilizando espectrofotômetro. A concentração bacteriana utilizada foi correspondente a 0,5 da escala de McFarland, em seguida as amostras foram semeadas em placa de ágar Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com auxílio de swab estéril. O perfil de resistência foi realizado utilizando o método de difusão em disco (Kirby-Bauer) com 16 antimicrobianos os quais são usados no tratamento da mastite caprina, sendo estes: ampicilina (10 µg), enrofloxacina (10 µg), ciprofloxacina (10 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), cefatofur (30 µg), sulfazotrim+trimetropim (25 µg), cefalexina (30µg), cefoperazona (75 µg), cefepime (30µg), neomicina (30 µg), rifamicina (5 µg), novobiocina (30 µg), florfenicol (30 µg),

azitromicina (15 µg) marbofloxacino (5 µg). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, a leitura foi realizada e o halo de inibição interpretado de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI para Enterobacteriaceae. (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012). As amostras foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R).

Fitas de E-test® (bioMerieux) foram utilizadas para mensurar a Concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com a disponibilidade comercial dos discos (ampicilina, gentamicina, tetraciclina, enrofloxacino, ciprofloxacina e cefepime). O inóculo com concentração correspondente a 0,5 da escala de McFarland foi semeado em placa contendo ágar MH e as fitas E-test®, foram dispensadas sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h realizada a leitura. A interpretação foi realizada seguindo as diretrizes e os pontos de corte do fabricante.

O índice de resistência múltipla (IRMA) foi calculado pela razão entre o número de classes dos antimicrobianos que cada isolado foi resistente e o número total de classes testadas (10 classes). Considerou que índices >0,3 possui potencial de transmissão de genes de resistência (Krumperman, 1983).

### 2.3. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A PFGE foi realizada seguindo o protocolo da PulseNet, conforme descrito por Ribot et al.(2006) com pequenas modificações. Para a confecção dos plugs os isolados de *E. coli* foram inoculados em caldo infusão cérebro e coração (BHI) a 37 °C por 18 h. A concentração bacteriana foi ajustada a uma densidade óptica de 1.0 (610 nm). Em seguida 400 µL da suspensão bacteriana foi transferida para micro tubos com capacidade de 1,5 mL e centrifugados, 16000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 400 de µL tampão TE (10 mM /L de Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM/L de EDTA) posteriormente foi adicionado 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 400 µL agarose com baixo ponto de fusão (Bio-Rad) a 1% a uma temperatura de 55 °C e foi confeccionado os plugs. Após a solidificação dos *plugs* estes foram incubados com tampão de lise celular (50 mM/L de Tris-HCl [pH8.0], 50 mM/L de EDTA; 1% de laurilsarcosyl) por 1,5 h. Os *plugs* foram lavados três vezes com água Mili Q estéril a 50 °C, durante 30 min e duas vezes com tampão TE a 50 °C

por 30 min a. A digestão foi realizada com 1/5 do plug utilizando 50 U da enzima de restrição *Xba*I (New England, Biolabs).

O gel de corrida foi preparado a 1% com agarose de baixo ponto de fusão e a corrida do gel foi realizada utilizando o aparelho CHEF DR-III (BIO-RAD laboratories, Hercules, CA, USA) com 2 L de TBE 0,5X mantido a 14 °C. Com as seguintes condições de corrida: tempo de troca inicial, 2,0 s; tempo de troca final, 35,0 s; tempo de execução 19 h; gradiente, 6 V/cm; ângulo 120 °C; temperatura, 14 °C. (Ribot et al., 2006). Foi utilizada como marcador *Salmonella enterica* serotype Braenderup H9812 (CDC), digeridas com 20 UI de *Xba*I (Hunter et al., 2005) e adicionado em duas canaletas por gel realizado. Os géis obtidos foram revelados em banho de imersão com o corante intercalante UniSafe Dye® (Uniscience, Brasil) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados para análise posterior.

A relação entre os padrões de bandas foi calculada usando um coeficiente de similaridade baseado em banda (Dice) e agrupamento Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (BioNumerics, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) a configuração de tolerância de posição "para 5% (padrão: tolerância de posição e otimização de 5 %). Os tipos PFGE foram atribuídos com base em padrões > 96% semelhantes.

## 2.4. Avaliação da capacidade de adesão e invasão

### 2.2.1. Cultivo celular e preparo do inóculo

Para os ensaios de adesão e invasão foi utilizada a linhagem de células epiteliais mamária bovina (MAC-T). As células MAC-T foram cultivadas em frascos de cultura de células T25 (TPP Techno Plastic, St. Louis, MO, EUA) contendo Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GibcoBRL, Grand Island, NY, EUA) a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. O cultivo foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) sem antibiótico, até a confluência das células. Após a visualização da monocamada em um microscópio de contraste de fase Nikon (Nippon Kogaku KK, Tóquio, Japão), as células foram lavadas com PBS (pH 7,2), ressuspensas pela adição de 0,25% de tripsina (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA) e posteriormente usado nos ensaios.

Antes de cada experimento, as células MAC-T foram semeadas em placas de cultura de 12 poços e incubadas a 37 ° C em CO<sub>2</sub> a 5% durante 24 horas, obtendo confluência de 90-95%.

A concentração de células presentes em cada poço foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer. A viabilidade das células epiteliais mamárias foi determinada pela exclusão utilizando o corante azul de Tripán.

Os testes de adesão e invasão foram realizados com três isolados de *E. coli* um obtido de mastite, clínica um de persistente e um de subclínica, escolhidos aleatoriamente. As bactérias foram inoculadas em caldo BHI *overnight* e centrifugada a 4500 G por 15 min, o *pellet* foi lavado com PBS diluídas em salina até a obtenção de uma suspensão bacteriana contendo, aproximadamente, 1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL. A proporção de células para bactérias (MOI) de 10:1.

### 2.5. Ensaio de adesão

O ensaio de adesão foi seguindo o protocolo descrito Hensen e colaboradores. (2000) com modificações. As monocamadas confluentes das células MAC-T (~1 x10<sup>6</sup>) cultivadas em placas de 12 poços foram infectadas com 1 x10<sup>7</sup> UFC. Após 3 h de incubação a 37 ° C com 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas (1 mL/poço) três vezes com PBS+ (PBS 0,01M, suplementado com 0,1 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 0,2 g/L de MgCl<sub>2</sub>) para retirar as bactérias não aderidas.

Posteriormente, as células foram separadas pela adição de 1mL de solução de tripsina + EDTA (0,1% / 0,04%) em cada poço. As placas foram incubadas numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> ao ar a 37 ° C durante 10 a 15 min. Após a incubação, as suspensões foram misturadas por pipetagem. O desprendimento de células foi verificado com um microscópio de contraste de fase invertida. Após a separação das células, a tripsinização foi interrompida pela adição de 1mL de DMEM sem antibiótico.

Foi realizada a diluição seriada na base 10 das células separadas, e foram posteriormente plaqueadas na superfície do ágar BHI, incubados a 37°C por 24 h. A adesão foi expressa como o número total de unidades formadoras de colônias (CFU/ml) recuperadas por poço. Cada ensaio foi executado em duplicata e repetido três vezes em dias diferentes.

### 2.5. Ensaio de invasão

Para o ensaio de internalização seguimos o protocolo descrito por Hensen e colaboradores. (2000).com modificações. As células foram lavadas três vezes com PBS+ aquecido e desafiadas com *E. coli* ( $1 \times 10^7$  CFU / ml) e a placa incubada por 3 horas a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação aos poços foram lavados três vezes com 1 mL de PBS+, em seguida foi adicionado 1mL de DMEM suplementado com 5% de SFB e 100 µg de gentamicina em cada poço, para eliminar as bactérias extracelulares, e a placa foi incubada novamente sob as mesmas condições durante uma hora. Após este tratamento, os poços foram lavados quatro vezes com PBS+ e foi 1 mL de Triton X-100 a 0,1% (vol / vol) (Amersham, Arlington Heights, IL) em PBS foi adicionado em cada poço e novamente incubados nas mesmas condições anteriormente descritas durante 10 minutos com objetivo de lisar as células.

Em seguida, as células foram tripsinizadas com 1mL de solução de tripsina + EDTA 37 ° C por 15 minutos. Foi realizada diluições seriadas dos lisados e plaqueados em superfície do ágar BHI, e as concentrações bacterianas foram determinadas a partir das contagens de colônia após incubação a 37 ° C durante 24h. Os poços de controle positivo (*E. coli*) e os poços de controle negativos (células MAC-T).

A invasão foi expressa como o número total de unidades formadoras de colônias (CFU/ml) recuperadas por poço. Cada ensaio foi executado em duplicata e repetido três vezes em dias diferentes.

### **3. Resultados e discussão**

Foram examinadas 539 cabras em lactação e coletadas 268 amostras de leite individuais (uma / teto). Quinze isolados de *E. coli*, isolados em quatro microrregiões (Viçosa, Manhuaçu, Muriaé e Juiz de For a). Destes 15 isolados, nove (60,0 %) provenientes de mastite subclínica, quatro (26,7 %) de mastite clínica e dois (13,3 %) isolados de mastite persistente.

No Brasil e no mundo há poucos estudos relatando *E. coli* como agente etiológico da mastite caprina, e nestes é encontrada uma baixa prevalência. Nos Estados Unidos, White and Hinckley (1999) encontraram 1,6%, no Brasil, Langoni e colaboradores (2006) encontraram esse patógeno em 1,8% enquanto que Almeida e colaboradores (2013) isolaram *E. coli* em 4% das amostras de leite.

Na microrregião de Viçosa foram isolados nove *E. coli* (quatro de mastite subclínica, três de clínica e dois de mastite persistente), na microrregião de Muriaé dois isolados (um de mastite clínica e um de subclínica, nas microrregiões de Manhuaçu e Juiz de Fora foram encontrados quatro isolados de mastite subclínica, dois em cada (tabela 2).

Os dados do perfil de resistência estão mostrados nas tabelas 1, 2 e 3. Houve maior número de *E. coli* apresentando resistência frente a cefatíofur, tetraciclina e cefalexina, antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento da mastite nos rebanhos estudados.

O índice de resistência múltipla (IRMA) variou de 0,2 a 0,5, nas quatro microrregiões, e em relação aos vários tipos de mastite (tabela 1).

No entanto houve um maior número de isolados obtidos de mastite subclínica (quatro isolados), enquanto que na mastite clínica observou-se dois isolados e na mastite persistente apenas um apresentando índice de resistência acima do limite (>0,3) (Tabela 1).

Somente um isolado obtido de animal com mastite clínica aguda, foi isolado além *Staphylococcus aureus* (dados não mostrados) associado com *E. coli* apresentou sensibilidade a todos antimicrobianos testados. Foi realizada a terapia com antimicrobiano a base de enrofloxacina e terapia de suporte com anti-inflamatórios e fluidoterapia, entretanto não foi obtido sucesso e o animal veio a óbito em decorrência da mastite.

Apesar de *E. coli* não ser um agente frequentemente isolado da mastite caprina, os dados sobre IRMA encontrados no presente estudo são preocupantes devido a possibilidade de transferência de genes de resistência para outros patógenos ou a infecção por este patógeno.

Tabela 1: Padrão de resistência e índice de resistência múltipla (IRMA) de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite.

AMP = ampicilina, NEO = neomicina, GEN = gentamicina, CIP = ciprofloxacina, ENO = enrofloxacina,

Padrão de Resistência	Número absoluto	Tipo de mastite (IRMA)
AMP+CIP+TET+ CFX+ CFT+ CFP+ TET	1	Persistente (0,5)
AMP+ ENO+CFX+CTF+CPM+TET+SUT	1	Clínica (0,5)
NEO+GEN+ENO+CTF+TET+SUT	1	Subclínica (0,5)
CIP+TET+ CFX+ CFT+ CFP+ TET	1	Clínica (0,4)
AMP+ ENO+CFX+CTF+SUT	1	Subclínica (0,4)
NEO+GEN+TET+NOV+RIF	2	Subclínica (0,4)
NEO+CFX+CTF	1	Subclínica (0,2)
AMP+CTF	2	Clínica e persistente (0,2)
CPM+TET	1	Subclínica (0,2)

CFX = cefalexina, CFT = cefatofur, CFM= Cefepime, TET= tetraciclina, SUT = sulfametoxazole/trimetoprim, e RIF = rifampicina.

Tabela 2. Perfil de resistência de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite

<i>E. coli</i>	Tipos de Mastite	Classes dos antimicrobianos																	
		β-lactâmico		Aminoglicosídeo			Fluoroquinolona			Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> geração	Cefalosporinas 3 <sup>a</sup> geração		Cefalosporinas 4 <sup>a</sup> geração	Tetraciclina	Sulfonamida	Glicosídeo não macrolídeo	Rifamicina	Anfenicol	Macrolídeo
		AMP	NEO	GEN	CIP	ENO	MARB	CFX	CTF	CFP	CPM	TET	SUT	NOV	RIF	FLO	AZI		
1 <sup>a</sup>	clínica	S	s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
2 <sup>a</sup>	persistente	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	
2 <sup>a</sup>	clínica	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	
2 <sup>c</sup>	clínica	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	
3 <sup>a</sup>	clínica	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
3 <sup>a</sup>	persistente	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
4 <sup>c</sup>	subclínica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	
5 <sup>d</sup>	subclínica	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	
7 <sup>a</sup>	subclínica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	
8 <sup>b</sup>	subclínica	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
9 <sup>d</sup>	subclínica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	
10 <sup>b</sup>	subclínica	S	R	R	I	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	
11 <sup>a</sup>	subclínica	S	R	S	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
28 <sup>a</sup>	subclínica	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	
91 <sup>a</sup>	subclínica	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	

AMP = ampicilina, NEO = neomicina, GEN = gentamicina, CIP = ciprofloxacina, ENO = enrofloxacin, MARB = marbofloxacino, CFX = cefalexina, CFT = cefatiofur, CFP= cefoperazona, CFM= Cefepime, TET= tetraciclina, SUT = sulfametoxazole/trimetoprim, NOV = novobiocina, RIF = rifampicina; FLO = florfenicol, AZI = azitromicina. Números: correspondem a identificação do animal/isolado. a:microrregião de Viçosa, b:microrregião de Manhuaçu, c:microrregião de Muriaé, d: microrregião de Juiz de Fora. R: resistente, S:sensível e I: intermediário.

Os valores da MIC encontrados para *E. coli* isoladas dos diferentes tipos de mastite variaram de 0,25 a 125 µg/mL, onde os valores mais altos foram para tetraciclina, cefoperazona e gentamicina (tabela 3).

Os isolados obtidos de animais com mastite clínica, a MIC foi maior para tetraciclina, ampicilina e gentamicina. Os isolados de mastite persistente apresentaram valores maiores de MIC frente a tetraciclina, ampicilina, cefoperazona e ciprofloxacina, enquanto que isolados obtidos de animais com mastite subclínica apresentaram valores da MIC maiores para tetraciclina e cefoperazona (tabela 3).

Tabela 3 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de *Escherichia coli* isolados de cabras leiteiras com diferentes tipos de mastite.

<i>E. coli</i>	Tipos de Mastite	Antimicrobianos (µg/mL)					
		ENO	CIP	CFP	AMP	GEN	TET
1 <sup>a</sup>	clínica	4	3	4	3	3	125
2 <sup>a</sup>	persistente	16	24	3	16	6	32
2 <sup>a</sup>	clínica	0,25	3	6	12	16	64
2 <sup>c</sup>	clínica	1,25	12	16	12	16	16
3 <sup>a</sup>	clínica	0,5	4	8	6	6	16
3 <sup>a</sup>	persistente	0,75	24	6	24	3	16
4 <sup>c</sup>	subclínica	0,5	0,25	4	12	4	4
5 <sup>d</sup>	subclínica	0,19	0,48	4	12	8	4
7 <sup>a</sup>	subclínica	0,25	0,64	12	2	3	4
8 <sup>b</sup>	subclínica	48	3	32	3	2	96
9 <sup>d</sup>	subclínica	0,25	3	32	3	1	6
10 <sup>b</sup>	subclínica	0,5	3	38	3	0,5	6
11 <sup>a</sup>	subclínica	32	3	48	12	12	16
28 <sup>a</sup>	subclínica	3	4	96	12	3	48
91 <sup>a</sup>	subclínica	0,5	2	12	12	4	48

ENO = enrofloxacin, CIP = ciprofloxacina, CFP= cefoperazona, AMP = ampicilina, GEN = gentamicina e TET= tetraciclina. Números: correspondem a identificação do animal/isolado. <sup>a</sup>: microrregião de Viçosa, <sup>b</sup>:microrregião de Manhuaçu, <sup>c</sup>:microrregião de Muriaé, <sup>d</sup>: microrregião de Juiz de Fora.

Em dois isolados obtidos dos animais com mastite subclínica não foi possível obter o perfil genético através da PFGE. Esses isolados apresentaram colônias com aspecto mucóide na cultura, assim infere-se que estas bactérias apresentam cápsula dificultando a clivagem dos plugs para realização do PFGE. Para os demais isolados foram encontrados três *clusters* (Figura 1) e oito *pulsotypes*, sendo que cinco isolados

não foram agrupados em *clusters*. Nos *clusters* I e II foram encontrados dois isolados em cada um, obtidos de animais com mastite clínica, subclínica e persistente. O *cluster* III foi constituído de três isolados (mastite subclínica e persistente). No *cluster* I foram encontrados isolados obtidos de animais com mastite clínica e subclínica obtidos da mesma propriedade, mostrando que isolados de *E. coli* idênticos podem ocasionar diferentes apresentações de mastite, confirmando a teoria que ocorrência da doença não depende somente do patógeno e sim da relação patógeno- animal-ambiente (Teoria Ecológica). Os dados mostram que não foi encontrado uma relação entre o perfil clonal de *E. coli* isolados de diferentes tipos de mastite caprina.

A concentração bacteriana ( $1 \times 10^7$ ) utilizada nos ensaios de adesão e invasão não apresentou citotoxicidade. Foi observado que *E. coli* obtidas de cabras com mastite persistente (após o tratamento) apresentou maior poder de adesão e invasão que *E. coli* isolada do mesmo animal com mastite clínica (antes do tratamento) (figura 2), as quais não se mostraram idênticas pela PFGE, porém estreitamente relacionadas. (Figura 1).

Döpfer e colaboradores (2000) estudando *E. coli* isoladas de vacas com mastite clínica recorrente observaram que esses isolados possuem a capacidade de invadir as células epiteliais mamárias duas vezes maior e três vezes mais rápido que isolados de mastite clínica.

As observações sugerem que a mastite persistente seja uma consequência da infecção com cepas de *E. coli* que são capazes de invadir e sobreviver dentro de células epiteliais mamárias, evitando as defesas do hospedeiro, favorecendo assim a persistência da mastite. Esses dados concordam com os encontrados no presente estudo, entretanto os determinantes bacterianos da invasão da *E. coli* nas células epiteliais mamárias caprina ainda não são claros, devido a indisponibilidade de cultivo celular contínuo de células epiteliais mamária caprina e a dificuldade de obter cultivo de células primárias, necessitando de padronização. Foi utilizada cultivo de células epiteliais mamárias bovina (MAC-T) como modelo para espécie caprina, entretanto devido as diferenças na produção do leite não podemos confirmar que *E. coli* se comporte da mesma forma nas células mamárias caprina. Por isso são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

A diversidade de comportamentos encontrada em *E. coli* é sustentada pela sua alta plasticidade genética que permite a aquisição e a perda de atributos genéticos por meio de eventos de transferência horizontal de genes (Kaper et al., 2004)

PFGE- XbaI

PFGE- XbaI

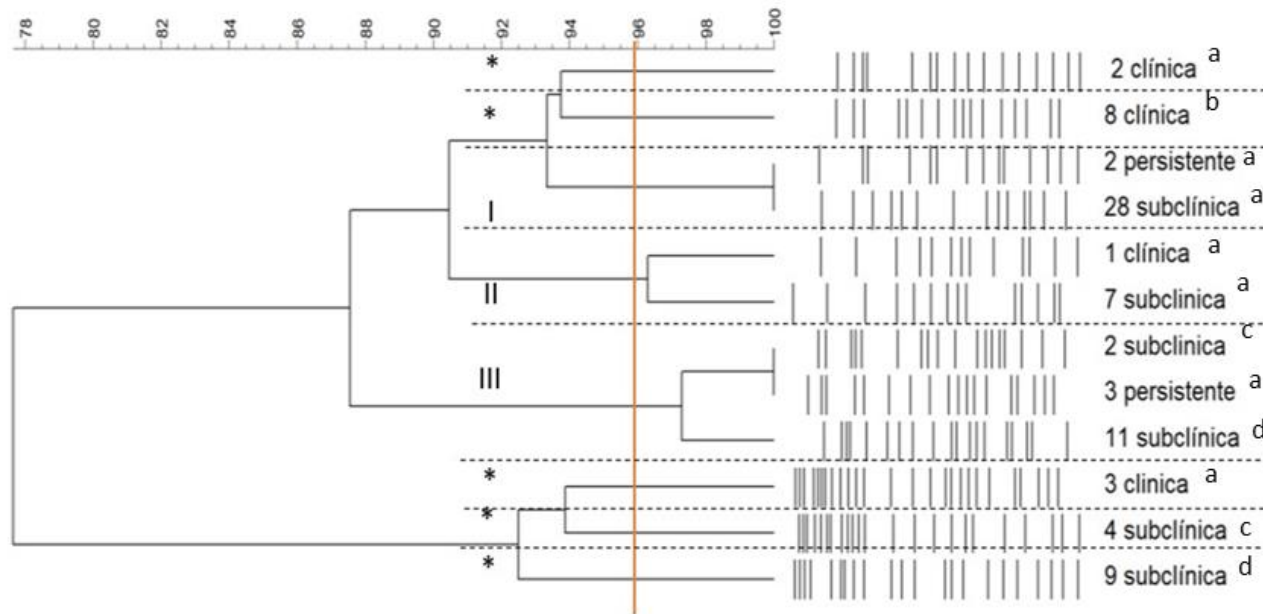


Figura 1. Dendrograma de PFGE gerado usando UPGMA/Dice (BioNumerics) de 12 isolados de *Escherichia coli* de amostras de leite de cabras com mastite. Na relação clonal, o ponto de corte (ver linha vermelha) foi estabelecido em 96 %. As linhas pontilhadas representam os pulsotipos. De I a III representam os *clusters*. \* isolados que não são agrupados em cluster. Os números correspondem a identificação dos animais. as letras após a identificação do tipo de mastite corresponde as microrregiões, a: Viçosa, b: Muriaé, c: Manhuaçu, d: Juiz de Fora.

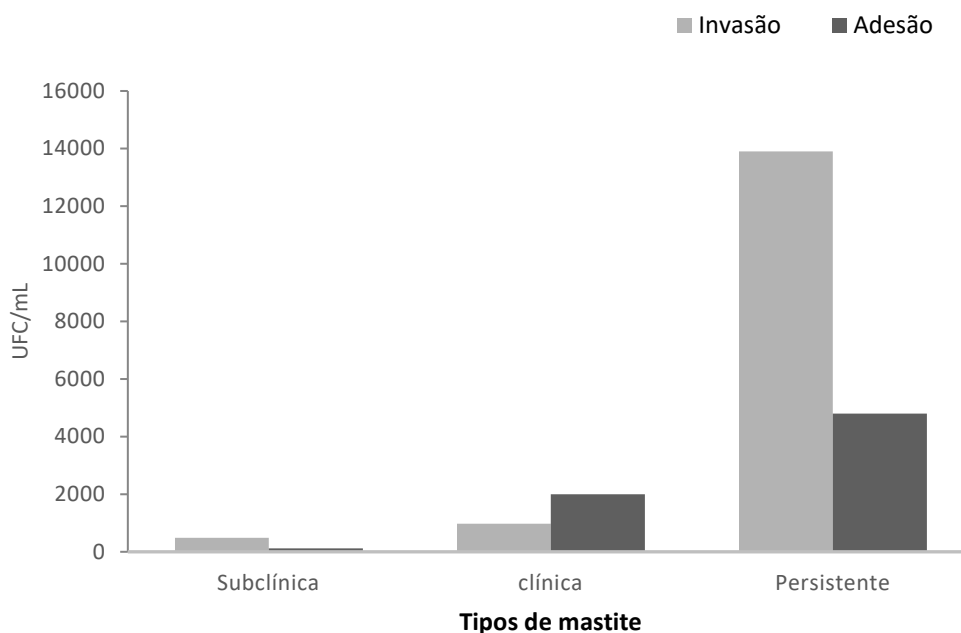


Figura 2. Ensaio de adesão e invasão em células epitelial mamária bovina (MAC-T) de *Escherichia coli* isoladas de cabras leiteiras com mastite clínica, persistente e subclínica.

#### 4. Conclusão

*E. coli* obtidos de cabras com diferentes tipos de mastite (clínica, subclínica e persistente) apresentaram diferenças em relação ao perfil de resistência, perfil clonal e capacidade de adesão e invasão. Não há uma relação entre os perfis estudados de *E. coli* e o tipo de mastite, entretanto *E. coli* isolados de cabras com mastite persistente apresentou maior capacidade de adesão e invasão que os isolados de mastite clínica e subclínica.

## 5. Referências

- Almeida, J.F., Aquino, M.H.C., Magalhães, H., Nascimento, E.R., Pereira, V.L.A., Ferreira, T., Barreto, M.L., 2013. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. 13–18.
- Bradley, A.J., Green, M.J., 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1845–1849.
- Chen, J., Griffiths, M.W., 1998. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 369–371.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, in: Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS. p. 76. doi:M02-A11
- Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R.A., Oliver, S.P., Simpson, K., Schukken, Y.H., 2006a. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 116, 270–282.
- Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R.A., Oliver, S.P., Simpson, K., Schukken, Y.H., 2006b. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 116, 270–282.
- Döpfer, D., Almeida, R.A., Lam, T.J.G.M., Nederbragt, H., Oliver, S.P., Gaastra, W., 2000. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet. Microbiol.* 74, 331–343.
- Elmas, M., Tras, B., Kaya, S., Bas, A.L., Yazar, E., Yarsan, E., 2001. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Angora goats. *Can. J. Vet. Res.* 65, 62–67.
- Finlay, B.B., Falkow, S., 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 136–69.
- Gröhn, Y.T., González, R.N., Wilson, D.J., Hertl, J.A., Bennett, G., Schulte, H., Schukken, Y.H., 2005. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on herd life in two New York State dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 71, 105–125.
- Hensen, S.M., Pavičić, M.J.A.M.P., Lohuis, J.A.C.M., Poutrel, B., 2000. Use of Bovine Primary Mammary Epithelial Cells for the Comparison of Adherence and Invasion Ability of *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Dairy Sci.* 83, 418–429.

- Kaipainen, T., Pohjanvirta, T., Shpigel, N.Y., Shwimmer, A., Pyörälä, S., Pelkonen, S., 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 85, 37–46.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Krumperman, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods . Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify {High-Risk} Sources of Fecal Contamination of Foodst. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 165–170.
- Langoni, H., Domingues, P.F., Baldini, S., 2006. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Rev. Bras. Ciência Veterinária* 13, 51–54.
- Mota, R.A., 2008. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. *Tecnol. Ciência Agropecuária* 2, 57–61.
- National Mastitis Council, 2001. Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis, National Mastitis Council, Madison, WI, USA. pp. 11–13.
- Peixoto, R. de M., Araújo, R. de M.P., Peixoto, L.J. e S., Reges, A.M., Alves, A.P.P., Pinheiro Júnior, J.W., Mota, R.A., Azevedo, S.S., Costa, M.M. da, 2016. Indirect diagnostic tests for the detection of subclinical mastitis in dairy goats experimentally infected with *Staphylococcus aureus*. *Ciênc. Rural.* 46, 1217–1222.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J., 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Second Edi. ed. Iowa , USA.
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K., 2014. Resistência microbiana a drogas em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de fontes alimentares. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56, 341–346.
- Ribeiro, M.G., Lara, G.H.B., Bicudo, S.D., Souza, A.V.G., Salerno, T., Siqueira, A.K., Geraldo, J.S., 2007. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 59, 810–812.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* , and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67.

- Sabaté, M., Prats, G., Moreno, E., Ballesté, E., Blanch, A.R., Andreu, A., 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res. Microbiol.* 159, 288–293.
- Shpigel, N.Y., Winkler, M., Ziv, G., Saran, a, 1998. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 35, 1–9.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., El Karoui, M., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J., Le Bouguéneq, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C. Saint, Schneider, D., Tourret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Médigue, C., Rocha, E.P.C., Denamur, E., 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5.
- White, E.C., Hinckley, L.S., 1999. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Rumin. Res.* 33, 117–121.

## CONCLUSÃO GERAL

Há poucos estudos relacionados a tratamento da mastite caprina, a maioria destes estão relacionados de alguma forma com o tratamento realizados em bovinos. São necessários mais estudos para validar a eficácia e segurança dos antimicrobianos para tratamento da mastite caprina, bem como, o período de tratamento (seco e lactação) além do tempo de eliminação de resíduos no leite.

As propriedades da Zona da Mata de Minas Gerais os Produtores são bem instruídos e tecnicados, criam raças especializadas na produção de leite, e não possuem assistência veterinária.

*Staphylococcus aureus* foi a bactéria mais isolada com perfil de resistência principalmente aos beta-lactâmicos. *Escherichia coli* foi a bacteria Gram negativa mais prevalente.

Foram observadas alterações nos perfis de resistência nos isolados de *S. aureus* obtidos após o tratamento com enrofloxacina.

Não há uma relação entre os perfis estudados de *E. coli* e o tipo de mastite. *E. coli* isolados de cabras com mastite persistente apresentou maior capacidade de adesão e invasão que os isolados de mastite clínica e subclínica.

## **ANEXO 1: Aprovação na comissão de ética de Uso animal (CEUA/UFV).**

### **CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 42/2014, intitulado “Caracterização molecular de bactérias causadoras de mastite recidivante em caprinos da Zona da Mata Mineira”, coordenado pela professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 11/09/2014, com validade de 12 meses.

### **CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 42/2014, named “Molecular characterization of the bacteria that cause mastitis recurrent in goats from Zona da Mata Mineira”, is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on September 11, 2014 valid for 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca  
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV