

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

Daneelly Henrique Ferreira Freire

Caracterização de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino no estado da
Paraíba

Patos/PB
2021

Daneelly Henrique Ferreira Freire

Caracterização de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino no estado da Paraíba

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Prof.^ª. Dr.^ª. Márcia Almeida de Melo
Orientadora

Prof.^º. Dr.^º. Celso José Bruno de Oliveira
Coorientador

Patos/PB
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

F866c Freire, Daneelly Henrique Ferreira
Caracterização de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino no estado da Paraíba / Daneelly Henrique Ferreira Freire. – Patos, 2021.
47f.

Tese (Doutorado em Ciência e Saúde Animal) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Márcia Almeida de Melo
Coorientação: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira.

Referências.

1. *Staphylococcus* coagulase negativo. 2. Genotipagem.
3. Enterotoxinas. 4. Resistência. I. Título.

CDU 576.8:619



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM CIENCIA E SAUDE ANIMAL
Rua Aprígio Veloso, 882, - Bairro Universitário, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

DANEELLY HENRIQUE FERREIRA FREIRE

CARACTERIZAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.* ISOLADO DE LEITE CAPRINO NO ESTADO DA PARAÍBA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Aprovada em: 26/02/2021

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo (Orientadora - PPGCSA/UFCG)
Profa. Dra. Rosália Severo de Medeiros (Examinadora Externa - UFCG)
Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo (Examinador Externo - UFS)
Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Examinador Externo - UFCG)
Profa. Dra. Nara Geanne de Araújo Medeiros (Examinadora Externa - UFCG)



Documento assinado eletronicamente por **ABRAHAO ALVES DE OLIVEIRA FILHO, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/02/2021, às 12:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **ROSALIA SEVERO DE MEDEIROS, PROFESSOR 3 GRAU**, em 26/02/2021, às 12:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCIA ALMEIDA DE MELO, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/02/2021, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edisio Oliveira de Azevedo, Usuário Externo**, em 26/02/2021, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **NARA GEANNE DE ARAUJO MEDEIROS, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/02/2021, às 12:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1305883** e o código CRC **557D01FE**.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me proporcionar a realização de um sonho, foram muitos obstáculos, mas sempre tive a certeza da vitória, quando há dedicação a vitória é garantida.

Com carinho a minha mãe, Antônia Roberta Henrique Ferreira, que sempre esteve firme em suas orações, e que de fato Deus a escutou e colocou verdadeiros anjos nessa trajetória, os quais serão citados nesses agradecimentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPGCSA) bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pela oportunidade e bolsa concedida.

A Professora Marcia Almeida de Melo pela oportunidade e orientações e apoio prestados.

Ao Professor Celso José Bruno de Oliveira pelas orientações prestadas, pela recepção no LAPOA e credibilidade.

Aos meus amigos da UFCG/PPGCSA, Iara Nunes Siqueira e Natanael de Souza Silva, anjos que Deus enviou para me ajudar no experimento. A Iara pela amizade e orações.

As minhas amigas da UFPB/CCA, Priscylla Carvalho Vasconcelos e Núbia Michelle Vieira da Silva, anjos fundamentais no desenvolvimento do meu experimento, agradeço pelo acolhimento, comprometimento, paciência, companheirismo e carinho.

A minha família pelo incentivo, acreditando sempre no meu potencial.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

A principal enfermidade que acomete o rebanho leiteiro caprino são infecções intramamárias, que geralmente tem como etiologia *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e positivo (SCP). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo a caracterização genotípica e fenotípica de *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica de caprinos bem como caracterizar os fatores de virulência associados a essas bactérias. Foram coletadas 400 amostras de leite caprino em 25 propriedades distribuídas em cinco municípios da Paraíba, (Amparo, Cabaceiras, São Sebastião de Umbuzeiro, Ouro Velho e Prata) que possuem rebanho caprino leiteiro, resultando em 105 isolamentos característicos de *Staphylococcus* spp., as espécies foram identificadas por Maldi-tof. Foram realizadas PCR individuais objetivando identificar genes de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* e *sei* e genes de resistência *blaZ* e *mecA*, amostras hemolíticas foram testadas para *IcaD*. O teste de sensibilidade antimicrobiana fenotípica foi realizada através da técnica de disco difusão. Foram utilizados os seguintes discos: Cefoxitina 30µg, Oxacilina 1µg, Gentamicina 10µg, Eritromicina 15µg, Tetraciclina 30µg, Ciprofloxacino 5µg, Sulfa/Trimetopim 25µg, Clindamicina 2µg, Penicilina 10U, Clorafenicol 30µg. Foi realizado o teste exato de Fisher ($p > 0,05$) para comparar espécies e resistência. A genotipificação dos isolados foi elaborada empregando a REP-PCR, utilizando o primer RW3A, as imagens foram processadas pelo software BioNumerics®, o grau de similaridade foi estabelecido por meio do coeficiente de Jaccard (5%). Um total de 15 espécies de *Staphylococcus* foi identificado nos cinco municípios avaliados. As principais espécies causadoras de mastite subclínica foram *S. epidermidis* (36%), *S. caprae* (24%), *S. lugdunensis* (13%), *S. simulans* (7%) e *S. xylosus* (4%). O município que apresentou a maior diversidade de espécies foi o de Prata. A REP-PCR identificou 28 perfis com similaridade de 100%, observou-se que espécies bacterianas genotipicamente clones (100% de similaridade) são responsáveis pela mastite subclínica em cidades diferentes. A presença de genes de enterotoxinas foram identificados em oito *Staphylococcus* (7,6%), destes três apresentaram *sec* e cinco *seh*, três amostras apresentaram o gene *sec* e *seh* simultaneamente. Altas taxas de resistências foram identificados para Penicilina (40%), Sufa/Trimetopim (33%) e Tetraciclina (25,5%). Três estirpes de SCN apresentaram resistência fenotípica a oxacilina caracterizando MRSCN e uma linhagem de *S. aureus* (MRSA). Todas as amostras foram sensíveis a Gentamicina. Na investigação do perfil genotípico de resistência foi revelado isolados positivos para o gene *blaZ* (26,6%) e *mecA*

(1,1%). Os isolados hemolíticos testados para *icaD* (50%), foram considerados como potenciais produtores de biofilme pela detecção do gene. Considerando a caracterização dos principais agentes bacterianos causadores de mastite e seus fatores de virulência e resistência, norteiam o papel da cadeia leiteira alimentar caprina como reservatórios de patógenos que geram riscos a saúde pública, as altas taxas de resistência e identificação de cepas produtoras de biofilme indicam falhas nas práticas terapêuticas e de manejo.

PALAVRAS CHAVE: *Staphylococcus* coagulase negativo; genotipagem; enterotoxinas; resistência

ABSTRACT

The main disease that affects the goat dairy herd is intramammary infections, which usually have coagulase negative (SCN) and positive (SCP) *Staphylococcus* etiology. In this north, the present study aimed at the genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus* isolated from subclinical goat mastitis as well as to characterize the virulence factors associated with these bacteria. 400 goat milk samples were collected from 25 farms distributed in five municipalities in Paraíba that have a dairy goat herd, resulting in 105 isolations characteristic of *Staphylococcus spp.*, The species were identified by Maldi-tof. The genotyping of the isolates was performed using REP-PCR, using the primer RW3A, the images were processed by the software BioNumerics ©, the degree of similarity was established using the Jaccard coefficient (5%). Individual PCRs were carried out aiming to identify *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sec*, *seh* and *sei* enterotoxin genes and *blaZ* and *mecA* resistance genes, hemolytic samples were tested for *IcaD*. The reactions had a final volume of 50µL, PCR SuperMix (Invitrogen, Brazil) was used with 0.4 mM of each primer. The determination of phenotypic resistance was performed using the disk diffusion technique. The following discs were used: Cefoxitin 30µg, Oxacillin 1µg, Gentamicin 10µg, Erythromycin 15µg, Tetracycline 30µg, Ciprofloxacin 5µg, Sulfa / Trimetropim 25µg, Clindamycin 2µg, Penicillin 10U, Clorafenicol 30µg. Fisher's exact test ($p > 0,05$) was performed to buy species and resistance. A total of 15 species of *Staphylococcus* were identified in the five municipalities evaluated. The main species causing subclinical mastitis were *S. epidermidis* (36%), *S. caprae* (24%), *S. lugdunensis* (13%), *S. simulans* (7%) and *S. xylosus* (4%). The municipality that presented the greatest diversity of species was Prata. REP-PCR identified 28 profiles with 100% similarity, it was observed that bacterial species genotypically clones (100% similarity) are responsible for subclinical mastitis in different cities. The presence of enterotoxin genes was identified in eight *Staphylococcus* (7.6%), of these three presented *sec* and five *seh*, three samples presented the *sec* and *seh* gene simultaneously. High resistance rates have been identified for Penicillin (40%), Sufa / Trimetropim (33%) and Tetracycline (25.5%). Three strains of SCN showed phenotypic resistance to oxacillin characterizing MRSCN and a strain of *S. aureus* (MRSA). All samples were sensitive to Gentamicin. In the investigation of the genotypic resistance profile, positive isolates for the *blaZ* (26.6%) and *mecA* (1.1%) genes were revealed. Hemolytic isolates tested for *icaD* (50%), biofilm production capacity was observed. Considering the characterization of the main bacterial agents that cause mastitis and its virulence and resistance factors, they guide the role of the

goat food chain as reservoirs of pathogens that generate public health risks, the high rates of resistance and identification of biofilm producing strains indicate flaws in therapeutic practices.

KEY WORDS: Staphylococcus; genotyping; enterotoxins; resistance

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Capítulo I	
Tabela 1. Caracterização fenotípica de <i>Staphylococcus spp.</i> isolados de mastite caprina no cariri Paraibano	20
Capítulo II	
Tabela 1. Sequência de primers de enterotoxinas de <i>Staphylococcus spp.</i>	27
Tabela 2. Espécies de <i>Staphylococcus</i> enterotoxigênicos isolados de leite caprino mastítico na Paraíba, Brasil.....	27
Capítulo III	
Tabela 1. Sequência de primers usado para determinação da resistência fenotípica e formação de biofilme	35
Tabela 2. Frequência de genes de resistência e formação de biofilme em espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de leite caprino na Paraíba	35

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Capítulo I	
Figura 1. Caracterização genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite subclínica caprina no cariri Paraibano.....	20
Capítulo II	
Figura 1. Taxa de Resistência de <i>Staphylococcus</i> isolados de leite caprino em municípios produtores de leite na Paraíba	35
Figura 2. Taxa de resistência entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de leite caprino na Paraíba	36

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO I	17
ABSTRACT	18
RESUMO	18
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO II.....	25
ABSTRACT	26
RESUMO	26
INTRODUÇÃO.....	26
RESULTADO.....	27
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO.....	28
CAPÍTULO III.....	31
ABSTRACT	32
RESUMO	32
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO.....	34
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A.....	40
ANEXO B.....	44

INTRODUÇÃO GERAL

A caprinocultura leiteira desempenha um papel significativo nas exigências socioeconômicas e nutricionais no Brasil. Na Região Nordeste grande parte desta produção está organizada em arranjos produtivos locais representados por cooperativas e associações que realizam o beneficiamento e comercialização em programas governamentais (EMBRAPA, 2018).

Na Paraíba existem programas governamentais como Programa de aquisição de alimentos (PAA) e Programa Leite da Paraíba que foram criados com finalidade de impulsionar a agricultura familiar e ter alcance social, a produção leiteira é destinada a consumidores em situação de risco alimentar, uma vez que o governo distribui para creches, escolas, hospitais, Centros de referência especializado de assistência social (CREAS) e Centro de Referência de assistência social (CRAS) (Brasil, 2020).

A Paraíba destaca-se nacionalmente como o maior produtor de leite caprino no país, produzindo mais de 5,5 milhões de litros de leite por ano (IBGE, 2018). Com a otimização da criação de caprinos e o aumento na produção leiteira, tem surgido uma maior preocupação com a qualidade do leite, embora tenha sido revelada uma melhora no nível tecnológico, representado pelo aumento de produtividade leiteira, a produção ainda possui perfil artesanal (EMBRAPA, 2018). Os produtores enfrentam desafios com a redução na produção leiteira associada à mastite, caracterizada pela inflamação da glândula mamária resultante a processos infecciosos (Langoni et al, 2006).

Os *Staphylococcus* spp. são bactérias comumente encontradas na glândula mamária e potenciais produtores de enterotoxinas e são os patógenos comumente envolvidos mundialmente em surtos de intoxicações alimentares. As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são identificadas como clássicas *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* e novas *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser* e *seu*, além da síndrome do choque tóxico causada pela enterotoxinas *tsst-1* (Andrade et al, 2019).

Nas mastites de origem bacterianas, o tratamento de eleição é a antibioticoterapia. No entanto, o uso elevado de antimicrobianos ou a sua utilização de forma indiscriminada, sem auxílio técnico aumenta o risco de resistência antimicrobiana. Isso contribui para o surgimento de cepas resistentes a drogas de importância para a saúde humana, a exemplo de *Staphylococcus* spp, resistente à meticilina (MRS) (Silva et al, 2018).

Métodos de identificação de microrganismos revolucionária como a espectrometria de massa, o Maldi-tof MS representa uma metodologia promissora, aliada à microbiologia clínica veterinária, de maneira que os agentes causadores de enfermidades poderão ser identificados em nível de espécie com alta precisão (Gessolin, et al, 2018). A técnica se torna ainda mais exata quando a identificação é feita a partir de colônias puras. (Assis, et al 2017).

Métodos de genotipagem para investigação epidemiológica a partir de amplificação de DNA tem sido otimizado em virtude de sua simplicidade e eficiência. Dentre esses métodos o da REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic sequence - Sequências palindrômicas extragênicas) com iniciadores RW3A tem sido utilizada com sucesso em análises epidemiológicas de *Staphylococcus aureus* e *S. coagulase* negativos com diferentes propósitos, representando alternativa mais eficiente e de menor custo em relação a outros métodos genotípicos de tipificação (Sousa, 2017).

Considerando a importância da Caprinocultura leiteira na Paraíba, o presente trabalho teve como objetivo identificar ocorrência de isolados do gênero *Staphylococcus* de leite de cabras provenientes de rebanhos leiteiros do estado da Paraíba, bem como avaliar sua similaridade genética e capacidade enterotoxigênica e de resistência fenotípica e genotípica a antimicrobianos.

Essa tese será estruturada em três capítulos, o primeiro corresponde a Caracterização de *Staphylococcus* spp. por Maldi-tof e Genotipagem por REP-PCR de isolados associados a mastite caprina. O segundo trata do Perfil enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* e não *aureus* oriundos de isolados de mastite subclínica caprina. O terceiro corresponde à resistência fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.P.C.; BORGES, M.F.; FIGUEREDO, E.A.T.; ARCURI, E.F. Diversity of staphylococcus coagulase- positive and negative strains of coalho cheese and detection of Enterotoxin encoding genes. **B.CEPPA**, Curitiba, v.36(1), 2019.

EMBRAPA. 2018. Novo Censo Agropecuário mostra crescimento de efetivo de caprinos e ovinos no Nordeste. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuario-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>. Acesso em 06/01/2020.

GOSSELIN, V.B.; LOVSTAD, J.; DUFOUR, S.; ADKINS, P.R.F.; MIDDLETON, J.R. Use of MALDI-TOF to characterize staphylococcal intramammary infections in dairy goats. **J. Dairy Sci.** 101:6262–6270, 2018.

IBGE. 2018. Censo Agropecuário. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>. Acesso em: 06/01/2020.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2006.

SILVA, J.V.; ALCANTARA, A.M.; MOTA, R.A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina: revisão de literatura. **Pesq. Vet. Bras.**,v.38(2):223-228, 2018.

ASSIS, G.B.N.; PEREIRA, F.L.; ZEGARRA, A.U.; TAVARES, G.C.; LEAL C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the fast identification of Gram-Positive fish pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-12, 2017.

SOUSA, M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. **Clinical Microbiology and Infection**, v.23, 373-380, 2017.

CAPÍTULO I

Caracterização genotípica e fenotípica por Maldi-tof de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica caprina

Artigo será submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira – Qualis A4

Caracterização genotípica e fenotípica por Maldi-tof de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino

Daneelly Henrique Ferreira Freire¹; Natanael de Souza Silva²; Iara Nunes de Siqueira³; Priscylla Carvalho Vasconcelos⁴; Núbia Michelle Vieira da Silva⁵; Sérgio Santos de Azevedo⁶; Celso José Bruno de Oliveira⁷; Marcia Almeida de Melo⁸

ABSTRACT: Freire, D.H.F., Silva, N.S., Siqueira, I.N., Vasconcelos, P.C., Silva, Azevedo, S.S., N.M.V., Oliveira, C.J.B., Melo, M.A. 2021. **Caracterização genotípica e fenotípica por Maldi-tof de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica caprina.** Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, CSTR - Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Endereço: Avenida Universitária, s/n. Bairro Santa Cecília - Cx Postal 61 - Patos/PB.

The main disease that affects the goat's dairy herd is intramammary infections, which usually have negative coagulase (SCN) and positive (SCP) *Staphylococcus* etiologic agents. The present study aimed at the genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus* isolated from subclinical goat mastitis. Goat milk was collected from 25 farms in five municipalities in Paraíba that have a dairy goat herd, resulting in 105 isolations characteristic of *Staphylococcus* spp., The species were identified by Maldi-tof. The genotyping of the isolates was elaborated using REP-PCR, using the primer RW3A, the images were processed by the software BioNumerics ©, the degree of similarity was established by means of the Jaccard coefficient (5%). A great diversity of *Staphylococcus* species has been identified, with the SCN being the most common, especially *S. epidermidis* (36%) and *S. caprae* (24%). Among the SCP, the only isolated species was *S. aureus* (2%) in one of the municipalities. Regarding the genotypic characterization, it was observed that some bacterial isolates showed high similarity (100%) despite being responsible for subclinical mastitis in different municipalities, as occurred with isolates of *S. epidermidis* and *S. caprae*. However, genetic profiles with 100% similarity were found in the same municipality. Considering the characterization of the main bacterial agents and their pathogenic capacity, they guide the possible methods of control of caprine subclinical mastitis, focusing on the prevalent species, as well as further studies of investigation of virulence factors that can be expressed by SCN even with zoonotic character.

KEY WORDS: coagulase negative *Staphylococcus*; Coagulase positive *Staphylococcus*; etiology; goats

RESUMO: A principal enfermidade que acomete o rebanho leiteiro caprino são infecções intramamárias, que geralmente tem como agente etiológico *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e positivo (SCP). O presente estudo teve como objetivo a caracterização genotípica e fenotípica de *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica de caprinos. Coletadas de leite caprino foram realizadas em 25 propriedades distribuídas em cinco municípios da Paraíba que possuem rebanho caprino leiteiro, resultando em 105 isolamentos característicos de *Staphylococcus* spp., as espécies foram identificadas por Maldi-tof. A genotipificação dos isolados foi elaborada empregando a REP-PCR, utilizando o primer RW3A, as imagens foram processadas pelo software BioNumerics©, o grau de similaridade foi estabelecido por meio do coeficiente de Jaccard (5%). Grande diversidade de espécie de *Staphylococcus* foi identificada, sendo os SCN de maior ocorrência, destacando-se os *S. epidermidis* (36%) e *S. caprae* (24%). Dentre os SCP a única espécie isolada foi *S. aureus* (2%) em um dos municípios. Quanto à caracterização genotípica observou-se que alguns isolados bacterianos apresentaram alta similaridade (100%) apesar de serem responsáveis pela mastite subclínica em municípios diferentes, como ocorreu com isolados de *S. epidermidis* e *S. caprae*. No entanto perfis genéticos com 100% de similaridade foram encontrados em um mesmo município. Considerando a caracterização dos principais agentes bacterianos e sua capacidade patogênica, norteiam os possíveis métodos de controle da mastite subclínica caprina, focando nas espécies prevalentes, bem como estudos posteriores de investigação de fatores de virulência que podem ser expressos por SCN inclusive com caráter zoonótico.

PALAVRAS CHAVE: *Staphylococcus* coagulase negativo; *Staphylococcus* coagulase positivo; etiologia; cabras

INTRODUÇÃO:

Dentre as doenças que podem afetar o rebanho caprino leiteiro, as infecções intramamárias (IIM) destacam-se como principais causadoras de prejuízos econômicos ao produtor, em consequência da

redução na produção leiteira. A mastite subclínica (MS) caprina geralmente é ocasionada por *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN) e em menor frequência os positivos (SCP), destacando-se os *S. aureus*. A identificação dos patógenos associados à mastite caprina é fundamental para determinar a patogenicidade e subsidiar a implantação de um programa de controle e prevenção desta enfermidade (Contreras et al, 2007).

Várias espécies de SCN em cabras são difíceis de identificar apenas por métodos fenotípicos, produzindo baixa precisão (Koop et al, 2012). Métodos novos de identificação de microrganismos de forma rápida, precisa e acessível como o Maldi-tof o revela como método promissor na clínica Veterinária (Gessolin et al, 2018). Dentre os testes moleculares para análise de similaridade, a REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences* – Reação de Cadeia de Polimerase) estabelece modo simples e rápido de caracterizar e diferenciar micro-organismos (Gomes de Leon, 2014).

Em maioria, os estudos (Santos Júnior et al, 2019; Gabli et al, 2019; Langoni et al, 2006) relacionados à etiologia da mastite caprina não identificam as espécies de *Staphylococcus* envolvidos nessa enfermidade, e quando os fazem é através de métodos bioquímicos pouco precisos. A tipificação dos isolados através de métodos moleculares de custo baixo é ferramenta fundamental no controle das IIM em caprinos. Nesse norte a identificação das espécies bem como a caracterização genotípica e sua distribuição entre municípios produtores de leite caracterizam uma saída para implementação de tratamento e controle da mastite. Desta maneira objetivou-se neste estudo realizar investigação epidemiológica de SCP e SCN isolados de mastite caprina subclínica da região do cariri Paraibano através de métodos de genotipagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O estudo foi realizado nos municípios de Amparo, Prata, Cabaceiras, Ouro Velho e São Sebastião de Umbuzeiro localizados na mesorregião da Borborema e microrregião do cariri ocidental, região leiteira caprina da Paraíba-PB. Foram coletadas 400 amostras de leite caprino, em 25 propriedades, para isolamento microbiológico. Nenhuma cabra apresentou características de mastite clínica no momento da coleta. As amostras foram coletadas em recipientes estéreis, após assepsia do teto, e mantidas sob refrigeração até a chegada no LAPOA (Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal) na UFPB/CCA (Universidade Federal da Paraíba) para isolamento microbiológico.

As propriedades foram selecionadas por conveniência, de acordo com a disponibilidade dos produtores rurais, através da articulação com as Associações de Criadores de Caprinos Leiteiros (Nascimento & Alves, 2008). As coletas foram realizadas em 2018, no período chuvoso, entre os meses de abril a junho. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Brasil, 2017), o efetivo do rebanho da região é de 35.859 caprinos, que foi utilizado para definir o tamanho da amostra pela fórmula $[z^2 * p(1-p)] / e^2 / 1 + [z^2 * p(1-p)] / e^2 * N$, sendo: z – o grau de confiança de 95%, e - margem de erro 5% e p constante de 0,5. Com isso, chegou-se ao número de 381 amostras a ser utilizadas na pesquisa.

Lactocultura

As amostras de leite caprino foram cultivadas em ágar sangue ovino 5% e as placas foram analisadas com 24/48h de cultivo. Os microrganismos isolados foram submetidos à prova de catalase e teste de Gram. Um total de 105 amostras apresentaram características para o gênero *Staphylococcus* spp.

Maldi-Tof

As amostras características de *Staphylococcus* spp. foram encaminhadas ao Laboratório de Sanidade de animais aquáticos (Aquacen) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para identificação das espécies através do MALDI-TOF (Espectrometria de Massa). Colônia única e nova de cada amostra bacteriana foi transferida para placa alvo MALDI (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para cada amostra foi usado 1 µl de ácido fórmico (70%) e 1 µl da matriz MALDI-TOF MS e deixado secar ao ar. Os espectros foram adquiridos usando o espectrômetro de massa MicroFlex LT (Bruker Daltonics). Antes das medições, a calibração era realizada com padrão de teste bacteriano (*E. coli* DH5 alfa; Bruker Daltonics). Os critérios de pontuação de identificação em tempo real foram os recomendados pelo fabricante: ≥ 2.000 indica identificação em nível de espécie, a pontuação entre ≥ 1.700 e ≤ 2.000 indica identificação em nível de gênero e pontuação < 1.700 indica identificação não confiável (Assis et al, 2017).

Genotipagem REP-PCR

O DNA genômico foi extraído pelo método Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989) com modificações. A reação de amplificação para a REP-PCR foi realizada segundo protocolo descrito por Van Der Zee *et al.* (1999), com modificações. As reação continham volume total de 25 µL, contendo tampão (x1), MgCl₂ (3 mM), dNTPs (200 µM de cada), primer RW3A (5'-TCG CTC AAA ACA ACG ACA CC-3') (1 pmol), Taq DNA polimerase (1U), água ultrapura e 100ng de DNA alvo. A mistura reacional foi incubada em Termociclador (TPersonal Thermocycler, Biometra®, Alemanha) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94^o C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94^o C por 1 minuto, anelamento a 50^oC por 1 minuto e polimerização a 72^o C por 2 minutos) e extensão final a 72^o C por 5 minutos.

Os *amplicons* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Brometo e visualizados com auxílio de transiluminador em UV (Carestream Molecular Imaging Software - Version 5.0, ©Carestream Health, Inc,EUA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por comparação com um padrão de massa molecular de 100 pb e 1 kb (Ludwig Biotec, Brasil). Como controle positivo foi utilizado cepa padrão USA 400 *S. aureus*.

A similaridade entre as cepas de *Staphylococcus spp.* foi determinada com base na presença de bandas no gel, com imagens processadas pelo software BioNumerics® (Versão 7.1, Applied Maths, Bélgica). Para expressão da similaridade entre os diferentes genótipos, utilizou-se coeficiente de Jaccard (5% de tolerância) e construção de dendograma através da das amostras selecionadas.

RESULTADOS

Das 400 amostras analisadas 105 (26,5%) foram positivas para *Staphylococcus spp.*, e destas 96 (91,43%) foram classificadas com escore ≥ 2.000 pelo MALDI-TOF. Destas 94 eram SCN e apenas duas SCP. Um total de 15 espécies de *Staphylococcus* foram identificadas nos cinco municípios avaliados (tabela 1). As principais espécies causadoras de mastite subclínica foram *S. epidermidis* (36%), *S. caprae* (24%), *S. lugdunensis* (13%), *S. simulans* (7%) e *S. xylosus* (4%).

O resultado da rep-PCR identificou 28 perfis com similaridade de 100%, com fragmentos variando de 500 a 3000 pares de bases. A investigação da relação clonal entre as cepas revelou de maneira geral que os genótipos foram similares (figura 2). Observou-se que algumas espécies bacterianas genotipicamente clones (100% de similaridade) são responsáveis pela mastite subclínica em cidades diferentes, como observado nos perfis 3 e 18, demonstram que clones de *S. epidermidis* foram responsáveis por infecções intramamárias nos municípios de Prata e Amparo.

Foram encontradas espécies de *S. epidermidis* com perfil genético diferentes, demonstrando que uma mesma espécie pode apresentar características genotípicas diferentes

DISCUSSÃO

Alta incidência de SCN e baixa de SCP foram identificadas, estudos semelhantes recentes realizados na mesma região revelam os SCN como os principais agentes isolados de mastite subclínica caprina (Santos Júnior *et al.*, 2019) bem como em outros países (Gabli *et al.*, 2019; Moroni *et al.*, 2015). Os SCP são menos frequentes em mastite subclínica, embora foi revelado *S. aureus* em um dos municípios, esse patógeno dentro dos SCP são os mais frequentemente isolados de mastite subclínica caprina (Moroni *et al.*, 2015).

As principais espécies causadoras de mastite subclínica foram *S. epidermidis* (36%), *S. caprae* (24%), *S. lugdunensis* (13%), *S. simulans* (7%) e *S. xylosus* (4%), o segundo destaca-se em outros estudos como um dos principais causadores da mastite subclínica em fazendas leiteiras (Gabli *et al.*, 2019; d'Ersul *et al.*, 2016) e são considerados patógenos potencialmente patogênicos devido a expressão de fatores de virulência, principalmente no período parturiente, quando os mecanismos de defesa do úbere está diminuído (Moroni *et al.*, 2015). Os *S. epidermidis* estão muito associados à infecções intramamárias persistentemente crônicas e são frequentemente isolados de mastite caprina (Salaberry *et al.*, 2015; Lagoni *et al.*, 2006), este patógenos tem capacidade de aumentar a quantidade de células somáticas causando a redução na produção leiteira, bem como causar infecções nosocomiais, destacando-se como um patógeno de importância para saúde pública humana (Peixoto *et al.*, 2013).

Quando comparados os municípios, observam-se diferentes espécies de *Staphylococcus spp.* isolados de mastite subclínica. O município que apresentou a maior diversidade de espécies foi o de Prata (figura 1), embora o *S. epidermidis*, *caprae* e *S. simulans* sejam os mais prevalentes. Amparo e Prata apresentaram o *S. epidermidis* como o principal agente da mastite subclínica. Cabaceiras foi a única cidade estudada que apresentou SCP, sendo *S. aureus* isolado em 10,5% das amostras no município. Apesar dos *S. aureus* serem relatados como causadores de mastite clínica, são também indicados como responsáveis por mastite subclínica caprina (Gabli *et al.*, 2019). Este patógeno também se destaca por seu potencial toxigênico, pois suas enterotoxinas podem resistir ao processo de pasteurização e causar intoxicação

alimentar, como identificado em pesquisa na mesma região que identificou cepas de *S. aureus* enterotoxigênica, embora seja um patógeno de pouca prevalência e diminuída capacidade de transmissão entre cabras (Ferreira et al. 2014). Há suspeitas que as cabras possam apresentar mecanismos de resistência contra esse agente (Contreras et al. 2003).

O município de São Sebastião de Umbuzeiro apresentou prevalência alta de *S. lugdunensis* (39%) diferentemente do encontrado nos outros municípios. Essa espécie apesar de pouco prevalente em outros estudos (Moroni et al. 2015) é relatado como SCN potencialmente virulento por poder apresentar características de adesão aos tecidos da glândula mamária, protegendo-se das defesas do hospedeiro através da formação de biofilmes, como observado em investigações em outros estados do Brasil (Salaberry et al. 2015).

O resultado da rep-PCR identificou 28 perfis com similaridade de 100%, com fragmentos variando de 500 a 3000 pares de bases. A investigação da relação clonal entre as cepas revelou de maneira geral que os genótipos foram similares (figura 1), o que era esperado por serem todos os isolados de mesmo gênero bacteriano. Observou-se que algumas espécies bacterianas genotipicamente clones (100% de similaridade) são responsáveis pela mastite subclínica em cidades diferentes, como observado nos perfis 3 e 18, demonstrando que clones de *S. epidermidis* foram responsáveis por infecções intramamárias nos municípios de Prata e Amparo, nessa mesma região do estado é comum a venda e troca de animais leiteiros em feiras, o que pode explicar a presença de cepas com mesmo perfil genético em cidades vizinhas, uma vez que essas duas encontram-se na mesma microrregião.

Em contrapartida *S. epidermidis* com perfil genético diferente foram encontrados no mesmo município como Amparo (perfis 3, 10 e 13), São Sebastião de Umbuzeiro (perfis 14, 15 e 16), Cabaceiras (perfis 4, 9 e 18) e Prata (perfis 3, 17, 18, 27 e 28), demonstrando que uma mesma espécie pode apresentar características genotípicas diferentes, como por exemplo genes de resistência que podem ser móveis e portanto podem ser transferidos à outras bactérias como genes plasmidiais através dos processos de conjugação gênica (Quinn, 2005).

Ao analisar o perfil genético dos *S. caprae*, a segunda espécie mais prevalente SCN demonstrado neste estudo, os perfis 19 e 22 indica que também houve variação genética dentro de um mesmo município (Ouro Velho), sugerindo que há diferenças que podem estar associadas a fatores de virulência. O perfil 22 comprova que um dos genótipos de *S. caprae* são responsáveis pela mastite subclínica nos municípios de Prata e Ouro Velho, certamente pelo transito de animais que é comum nessas regiões.

CONCLUSÃO

Os *S. epidermidis*, *S. caprae* e *S. lugdunensis* são as espécies mais prevalentes. Prevalência de espécies diferente entre municípios, destaca-se a necessidade de ajustes no manejo do rebanho caprino leiteiro. Foram observadas cepas de mesma linhagem epidemiológica de *S. epidermidis* e *S. caprae* em municípios diferentes.

Tabela1. Caracterização fenotípica de Staphylococcus spp. isolados de mastite caprina no cariri Paraibano

Agente	Amparo	Prata	Cabaceiras	Ouro velho	S. S. Umbuzeiro
<i>S. epidermidis</i>	46,1%	43%	-	5,9%	28%
<i>S. caprae</i>	46,1%	14,3%	63,2%	53%	22,3%
<i>S. lugdunensis</i>	-	7,1%	5,3%	17,7%	39%
<i>S. simulans</i>	-	14,3%	5,3%	11,8%	-
<i>S. xylosus</i>	-	3,6%	5,3%	11,8%	-
<i>S. saprophyticus</i>	7,8%	-	-	-	-
<i>S. chromogenes</i>	-	7,1%	-	-	5,6%
<i>S. capitis</i>	-	-	5,3%	-	5,6%
<i>S. aureus</i>	-	-	10,5%	-	-
<i>S. pettenkoferi</i>	-	-	5,3%	-	-
<i>S. equorum</i>	-	3,6%	-	-	-
<i>S. sciuri</i>	-	3,6%	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	3,6%	-	-	-

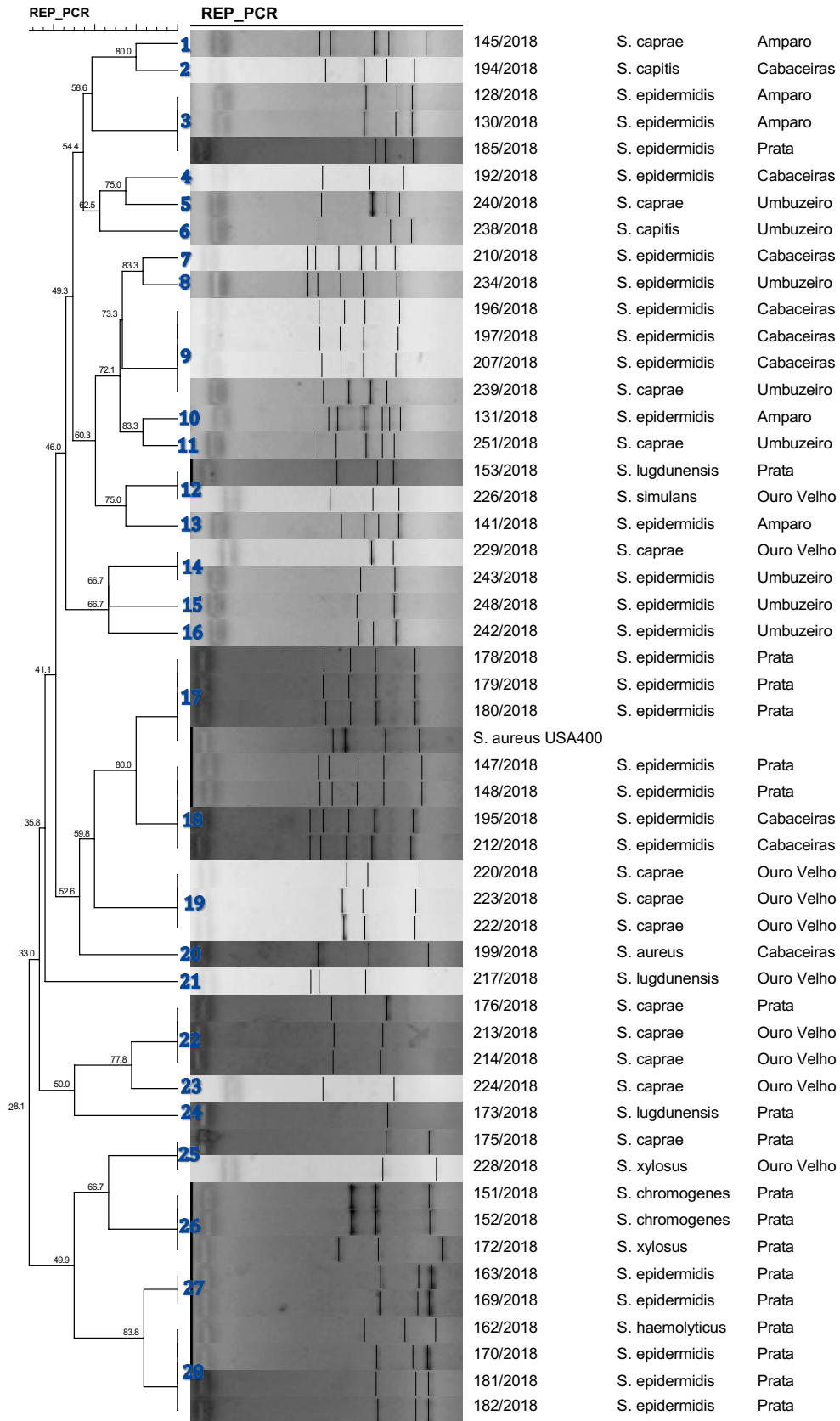


FIGURA 1. Caracterização genotípica de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica caprina no cariri Paraibano

REFERÊNCIAS

- Assis, G. B. N., Pereira, F.L., Zegarra, A.U., Tavares, G.C., Leal, C.A. & Figueiredo, H.C.P. 2017. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. *Frontiers in Microbiology*.v.8 artigo 1492.
- Contreras, A., Luengo C., Sánchez A. & Corrales J.C. 2003. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science* 79(273-283).
- d'Ersu J., Aubin, G. G., Mercier P., Nicollet P., Bémer P. & Corvec S.. 2016. Characterization of *Staphylococcus caprae* Clinical Isolates Involved in Human Bone and Joint Infections, Compared with Goat Mastitis Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 54(1) 106-112.
- EMBRAPA. 2018. Novo Censo Agropecuário mostra crescimento de efetivo de caprinos e ovinos no Nordeste. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuário-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>. Acesso em 06/01/2020.
- Ferreira D.H. , Carvalho M.G.X., Nardelli M.J., Sousa F.G.C. & Oliveira C.J.B.. 2014. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7):633-636.
- Gabli Z., Djerrou Z., Gabli A.E. & Bensalem M. 2019. Prevalence of mastitis in dairy goat farms in Eastern Algeria. *Veterinary World* 12 (1563-1572).
- Gomes de Leon, C.M.C. Monitoramento e investigação ecoepidemiológica da contaminação por *staphylococcus* spp. no beneficiamento do leite de cabra. 2014. 53p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2014.
- Gosselin V.B., Lovstad J., Dufour S., Adkins P.R.F., & Middleton J.R. 2018. Use of MALDI-TOF to characterize staphylococcal intramammary infections in dairy goats *J. Dairy Sci.* 101:6262-6270
- IBGE. 2018. Censo Agropecuário. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>. Acesso em: 06/01/2021.
- Langoni H., Domingues P.F. & Baldini S. 2006. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 13, n. 1, p. 51-54
- Moroni P., Pisoni G., Antonini M., Ruffo G., Carli S., Varisco G. & Boettcher P. 2005. Subclinical Mastitis and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Two Italian Goat Herds. *J. Dairy Sci.* 88:1694-1704.
- Peixoto R.M., Peixoto R.M., Kárita Cláudia Freitas Lidani K.C.F., Costa M.M.. 2013. Genotipificação de isolados de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de casos de mastite caprina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.2, p.322-325.
- Quinn, P.J., Markey B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C. *Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas*. Artimed, Porto Alegre, 2005.
- Salaberry S.R.S., Saidenberg A.B.S., Zuniga E., Melville P.A., Santos F.G.B., Guimarães E.C., Gregori F. & Benites N.R. 2015. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastites. *Microbial Pathogenesis* 85 (35e39).

CAPÍTULO II

Perfil enterotoxigênico de *Staphylococcus* Coagulase Negativo e Positivo isolados de leite caprino

Artigo será submetido a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Perfil enterotoxigênico de *Staphylococcus* Coagulase Negativos e Positivo isolados de leite caprino

Daneelly Henrique Ferreira Freire¹; Natanael de Souza Silva²; Iara Nunes de Siqueira³; Priscylla Carvalho Vasconcelos⁴; Núbia Michelle Vieira da Silva⁵; Sergio Santos de Azevedo⁶ Celso José Bruno de Oliveira⁷; Marcia Almeida de Melo⁸

ABSTRACT: Freire, D.H.F., Silva, N.S., Siqueira, I.N., Vasconcelos, P.C., Silva, Azevedo, S.S., N.M.V., Oliveira, C.J.B., Melo, M.A. 2021. **Perfil enterotoxigênico de *Staphylococcus* Coagulase Negativos e Positivo isolados de leite caprino.** Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, CSTR - Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Endereço: Avenida Universitária, s/n. Bairro Santa Cecília - Cx Postal 61 - Patos/PB. *Staphylococcus* spp. they are pathogens frequently isolated from goat's milk and their enterotoxigenic capacity may pose risks to food security. The objective of this research was to investigate the occurrence of genes encoding staphylococcal enterotoxins (ES) from isolates of mastitic goat milk. The milk samples came from lactating goats, from 25 dairy farms of the cariri Paraibano, a total of 105 samples were subjected to individual Polymerase Chain Reaction (PCR) in order to identify genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* and *sei*. Eight (7.6%) isolates of *Staphylococcus* spp. which encoded toxin genes, with *sec* and *seh* being identified. The species *S. epidermidis*, *S. caprae* and *S. aureus* were the ones that presented enterotoxigenic potential. In view of the results, the ability of coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN) as toxigenic stands out, revealing the potential risk to public health with the possibility of transmission of enterotoxins that cause food poisoning.

KEY WORD: enterotoxin; milk; goat; public health

RESUMO: Os *Staphylococcus* spp. são patógenos frequentemente isolados de leite caprino e sua capacidade enterotoxigênica pode implicar em riscos à segurança dos alimentos. Objetivou-se nessa pesquisa, investigar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (EE) procedentes de isolados de leite caprino mastítico. As amostras de leite foram oriundas de cabras em lactação, proveniente de 25 propriedades leiteiras do Cariri Paraibano, um total de 105 amostras foram submetidas a Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) individuais objetivando identificar genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* e *sei*. Foram detectados 8 (7,6%) isolados de *Staphylococcus* spp. que codificaram genes das toxinas, *sec* e *seh*. As espécies *S. epidermidis*, *S. caprae* e *S. aureus* foram as que apresentavam potencial enterotoxigênico. Frente aos resultados, destaca-se a capacidade de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) como toxigênicos, revelando o potencial risco a saúde pública com a possibilidade de causar intoxicações alimentares.

PALAVRAS CHAVE: enterotoxinas; leite; caprino; saúde pública

INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* spp. são os patógenos potenciais produtores de enterotoxinas comumente envolvidos em surtos de intoxicações alimentares mundialmente, caracterizando risco a saúde pública (Salaberry et al, 2015). As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são identificadas como clássicas *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* e novas *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser* e *seu*, além da síndrome do choque tóxico causada pela enterotoxinas TSST-1 (Andrade et al, 2019), são consideradas superantígenos que causam liberação aumentada de citocinas pro-inflamatórias promovendo o aparecimento de sintomas característicos de intoxicações (Pedroso et al, 2016).

A mastite caprina é em maioria subclínica e os agentes etiológicos comumente isolados são bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. com prevalência dos *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN), embora menos patogênico que o *S. aureus*, podem produzir mastite subclínica persistente (Gessolin et al, 2018) e enterotoxinas termoestáveis associadas a intoxicações alimentares (Contreras et al, 2007).

A identificação de *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos é de fundamental importância para conhecimento de cepas virulentas, fornecendo dados importantes para produtores de leite e derivados da necessidade de medidas de prevenção e controle da mastite com finalidade de otimizar a produção e prevenir casos de intoxicações alimentares aos consumidores, considerando que os principais consumidores do leite caprino na Paraíba é a população de risco, uma vez a produção leiteira é destinada a programas sociais governamentais. Nesse estudo objetivou-se investigar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas procedentes de isolados de leite caprino no estado da Paraíba, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O estudo foi realizado nos municípios de Amparo, Prata, Cabaceiras, Ouro Velho e São Sebastião de Umbuzeiro localizados na região leiteira caprina da Paraíba-PB. Foram coletadas 400 amostras de leite caprino, em 25 propriedades, para isolamento microbiológico. Nenhuma cabra apresentou características de mastite clínica no momento da coleta. As amostras foram coletadas em recipientes estéreis, após assepsia do teto, e mantidas sob refrigeração até a chegada no LAPOA (Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal) na UFPB/CCA (Universidade Federal da Paraíba) para análise microbiológica.

As propriedades foram selecionadas por conveniência, de acordo com a disponibilidade dos produtores rurais, através da articulação com as Associações de Criadores de Caprinos Leiteiros (Nascimento & Alves, 2008). As coletas foram realizadas em 2018, no período chuvoso, entre os meses de abril a junho. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Brasil, 2017), o efetivo do rebanho da região é de 35.859 caprinos, que foi utilizado para definir o tamanho da amostra pela fórmula $\frac{z^2 * p(1-p)}{e^2/1 + [z^2 * p(1-p)]/e^2 * N}$, sendo: z – o grau de confiança de 95%, e - margem de erro 5% e p constante de 0,5. Com isso, chegou-se ao número de 381 amostras a ser utilizadas na pesquisa.

Lactocultura e Identificação das espécies

As amostras foram cultivadas em ágar sangue ovino 5% e as placas foram analisadas com 24/48h de cultivo. Os microrganismos isolados foram submetidos a prova de catalase e teste de Gram. Um total de 105 amostras apresentaram características do gênero *Staphylococcus spp.* e foram encaminhadas ao Laboratório de Sanidade de animais aquáticos (Aquacen) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para identificação das espécies através do MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry). Foram submetidos também à Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) para detecção de genes enterotoxigênicos clássicos e novos.

Extração de DNA e PCR

O DNA genômico foi extraído com Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989). Foram realizadas PCR individuais objetivando identificar genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* e *sei*. As reações possuíam volume final de 50µL, foi usado PCR SuperMix (Invitrogen, Brasil) com 0,4mM de cada primer. A sequência dos primers e os tamanhos dos produtos da PCR estão evidenciados na Tabela 1. A amplificação foi realizada por termociclador que obedeceu a seguinte programação para todos os genes: um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos com etapas de desnaturação a 95°C/30 segundos, anelamento a 55°C/75 segundos e uma extensão a 72°C/30 segundos. Uma extensão final a 72°C por 5 minutos (Blaiotta *et al.*, 2004).

Os géis de agarose a 1,5% foram visualizados em transiluminador após a coloração em solução de Gel Red (Uniscience). A presença ou ausência das bandas foram analisadas em luz ultravioleta. Os controles positivos das reações incluíram *S.aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 13565 (*sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec*, *seh*, *seg* e *sei*), *S. aureus* ATCC 23235 (*sed*), *S.aureus* ATCC 27664 (*see*). Foi utilizada análise estatística descritiva.

RESULTADO

De 105 cepas de *Staphylococcus spp.* os quais foram testados por PCR para detecção de genes de EE clássicas (*a*, *b*, *c*, *d* e *e*) e novas (*g*, *h* e *i*). Os resultados são mostrados na tabela 2.

Foi identificado 8 (7,6%) isolados positivos aos genes de enterotoxinas. Três cepas apresentaram a enterotoxina *sec* (37,5%) e cinco *seh* (62,5%). Os genes *a*, *b*, *d*, *e*, *g* e *i* não foram observados. Entre as novas EE (*seg*, *seh* e *sei*), o gene *seh* foi o mais encontrado. As espécies mais enterotoxigênicas reveladas neste estudo foram os *S. epidermidis* e *S. caprae*.

DISCUSSÃO

A presença de genes enterotoxigênicos foi identificado em oito isolados (7,6%). Ocorrência maior de 12,2%, destes genes foram encontradas em estudo anterior, na mesma região, em investigação de *Staphylococcus spp.* enterotoxigênico oriundos de leite caprino (Lyra *et al.* 2013). Quando comparado a

frequência desses genes em *S. aureus* isolados de leite caprino, revelam porcentagens de frequência maiores de 19,5% observado por Ferreira et al (2014).

Três cepas apresentaram a enterotoxina *sec* (2,8%) e cinco *seh* (4,8%), três amostras apresentaram o gene *sec* e *seh* simultaneamente, indicando a capacidade enterotoxigênica dessa espécie em isolados de leite caprino. Resultados semelhantes foram encontrados em leite caprino em outros países, sendo *sec* a principal toxina codificada (Rahmdel et al. 2018). O gene *sec* é frequentemente encontrado em isolados de *S. aureus* (Ferreira et al. 2014; Rahmdel et al. 2018). No entanto trabalhos recentes demonstram maior amplificação de enterotoxinas novas como *sej* e *sei* em cepas de *S. aureus* de leite caprino (Rebouças et al. 2020). Os genes *a*, *b*, *d*, *e*, *g* e *i* não foram observados. Entre as novas EE (*seg*, *seh* e *sei*), o gene *seh* foi o mais encontrado.

Considerando as espécies de *Staphylococcus* spp. nesse estudo foi revelado que os SCN apresentam potencial enterotoxigênico maior quando comparado com SCP. Esses dados corroboram com outros estudos realizados no Brasil que demonstra a importância dessas espécies para a segurança dos alimentos (Lamaita et al, 2005; Lavor et al, 2019). Nascimento et al (2020) avaliando cepas do gênero SCN em queijo Emmental no Brasil também identificou potencial enterotoxigênico dessas espécies (6,9%). Os SCN isolados da corrente sanguínea também se destacaram como potencialmente produtores de enterotoxinas como descrito por Pedroso et al, (2016). Demonstrado potencial de virulência dessas espécies, observa-se a necessidade de atualização da legislação Brasileira em relação aos riscos dos SCN para a saúde e não apenas para os SCP (Lavor et al, 2019).

As espécies mais enterotoxigênicas reveladas neste estudo foram os *S. epidermidis* e *S. caprae*, este último destaca-se por não ter sido identificado em estudos anteriores com codificação de enterotoxinas. Os *S. pidermidis* foi observado em vários estudos como potencialmente produtores de enterotoxinas e de origem animal e humana (Salaberry et al, 2015; Rahmdel et al, 2018; Lavour et al, 2019).

Os SCP são cepas que abrigam frequentemente a *sec*, como observado em estudos anteriores que avaliaram a capacidade enterotoxigênica de SCP quanto as toxinas clássicas (Salaberry et al, 2015), no entanto neste estudo não foi observado a presença dessa enterotoxina nos SCP representado pelos *S. aureus*.

CONCLUSÃO

Cepas potencialmente enterotoxigênicas de origem caprina foram identificadas, especialmente SCN como *S. epidermidis* e *S. caprae*. Esse estudo revelou que cepas toxogênicas podem comprometer a qualidade do leite.

REFERÊNCIAS

- Andrade A.P.C., Borges M.F., Figueiredo E. A. T. & Arcuri E.F. 2019. Diversity of staphylococcus coagulase-positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes. Boletim CEPPA, Curitiba, v. 36, n. 2 1.
- Blaiotta G., Ercolini D., Pennacchia C., Fusco V., Casaburi A., Pepe O. and Villani F. 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 719–730
- Contreras A., Sierra D., Sanchez A., Corrales J.C., Marco J.C., Paaple M.J. & Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small ruminants reseach* 68, p. 145-153.
- Ferreira D.H. , Carvalho M.G.X., Nardelli M.J., Sousa F.G.C. & Oliveira C.J.B.. 2014. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7):633-636.
- Gosselin V.B., Lovstad J., Dufour S., Adkins P.R.F., & Middleton J.R. 2018. Use of MALDI-TOF to characterize staphylococcal intramammary infections in dairy goats *J. Dairy Sci.* 101:6262–6270.
- Lamaita HC, Cerqueira MMOP, Carmo LS, Santos DA, Penna MR, Souza CFAM. 2005. Contagem de *Staphylococcus sp* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 57:702–709.
- Lavor U. L., Guimarães F. F, Salina A., Mioni M.S.R. & Langoni H. 2019. Bacterial identification, somatic cell count, antimicrobial profile and toxigenic *Staphylococcus* strains search from mastitic cow milk samples on small farms properties. *Pesq. Vet. Bras.* 39(9):715-722.
- Lyra D.G., Sousa F.G.C, Borges M.F., Givisiez P.E.N., Queiroga R.C.R.E, Souza E.L., Gebreyes W.A.& Oliveira C.J.B.2013 Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. *Foodborne Pathogens and disease*, V.10, N. 2, 126-130.
- Nascimento A. L., Sousa R.S., Rezende A.A, Mattos E.C., Daros V.S.M.G., Col R.D., Pinheiro E.S & Nassar A.F.C. 2020. Detection of virulence factors in coagulase-negative *Staphylococcus* spp. strains isolated from Emmental cheese. *Arq. Inst. Biol.*, v.87, 1-7.
- Nascimento S.S., Alves J.J.A. 2008. Um alerta ambiental do grau da desertificação no Estado da Paraíba. Encontro internacional de geografia: tradições e perspectivas. Universidade de São Paulo-USP.
- Pedroso S.H.S.P., Sandes S.H.C., Luiz K.C.M, Dias R.S., Filho R. A. T., Surjo J. C., Farias L. M., Carvalho M. A. R., Bomfim M. R. Q & Santos S.G. 2016. Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections. *Microbial pathogenesis* (100) p. 312-318.
- Rahmdel S., Hosseinzadeh S., Shekarforoush S. S., Torriani S., Gatto V. & Pashangeh S. 2018. Safety hazards in bacteriocinogenic *Staphylococcus* strains isolated from goat and sheep milk. *Microbial Pathogenesis* (116) p. 100-108.
- Rebouças G.G, Abrantes M.R., Rebouças M.O., Araújo B.V.S., Sakamoto S.M. & Silva J.B.A. 2020. Detection of enterotoxigenic genes and *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk. *Brazilian Journal of Development Curitiba*, v. 6, n. 7, p. 45692-45703.
- Salaberry S.R.S., Saldenberg A.B.S., Zuniga E., Melville P.A., Santos F.G.B., Guimarães E.C., Gregori F. & Benites N.R. 2015. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastites. *Microbial Pathogenesis* 85 (35e39).
- Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

CAPÍTULO III

Perfil de sensibilidade e formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino

Artigo será submetido a revista Tropical animal Health and Production

Perfil de sensibilidade e formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino

Daneelly Henrique Ferreira Freire¹; Natanael de Souza Silva²; Iara Nunes de Siqueira³; Priscylla Carvalho Vasconcelos⁴; Núbia Michelle Vieira da Silva⁵; Sergio Santos de Azevedo⁶; Celso José Bruno de Oliveira⁷; Márcia Almeida de Melo⁸

ABSTRACT: Freire, D.H.F., Silva, N.S., Siqueira, I.N., Vasconcelos, P.C., Silva, Azevedo, S.S., N.M.V., Oliveira, C.J.B., Melo, M.A. 2021. **Perfil de sensibilidade e formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino.** Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, CSTR - Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Endereço: Avenida Universitária, s/n. Bairro Santa Cecília - Cx Postal 61 - Patos/PB. Antimicrobial resistance in bacteria is a worldwide concern and can be facilitated through the formation of biofilms and thus be transmitted through the dairy food chain, generating risks to public health as well as implying losses to goat milk producers. This study aimed to investigate strains from goat's milk regarding the phenotypic and genotypic resistance profile to *blaZ*, *mecA* genes and research of biofilm-forming strains through the *IcaD* gene. The isolates were identified using MALDI-TOF and the phenotypic resistance test by disk diffusion. The genotypic profile was performed by conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). As for phenotypic resistance, high resistance rates were observed for Penicillin (40%), Sulfa / Trimetropim (33%) and Tetracycline (25.5%), showing that the species *S. epidermidis* stood out as the most resistant. The presence of resistance genes was verified by the *blaZ* (26.6%), *mecA* (1.1%) genes. The hemolytic strains were shown to be potentially capable of forming biofilm identified through the *IcaD* gene (50%). The study found the potential risk of transmission through goat milk from strains with high rates of resistance to β -lactam antibiotics and the ability to form biofilms.

KEY WORDS: *Staphylococcus*; resistance; biofilm

RESUMO: A resistência antimicrobiana em bactérias é uma preocupação mundial, podendo ser facilitada através da formação de biofilmes e assim ser transmitida pela cadeia alimentar leiteira, gerando riscos à saúde pública bem como implica em prejuízos aos produtores de leite caprino. Este estudo teve como objetivo investigar cepas oriundas de leite caprino quanto ao perfil de resistência fenotípica e genotípica aos genes *blaZ*, *mecA* e pesquisa de cepas formadoras de biofilme através do gene *IcaD*. Os isolados foram identificados através do MALDI-TOF e o teste fenotípico de resistência foi realizado por disco difusão. O perfil genotípico foi realizado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. Quanto a resistência fenotípica forma observadas altas taxas de resistência para Penicilina (40%), Sulfa/Trimetropim (33%) e Tetraciclina (25,5%), constatando que a espécie *S. epidermidis* destacou-se como mais resistente. A presença de genes de resistência foram constatados pelos genes *blaZ* (26,6%) e *mecA* (1,1%). As cepas hemolíticas se mostraram potencialmente capazes de formar biofilme identificadas através do gene *IcaD* (50%). Com o estudo constatou-se o risco potencial de transmissão através do leite caprino de cepas com altas taxas de resistência a antibióticos β -lactâmicos e capacidade de formação de biofilme.

PALAVRAS CHAVE: *Staphylococcus*; resistência; biofilme

INTRODUÇÃO:

As bactérias do gênero *Staphylococcus* representam a maioria dos microrganismos causadores de mastite caprina (Peixoto et al. 2010). A importância dessas bactérias em rebanhos leiteiros caprinos não se limita apenas a uma preocupação à produção animal, mas também a sua importância em saúde pública, uma vez que são patógenos zoonóticos que podem ser transmitidos aos humanos pela cadeia alimentar leiteira (Moura et. al. 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recentemente apontou a importância da resistência antimicrobiana dos *S. aureus* como um patógeno que podem representar ameaça global a saúde humana. (OMS, 2017).

A detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) é alvo de muitos estudos, isolados de produtos lácteos, entretanto *Staphylococcus* coagulase negativos metilicina resistente (MRSCN) são menos explorados e podem ser negligenciados por sua capacidade de produzir fatores de virulência (Moura et al. 2018). Estudos demonstram a capacidade de transferência de material genético entre as espécies de *Staphylococcus* através da recombinação gênica, que pode ser facilitada pela habilidade de formação de biofilmes, promovendo um aumento na patogenicidade dos SCN (Souza et. Al. 2019).

As cepas MRSA ou MRSCN são resistentes a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, cuja ação é ligar-se às Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP) que são essenciais para a biossíntese da parede celular

bacteriana, nas estirpes resistentes a biossíntese continua mesmo na presença desses antibióticos. A confirmação da resistência a essa classe de antibiótico ocorre a partir da identificação do gene *mecA* (Peterson et al, 2014). O gene *blaZ* está associado a resistência a Penicilina, antibiótico muito usado no tratamento de mastite (Ahmed et al, 2020).

Os *Staphylococcus* são capazes de formarem biofilmes que são comunidades bacterianas que se fixam a superfícies como na glândula mamária e podem estar associados às infecções crônicas. O biofilme é a produção de matriz polimérica extracelular, a adesina intercelular polissacarídica (PIA) facilita a adesão celular e é codificada pelo operon *ica* (*IcaADBC*), este operon é responsável por expressar PIA (Salina et al. 2020). Diante da limitação de dados sobre a ocorrência de cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino resistentes a antibióticos β -lactâmicos e capacidade de produção de biofilme, o presente estudo teve como objetivo de investigar o perfil de sensibilidade e presença de genes de resistência (*blaZ* e *mecA*) e de formação de biofilme (*icaD*).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos municípios de Amparo, Prata, Cabaceiras, Ouro Velho e São Sebastião de Umbuzeiro localizados na região leiteira caprina da Paraíba-PB., Foram coletadas 400 amostras de leite caprino, em 25 propriedades, para isolamento microbiológico. Nenhuma cabra apresentou características de mastite clínica no momento da coleta. As amostras foram coletadas em recipientes estéreis, após assepsia do teto, e mantidas sob refrigeração até a chegada no LAPOA (Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal) na UFPB/CCA (Universidade Federal da Paraíba) para isolamento microbiológico.

As propriedades foram selecionadas por conveniência, de acordo com a disponibilidade dos produtores rurais, através da articulação com as Associações de Criadores de Caprinos Leiteiros (Nascimento & Alves, 2008). As coletas foram realizadas em 2018, no período chuvoso, entre os meses de abril a junho. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Brasil, 2017), o efetivo do rebanho da região é de 35.859 caprinos, que foi utilizado para definir o tamanho da amostra pela fórmula $[z^2 * p(1-p)]/e^2/1 + [z^2 * p(1-p)]/e^2 * N$, sendo: z – o grau de confiança de 95%, e - margem de erro 5% e p constante de 0,5. Com isso, chegou-se ao número de 381 amostras a ser utilizadas na pesquisa.

As amostras foram cultivadas em ágar sangue ovino 5% e as placas foram analisadas com 24/48h de cultivo. Os microrganismos isolados foram submetidos a prova de catalase, teste de Gram e avaliação dos padrões de hemólise, observando a mudança de cor ao redor das colônias. Um total de 90 amostras apresentaram características do gênero *Staphylococcus* spp. e foram encaminhadas ao Laboratório de Sanidade de animais aquáticos (Aquaden) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para identificação das espécies através do MALDI-TOF (Espectrofotometria em Massa).

A determinação da resistência fenotípica foi realizada através da técnica de disco difusão de acordo com a CLSI (2019) com avaliação de turbidez padrão de Kirby e Bauer (0,5 da escala MacFarland). A seleção dos antibióticos foi realizada com base em seu uso Humano e Veterinário para tratamento de infecções intramamárias e disponibilidade. Como controle positivo foi usado *Staphylococcus aureus* USA 400. Foram utilizados os seguintes discos: Cefoxitina 30 μ g, Oxacilina 1 μ g, Gentamicina 10 μ g, Eritromicina 15 μ g, Tetraciclina 30 μ g, Ciprofloxacina 5 μ g, Sulfá/Trimetropim 25 μ g, Clindamicina 2 μ g, Penicilina 10U, Clorafenicol 30 μ g. O teste exato de Fisher ($p > 0,05$) foi usado para identificar a associação entre as espécies com os antimicrobianos estudados. Os demais resultados foram usados a estatística descritiva para determinar as porcentagens.

O DNA genômico foi extraído com Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (Fritsch et al, 1989). Foram realizadas PCR individuais objetivando identificar genes *blaZ*, *mecA* e *IcaD*. As reações possuíam volume final de 50 μ L, foi usado PCR SuperMix (Invitrogen, Brasil) com 0,4mM de cada primer. A sequência dos primers e os tamanhos dos produtos da PCR estão evidenciados na Tabela 1. A amplificação foi realizada por termociclador que obedeceu a seguinte programação para *blaZ*: um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos com etapas de desnaturação a 94°C/30 segundos, anelamento a 55°C/30 segundos e uma extensão a 72°C/30 segundos. Uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Haveri et al. 2005), para *mecA*: um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos com etapas de desnaturação a 94°C/30 segundos, anelamento a 53°C/30 segundos e uma extensão a 72°C/30 segundos. Uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Adaleti et al. 2008), para *IcaD*: um ciclo inicial de 94°C por 4 minutos seguidos por 30 ciclos com etapas de desnaturação a 94°C/30 segundos, anelamento a 55°C/30 segundos e uma extensão a 72°C/30 segundos. Uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Arciola et al. 2001). As bandas foram visualizadas em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed (Biotium, Hayward, EUA) sob luz UV.

RESULTADOS

Foram obtidos 90 isolados de *Staphylococcus* spp, destes 98% SCN e 2% SCP. Dos antimicrobianos testados foi observada altas taxas de resistência para Penicilina (40%), Sulfa/Trimetropim (33%) e Tetraciclina (25,5%). Entretanto 100% dos isolados foram sensíveis a Gentamicina.

Quando comparado entre municípios, observa-se que houve grande diversidade de resistência aos antibióticos testados e que o município de Prata se destaca com as maiores taxas de resistência antimicrobiana às classes de sulfonamidas representada pelo antibiótico Sufa/Trimetropim (74%), Tetraciclina (44,4%) e β -lactâmicos (40,7%), demonstrado na figura 1. O município de Cabaceiras foi o município que apresentou uma única cepa de *S. epidermidis* resistente ao Clorafenicol, este último usado em terapia da mastite clínica. A cepa resistente a Cefoxitina nesse mesmo município, foi da espécie *S. aureus* caracterizando como indicativo de MRSA (*S. aureus* Meticilina Resistente) no perfil fenotípico, embora no perfil genotípico tenha sido negativo para presença do gene *mecA*.

Analisando o perfil de resistência fenotípica de MRSCN através da resistência a oxacilina foram encontrados neste estudo nos municípios de Amparo, a espécie *S. saprophyticus* e *S. xylosus*.

Quanto as taxas de resistência por classe de antibiótico, pode ser observado no geral, uma resistência considerável aos β -lactâmicos (42%), esse dado é consequência das altas taxas de resistência a Penicilina e presença de cepas resistentes a Meticilina no perfil fenotípico (MRSA e MRSCN).

Os *S. epidermidis* foi a espécie que se destacou como mais resistente aos antibióticos Penicilina, Sulfa/Trimetropim, Tetraciclina, Eritromicina e Clindamicina. Essa mesma espécie mostra-se com o maior número de cepas multirresistentes (resistente a três ou mais grupos de antimicrobianos), demonstrado na figura 2.

Todos os isolados foram examinados quanto a presença dos genes *blaZ* para investigação de estirpes que abrigassem o gene relacionado a resistência aos β -lactâmicos, foi identificado 24 (26,6%) amostras positivas, o gene *mecA* (1,1%) foi codificado em apenas uma cepa caracterizando uma cepa Meticilina Resistentes (MR). As amostras hemolíticas foram testadas para o gene *IcaD* (50% - 6/12) a fim de detectar linhagens bacterianas com capacidade de produzir biofilmes.

Estirpes de *S. caprae* e *S. aureus* apresentaram perfil de formação de biofilme por apresentarem genes *IcaD*. Cepas de *S. epidermidis* e *S. caprae* destacam-se como os mais resistentes aos antibióticos β -lactâmicos.

DISCUSSÃO

Os isolados de *Staphylococcus* apresentaram alta resistência (57/90 isolados - 63,3%) aos antimicrobianos testados, esse resultado corrobora com Andreson et. Al. (2019) que ao analisar resistência antimicrobiana de isolados de leite caprino nos Estados Unidos também apresentaram alta de resistência (62,3%) e Souza et al. (2019) em estudos no Brasil também verificou altas taxas de resistência de isolados caprino (55%). As classes de antibióticos que revelaram maiores taxas de resistência foram β -lactâmicos, Sulfonamidas e Tetraciclina. Esses dados demonstram que o tratamento nas terapias de mastites vem sendo prejudicados pelo crescente número de cepas resistentes, provocando sérios prejuízos econômicos ao produtor e risco de transferência de cepas resistentes a população consumidora através da cadeia leiteira alimentar caprina.

A maior frequência de resistência foi observada para Penicilina (36/90 - 40%), Sufa/Trimetropim (30/90 - 33%) e Tetraciclina (23/90 - 25,5%), esse perfil de resistência revela o uso comum dessas drogas no tratamento e prevenção de infecções intramamárias de maneira desordenada, sem auxílio técnico e sem testes de sensibilidade prévia (Okoko et al. 2020). Curiosamente os sistemas de produção leiteira caprina possuem baixa adoção de tecnologias e gestão inadequada o que predispõe o rebanho a desenvolver mastite e causar perdas econômicas com tratamentos, além do risco eminente de transferência de patógenos resistentes através do leite e derivados (Aragão et al. 2019).

Os antimicrobianos mais eficazes foram Gentamicina com total sensibilidade das amostras, é comum a susceptibilidade dos *Staphylococcus* aos aminoglicosídeos (Lira et al. 2016; Viridis et al. 2010). O Clorafenicol apresentou com apenas uma cepa de *S. caprae* resistente. Múltiplas resistências foram identificadas em 16 isolados, destes 87,5% (14/16) são *S. epidermidis*, sendo comum identificação dessa espécie envolvida com altas taxas de resistência (Anderson et al, 2019).

O perfil de resistência MRSA e MRSCN tem importância devido ao potencial zoonótico de disseminação através do leite (Viridis et al. 2010). No presente estudo foram detectados dois isolados de MRSCN das espécies *S. xylosus* e *S. lugdunensis*, estes apresentaram resistência a oxacilina no teste fenotípico, embora não apresentaram o gene *mecA*, curiosamente um estudo de sequenciamento de cepas resistentes a oxacilina que não eram positivas para *mecA* revela a possibilidade destas cepas serem portadoras do gene homólogo ao *mecA*, denominado *mecC*, cuja origem sugere-se ser animal e de SCN (Paterson et al. 2014).

Na avaliação do perfil de resistência genotípica, amostras revelaram-se potencialmente resistentes aos β -lactâmicos através da codificação dos genes *mecA* (1/90 - 1,1%) e *blaZ* (24/90 - 26,6%). O gene *mecA* que codifica resistência a meticilina é pouco frequente e observado principalmente em SCP (Souza et al. 2019; Moura et al. 2018; Aragão et al. 2019; Viridis et al. 2010), em contraste neste estudo a única cepa positiva é um *S. caprae*. O gene *blaZ* que codifica cepas produtoras de β -lactamases e resistência a penicilina apresentou nesse

trabalho baixa frequência quando comparado a cepas isoladas em outros estudos no Brasil, 42,6%, (Aragão et al. 2019), no Egito, 73,3% (Ahmed et al. 2020), na Alemanha (Hammer et al. 2019).

A resistência antimicrobiana associada a produção de biofilme é motivo de preocupação na cadeia leiteira que pode refletir em saúde pública (Lira et al. 2016), a formação de biofilme está associada a mastites crônicas (Salina et al. 2020) e ainda proporcionam ambiente propício a transferência horizontal de genes de resistência e virulência entre as espécies presentes no biofilme. Neste estudo das cepas hemolíticas analisadas 50% (6/12) foram positivas para o gene *IcaD*, sendo 5 *S. caprae* e 1 *S. aureus*, revelando a capacidade de expressão de PIA. Frequências semelhante foi observada com isolados de *Staphylococcus* de mastite bovina, 41,5% codificou *IcaD* (Salina et al. 2020), quando comparado a cepas de *Staphylococcus* isoladas de leite caprino as frequências do gene *IcaD*, 84%, foi bem maior, demonstrando a capacidade das cepas serem formadoras de biofilme (Lira et al, 2016).

CONCLUSÃO

Os isolados de *Staphylococcus* de leite caprino possuem altas taxas de resistência antimicrobiana, especialmente ao do grupo β -lactâmico, destacando a espécie *S. epidermidis* como as que apresentou maior capacidade de resistência fenotípica. Foi comprovado que cepas de SCN destacam-se como produtores de biofilme, sobretudo a espécie *S. caprae*. Foi identificada uma cepa MRSCN da espécie *S. caprae*.

Tabela 1. Sequência de primers usado para determinação da resistência fenotípica e formação de biofilme

GENE	SEQUÊNCIA	Pares de bases	REFERÊNCIA
<i>blaZ</i>	AAG AGA TTT GCC TAT GCT TC GCT TGA CCA CTT TTA TGA GC	517	Haveri et al, 2005
<i>IcaD</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	198	Arciola et al, 2001
<i>mecA</i>	GTA GAA ATG ACT GAA AGT CCG ATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	Adaleti et al, 2008

Tabela 2. Frequência de genes de resistência e formação de biofilme em espécies de *Staphylococcus* isolados de leite caprino na Paraíba

GENES	QUANTIDADE	PORCENTAGEM	ESPÉCIES
<i>blaZ</i>	24/90	26,6%	<i>S. epidermidis</i> (18 isolados) <i>S. caprae</i> (4 isolados) <i>S. aureus</i> (1 isolado) <i>S. capitis</i> (1 isolado)
<i>mecA</i>	1/90	1,1%	<i>S. caprae</i> (1 isolado)
<i>IcaD</i> (amostras hemolíticas)	6/12	50%	<i>S. caprae</i> (5 isolados) <i>S. aureus</i> (1 isolado)

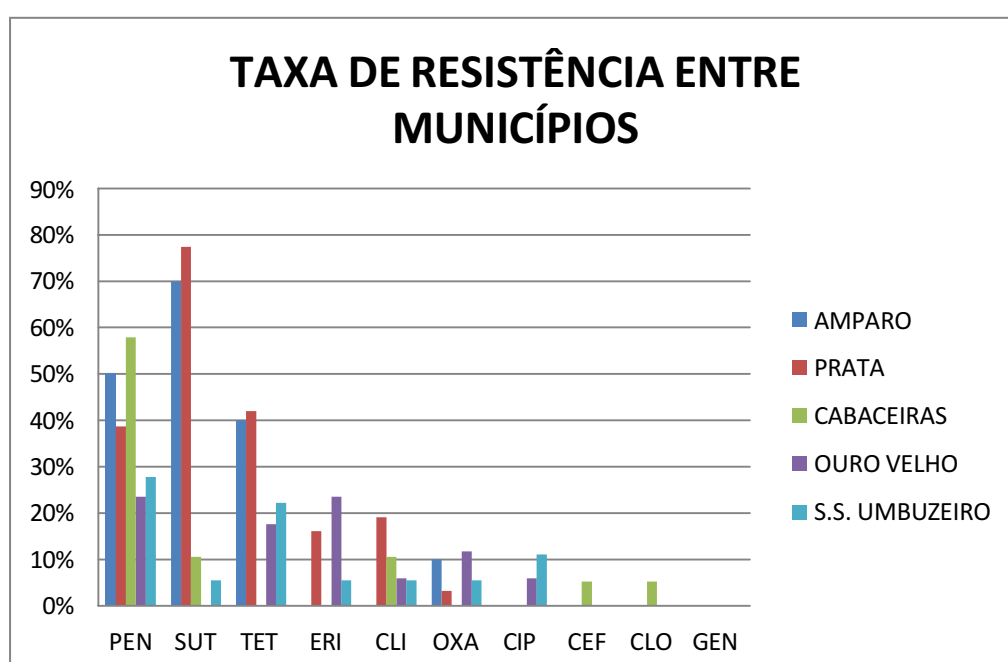


Figura 1. Taxa de Resistência de *Staphylococcus* isolados de leite caprino em municípios produtores de leite na Paraíba

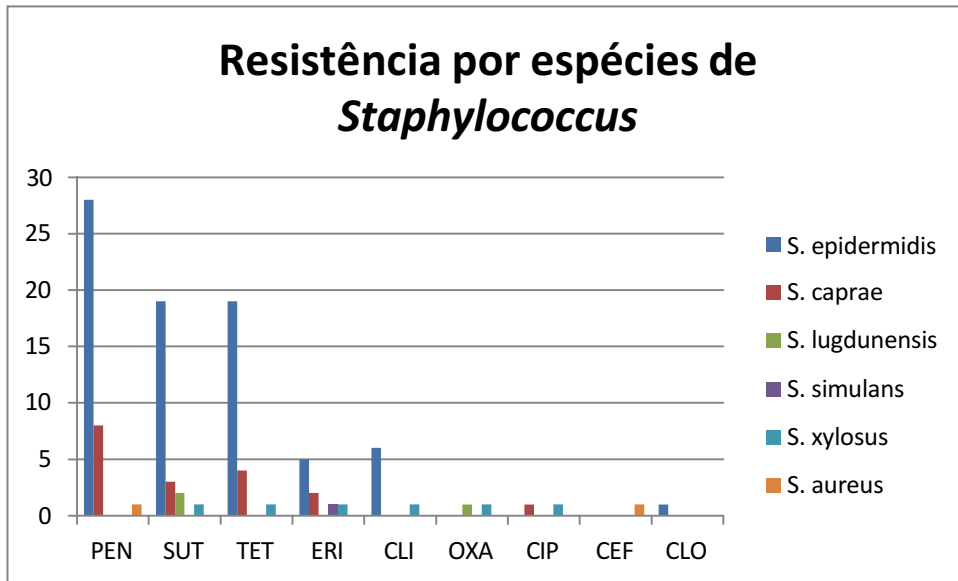


Figura 3. Taxa de resistência entre as espécies de *Staphylococcus* isolados de leite caprino na Paraíba

REFERÊNCIAS

- Adaleti, R. et al. 2008. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 2, n. 1, p. 46-50.
- Ahmed W., Neubauer H., Tomaso H., Hofy F.I., Monecke S., Abdeltawab A.A and Hotzel H. 2020. Characterization of Staphylococci and Streptococci Isolated from Milk of Bovides with Mastitis in Egypt. *Pathogens*, 9, p.381; doi:10.3390.
- Anderson K.L., Kearns R., Lyman R., Correa M.T. 2019. Staphylococci in dairy goats and human milkers, and the relationship with herd management practices. *Small Ruminant Research*, 171, 13–22.
- Aragão B.B., Trajano S. C., Silva J. G., Silva B. P., Oliveira R. P., Pinheiro Junior J. W., Peixoto R. M. and Mota R. A. 2019. *Short communication*: High frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. *J. Dairy Sci.* 102:6923–6927.
- Arciola CR, Baldassari L, Montanaro L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 39: 2151-2156.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2019. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From humans; Approved standard, third ed. CLSI, Wayne, PA (M31-A3).
- Fritsch EF, Maniatis T, Sambrook J. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1659 p.
- Hammer P., Jordan J., Jacobs C. and Klempt M. 2019. Characterization of coagulase-negative staphylococci from brining baths in Germany. *J. Dairy Sci.* 102:8734–8744.
- Lira M.C. , Givisiez P.E.N., Sousa F.G.C., Magnani M., Souza E.L., Spricigo D.A., Gebreyes W.A., Oliveira C.J.B. 2016. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. *Infect Dev Ctries*; 10(9):932-938.
- Moura G. S., Gebreyes W. A., Marques M. F. S., Stipp D. T., Souza F. N., Da Costa L. B. and Oliveira C. J. B. 2018. *Short communication*: Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. *J. Dairy Sci.* 101:1–4.
- Nascimento S.S., Alves J.J.A. 2008. Um alerta ambiental do grau da desertificação no Estado da Paraíba. Encontro internacional de geografia: tradições e perspectivas. Universidade de São Paulo-USP.
- Okoko I.M, Maina N. , Kiboi D. and Kagira J. 2020. β -lactam resistance in bacteria associated with subclinical mastitis in goats in Thika Subcounty, Kenya. *Veterinary World*,v. 13,p.1448-1456.
- Paterson G.K., Harrison E.M. and Holmes M.A. 2014.The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, Vol. 22, No. 1.
- Salina A., Guimarães F.F., Pereira V.B.R., Menozzi B.D, Rall V.L.M., Langoni H. 2020. Detection of *icaA*, *icaD*, and *bap* genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* and non-aureus Staphylococci isolated from subclinical and clinical bovine mastites. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.72, n.3, p.1034-1038.
- Souza V.C., Rossi C.C., Freitas L.J.J., Brito M.A.V.P., Laport M.S. and Marval M.G. 2019. *Short communication*: Diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from goat milk. *J. Dairy Sci.* 102:5518–5524.
- Virdis S., Scarano C., Cossu F., Spanu V., Spanu C. and Santis E.P.L. 2010. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Goats with Subclinical Mastitis. *Veterinary Medicine International Volume* 2010.
- World Health Organization. 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Acesso em janeiro de 2021. <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>

CONCLUSÃO GERAL

O trabalho revelou altas taxas de mastite subclínica destacando os *Staphylococcus* coagulase negativos como os principais agentes etiológicos.

Cepas potencialmente enterotoxigênicas foram identificadas, representando risco a saúde pública de intoxicações alimentares.

Altas taxas de resistência fenotípica foram identificadas especialmente para antibióticos β -lactâmicos, destacando a espécie dos *S. epidermidis*. Quanto a avaliação genotípica revelou cepas de SCN com capacidade de formação de biofilme.

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

1. Organize o artigo em **TÍTULO, RESUMO, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÃO (S)** (os três últimos preferencialmente em capítulos separados), **Agradecimentos, Declaração de conflito de interesses e REFERÊNCIAS:**

- a. O **TÍTULO** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; informar detalhes de identificação científica nos **MATERIAIS E MÉTODOS**.
- b. Os nomes de **autores com vários nomes e sobrenomes devem ser abreviados**, por exemplo, simplificar Claudio Severo Lombardo de Barros para Claudio SL Barros ou Barros CSL
O Autor para correspondência deve ser aquele que garante o contato com o Conselho Editorial do PVB. Eleve mais uma vez os asteriscos para a chamada às notas de rodapé, para que pareçam maiores.
- c. O **Título do RESUMO** deve conter os nomes abreviados e invertidos dos autores, o ano, o título [a travar quando traduzido] e o endereço postal do laboratório ou instituição onde foi realizada a parte principal da pesquisa (compare sempre os autores do artigo e sua listagem no Título do Resumo para evitar discrepâncias).
- d. A **nota de rodapé da primeira página** deve conter o endereço profissional completo de cada autor (no idioma do país do autor onde a correspondência pode ser enviada, português, espanhol, inglês, etc.), bem como o e-mail sublinhado do correspondente Autor.
- e. O **RESUMO** deve ser uma versão bem explicada do **RESUMO** em português, seguido de “**TERMOS DO ÍNDICE**”, que deve incluir os termos do título, pois não são apenas Termos Adicionais do Índice.
- f. O **RESUMO** deve conter (1) o título [entre colchetes e em negrito (2) o que foi investigado, indicando (2) os materiais e métodos utilizados, (3) os resultados mais importantes, e (4) a conclusão, seguida por "TERMOS DE INDEXAÇÃO" (que também incluem palavras do título, pois não são apenas Termos Adicionais do Índice).
- g. A **INTRODUÇÃO** deve ser curta, com citação da literatura específica, seguida do objetivo da pesquisa.
- h. Em **MATERIAIS E MÉTODOS**, forneça todos os dados necessários para repetir o estudo.
- i. Nos **RESULTADOS** são apresentados os dados obtidos de forma concisa.
- j. Em **DISCUSSÃO**, confronte os resultados com a literatura. Evite mencionar o desenvolvimento de pesquisas ou planejamentos futuros para evitar o compromisso da revista em publicar os resultados.
- k. Basear as **CONCLUSÕES** apenas em seus resultados.
- l. Não mencione **Agradecimentos** no texto ou notas de rodapé, mas após as **CONCLUSÕES**.
- m. Declare qualquer **conflito de interesses** ou "**nenhum**" se for o caso.
- n. As **REFERÊNCIAS** devem incluir todas as citações consultadas e apresentadas cronologicamente no texto. Escreva a lista de **Referências** em ordem alfabética e cronológica, começando pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores da respectiva referência, em letras maiúsculas e minúsculas. Cada Autor dividido apenas por uma vírgula,

seguido do ano, título, e os dados da publicação (extensivamente em caso de dúvida sobre abreviatura), de acordo com www.pvb.com.br .

2. **O estilo da revista deve ser atendido** , da seguinte forma:

- a. Font **Cambria em pitch 10, espaço simples entre linhas; formato de página A4, com margens de 2cm** (superior, inferior, esquerda e direita), texto justificado em uma coluna. Coloque as legendas das Figuras abaixo da lista da Lista de Referência; não repita as legendas junto com as imagens das Figuras. Envie figuras e tabelas separadamente.
- b. **RESUMO** e **RESUMO** são escritos em apenas um parágrafo e não deve conter referências.
- c. Os artigos devem ser concisos, sempre que possível no pretérito e impessoais.
- d. Os nomes científicos devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*) no início de cada capítulo (Título, Resumo, Introdução, etc.) quando aparecem pela primeira vez, seguidos da abreviatura do gênero (p.ex. *P. marcgravii*).
- e. Nos títulos das tabelas e legendas das figuras, escreva os nomes científicos por extenso.
- f. No texto, as chamadas às notas de rodapé são feitas em algarismos arábicos, em ordem crescente ao longo de todo o trabalho, sem a utilização de "Inserir nota final" de Word. Nota : Não use espaços entre os números e suas unidades para evitar separá-los em duas linhas (p.ex. : 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, P <0,05. A abreviatura do número é “n^o” e não “n^o ”; para graus Celsius “^o C” e não “^o C”.
- g. Tabelas e Figuras devem ser citadas no texto com seus respectivos números em ordem crescente.
- h. Abreviaturas de instituições, quando apresentadas pela primeira vez, devem ser colocadas entre parênteses após o nome completo da instituição.
- i. As citações da literatura no texto são feitas por "autor e ano" (p.ex. Caldas 2005). Cite artigos com dois autores com os dois nomes (p.ex. Pedroso & Pimentel 2013.) Cite artigos com mais de dois autores no texto pelo primeiro nome do autor seguido de "et al." e o ano (p.ex. Brito et al. 2015). Se a citação de dois artigos for idêntica, faça a distinção acrescentando letras minúsculas após o ano de publicação (p.ex. Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação no texto deve ser cronológica (p.ex. Barbosa et al. 2003, Armién et al. 2004).
- j. **Consulte o texto completo de todos os artigos citados** ; se não for possível, cite a referência original no texto do manuscrito como, p.ex., Bancroft (1921); e então, na Lista de Referências, deve aparecer como Bancroft 1921. título. Diário (Apud Suvarna & Layton 2013). Além disso, inclua esta referência consultada na íntegra na Lista de Referências.
- k. O uso de “comunicação pessoal” e “dados não publicados” deve ser excepcional e citado no texto como Autor e Ano (Barbosa 2016), e na Lista de Referências como p.ex. Barbosa 2016. Comunicação Pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal, Brasil).
- l. **As legendas das figuras** (p.ex. "Fig.3.....") devem ser suficientemente informativas para a compreensão (porque as Figuras são independentes do texto).
- m. **Os títulos das tabelas** devem ser escritos em **negrito** , e o **cabeçalho** (títulos das colunas) deve ser claro (não negrito), escrito em letras maiúsculas e minúsculas, e separados por duas linhas horizontais longas. Não há linhas verticais nem fundo cinza; excepcionalmente podem existir linhas

horizontais. As chamadas de notas de rodapé devem ser em letras minúsculas ou outros sinais, mas não em números arábicos. As tabelas devem ser submetidas em Word (não como imagens) para permitir correções de acordo com o estilo da revista.

- n. Os dados complexos devem ser **enviados** como **gráficos (mas referidos como Figuras)** em 2D sem fundo cinza e linhas horizontais. Escreva gráficos, incluindo texto, com Cambria em tom 10.

3. Apresentação da figura:

- a. Formato e dimensão: As imagens devem estar em formato TIF, canal RGB, comprimento de 85 mm e resolução de 300 dpi (pixel / polegada) para figuras coloridas e 600 dpi (pixel / polegada) para figuras em preto e branco (gráficos e mapas).
- b. Numeração: As figuras devem ser nomeadas separadamente e identificadas apenas por números na ordem em que são citadas no texto (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.). Não use letras (Fig. 1A, 1B, 1C, etc.) para identificar as figuras.
- c. Identificação de estruturas: Caso seja necessário destacar estruturas específicas dentro da imagem, utilizar fonte "Cambria 8 pontos", preto ou branco, ou setas pretas ou brancas dependendo do fundo da figura.
- d. Micrografias: as barras de escala não são obrigatórias.
- e. Legendas das figuras: Cada figura deve ter uma legenda autoexplicativa. Deve conter o que está na imagem, seguido de informações adicionais (Exemplo de formato de legenda da figura: Fig.1. Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Histoquímica (HE, PAS, etc.) ou método imunohistoquímico (vimentina, etc.). Ao descrever aspectos da imunohistoquímica, use o termo "imunomarcção" em vez de "coloração" ou "positivo". Indique onde ocorreu a "imunomarcção" (nuclear, citoplasmática e membranosa) e em que extensão. As legendas das figuras devem aparecer no manuscrito principal, após as referências.

4. Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências. Antes de enviar o artigo, as discrepâncias devem ser corrigidas pelo Autor. O sistema ScholarOne bloqueia automaticamente se tais disparidades existirem).**Exemplos para referências:**

- a. Artigos publicados em revistas científicas:
 - Ubiali DG, Cruz RA, De Paula DA, Silva MC, Mendonça FS, Dutra V., Nakazato L., Colodel EM & Pescador CA 2013. Patologia da infecção nasal causada por *Conidiobolus lamprauges* e *Pythium insidiosum* em ovinos. J. Comp. Pathol. 149 (2/3): 137-145.
 - Hooiveld M., Smit LA, Wouters IM, Van Dijk CE, Spreeuwenberg P., Heederik DJ & Yzermans CJ 2016. Problemas de saúde diagnosticados por médicos em uma região com alta densidade de operações concentradas de alimentação animal: um estudo transversal. Environ. Health 17: 15-24.(Nota : As primeiras letras das palavras do título dos artigos publicados em periódicos são pequenas. É preferível indicar o número do respectivo fascículo.)
- b. Livros :
 - Marsh P. e Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3ª ed. Chapman and Hall, Londres, p.167-196.
 - Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV e Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus,

Rio de Janeiro, p.305-348.(Observação : a primeira letra nas palavras do título dos livros deve ser maiúscula.)

c. Capítulos de livros :

- Uzal FA, Plattner BL & Hostetter JM 2016. Sistema alimentar, p.1-257. In: Maxie MG (Ed.), Jubb, Kennedy e Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 6ª ed. Elsevier, St Louis, Missouri.
- Barros CSL 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild AL, Lemos RAA e Borges JRJ (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

d. Dissertações e teses :

- Rech RR 2007. Alterações no encéfalo de bovinos ocorrendo à vigilância das encefalopatias espongiiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 228p.(Nota : Use artigos originados de dissertações ou teses no lugar destes).

e. Resumos publicados em eventos:

- Massa AT, Potter KA e Bradway D. 2016. Surto de aborto epizootico em bovinos no leste de Nevada. Reunião Anual do American College of Veterinary Pathologist (ACVP), New Orleans, Louisiana. (Resumo D-50)
- Mendonça FS, Almeida VM, Albuquerque RF, Chaves HAS, Silva Filho GB, Braga TC, Lemos BO & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos não semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). Pesq. Veterinario. Bras. 36 (Supl.2): 50-51. (Resumo)
- Pierezan F., Lemos RAA, Rech RR, Rissi DR, Kommers GD, Cortada VCLM, Mori AE e Barros CSL 2007. Raiva em equinos. Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146. (Resumo)(Nota : consulte artigos inteiros em vez de apenas resumos)

ANEXO B – NORMAS REVISTA TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION

Tipos de artigos

Os manuscritos devem ser apresentados preferencialmente em fonte Times New Roman, espaço duplo, utilizando tamanho de papel A4. Use a função de numeração automática de páginas e linhas para numerar as páginas e linhas do seu documento e numerar as linhas em uma única seqüência contínua.

Artigos regulares: os artigos devem ser tão concisos quanto possível e normalmente não devem exceder aproximadamente 4000 palavras ou cerca de 8 páginas da revista, incluindo ilustrações e tabelas. Os artigos devem ser estruturados nas seguintes seções;

- (a) Resumo de 150-250 palavras dando uma sinopse dos achados apresentados e as conclusões alcançadas. O Resumo deve ser apresentado como um único parágrafo contínuo, sem subdivisões.
- (b) Introdução declarando o propósito do trabalho
- (c) Materiais e Métodos
- (d) Resultados
- (e) Discussão (as conclusões devem ser incorporadas na discussão!)
- (f) Agradecimentos
- (g) Declaração de Direitos dos Animais
- (h) Declaração de conflito de interesses
- (i) Referências

Comunicações curtas e notas técnicas: As comunicações breves e notas técnicas não devem normalmente exceder aproximadamente 2.000 palavras ou cerca de 4 páginas da revista, incluindo ilustrações, tabelas e referências. Deve ser incluído um resumo de 150-250 palavras e um número mínimo de subtítulos pode ser incluído, se isso agregar clareza ao artigo.

As comunicações curtas relatam dados científicos originais.

As notas técnicas descrevem metodologias inovadoras.

Revisões: Artigos de revisão serão bem-vindos. No entanto, os autores que consideram a submissão de artigos de revisão são aconselhados a consultar o Editor-Chefe com antecedência.

Correspondência: Cartas sobre temas relevantes aos objetivos da Revista serão consideradas para publicação pelo Editor-Chefe, que poderá modificá-las.

É responsabilidade dos autores garantir que os manuscritos submetidos estejam de acordo com o formato do periódico, conforme indicado nas instruções atuais aos autores e artigos de amostra grátis na página inicial do periódico springer.com.

Texto

Formatação de Texto: Os manuscritos devem ser submetidos em Word.

Use uma fonte normal e simples (por exemplo, Times Roman de 10 pontos) para o texto.

Use itálico para dar ênfase.

Use a função de numeração automática de páginas para numerar as páginas.

Não use funções de campo.

Use paradas de tabulação ou outros comandos para recuos, não a barra de espaço.

Use a função de tabela, não planilhas, para fazer tabelas.

Use o editor de equação ou MathType para equações.

Salve seu arquivo em formato docx (Word 2007 ou superior) ou formato doc (versões anteriores do Word).

Títulos

Use no máximo três níveis de cabeçalhos exibidos.

Abreviações

As abreviaturas devem ser definidas na primeira menção e usadas consistentemente depois disso.

Notas de rodapé

As notas de rodapé podem ser usadas para fornecer informações adicionais, que podem incluir a citação de uma referência incluída na lista de referências. Eles não devem consistir apenas em uma citação de referência e nunca devem incluir os detalhes bibliográficos de uma referência. Eles também não devem conter quaisquer figuras ou tabelas.

As notas de rodapé do texto são numeradas consecutivamente; aqueles nas tabelas devem ser indicados por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos). As notas de rodapé do título ou os autores do artigo não possuem símbolos de referência.

Sempre use notas de rodapé em vez de notas de fim.

Agradecimentos

Agradecimentos a pessoas, doações, fundos, etc. devem ser colocados em uma seção separada na página de título. Os nomes das organizações financiadoras devem ser escritos por extenso.

Observe:

Use a função automática de numeração de páginas e linhas para numerar as páginas e linhas do documento.

Referências

1. Todas as publicações citadas no texto devem ser apresentadas na lista de referências. O texto datilografado deve ser verificado cuidadosamente para garantir que a grafia dos nomes e datas dos autores sejam exatamente iguais às da lista de referências.
2. No texto, referir o nome do autor (sem rubrica) e ano de publicação, seguido, se necessário, de uma breve referência às páginas apropriadas. Exemplos: 'Peters (1985) mostrou isso. " Isso está de acordo com os resultados obtidos posteriormente (Kramer, 1984, pp. 12-16) '
3. Caso seja feita referência no texto a publicação de três ou mais autores, a abreviatura et al. deve ser usado. Todos os nomes devem constar da lista de referências.
4. As referências citadas em conjunto no texto devem ser organizadas cronologicamente. A lista de referências deve ser organizada em ordem alfabética pelo (s) sobrenome (s) dos autores e cronologicamente por autor. Se um autor da lista também for citado com coautores, deve-se seguir a seguinte ordem: publicações de um único autor, organizadas de acordo com as datas de publicação; publicações do mesmo autor com co-autores. Publicações do (s) mesmo (s) autor (es) no mesmo ano devem ser listadas como 1986a, 1986b, etc.
5. Use o seguinte sistema para organizar cada referência na lista: • Para artigos de periódicos: Ahl, AS, 1986. O papel das vibrissas no comportamento: uma revisão de status, Veterinary

Research Communications, 10, 245--268 • Para livros: Fox, JG, Cohen, BJ e Lowe, FM, 1984. Laboratory Animal Medicine, (Academic Press, Londres) • Para um artigo em anais de simpósios publicados ou um capítulo em livros de vários autores: Lowe, KF e Hamilton, BA, 1986 Pastagens leiteiras nos trópicos e subtropicais australianos. In: GT Murtagh e RM Jones (eds), Proceedings of the 3rd Australianconferência on tropical pastures, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68-79 • Para teses não publicadas, memorandos etc: Crowther, J., 1980. Karst water studies and environment in West Malaysia, (tese de doutorado não publicada, University of Hull) • Para documentos online: Doe J. Título do documento subordinado. In: O dicionário de substâncias e seus efeitos. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Acessado em 15 de janeiro de 1999

6. Não abrevie os títulos dos periódicos mencionados na lista de referências.

7. Os títulos das referências devem ser fornecidos no idioma original, exceto para os títulos de publicações em alfabetos não latinos, que devem ser transliterados, e uma notação como '(em russo)' ou '(em grego, com resumo em inglês)' adicionado.

8. As citações de comunicações pessoais devem ser evitadas, a menos que seja absolutamente necessário. Quando utilizados, devem aparecer apenas no texto, utilizando o formato: 'E. Redpath, comunicação pessoal, 1986' e não deve aparecer na Lista de Referências. As citações a dados não publicados de qualquer um dos autores não devem ser incluídas a menos que o trabalho já tenha sido aceito para publicação, caso em que a referência deve ser feita da forma usual com "no prelo" no lugar do volume e números de página.

Tabelas

Todas as tabelas devem ser numeradas em algarismos arábicos.

As tabelas devem ser sempre citadas em texto em ordem numérica consecutiva.

Para cada tabela, forneça uma legenda (título) explicando os componentes da tabela.

Identifique qualquer material publicado anteriormente, fornecendo a fonte original na forma de uma referência no final da legenda da tabela.

As notas de rodapé das tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídas abaixo do corpo da tabela.

Diretrizes de arte e ilustrações

Envio de Figura Eletrônica

Forneça todas as figuras eletronicamente.

Indique qual programa gráfico foi usado para criar a arte.

Para gráficos vetoriais, o formato preferido é EPS; para meios-tons, use o formato TIFF. Arquivos MSOffice também são aceitáveis.

Os gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas aos arquivos.

Nomeie seus arquivos de figura com "Fig" e o número da figura, por exemplo, Fig1.eps.

Definição: Gráfico em preto e branco sem sombreamento.

Não use linhas e / ou letras esmaecidas e verifique se todas as linhas e letras nas figuras são legíveis no tamanho final.

Todas as linhas devem ter pelo menos 0,1 mm (0,3 pt) de largura.

Desenhos de linhas digitalizados e desenhos de linhas em formato bitmap devem ter uma resolução mínima de 1200 dpi.

Os gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas aos arquivos.